

Российская академия наук

Журнал биологии развития

ОНТОГЕНЕЗ

Том 53 № 4 2022 ИЮЛЬ—АВГУСТ

Журнал основан в 1970 году академиком Б.Л. Астауровым

Выходит 6 раз в год

ISSN: 0475-1450

*Журнал издается под руководством
Отделения биологических наук РАН*

Главный редактор

А.В. Васильев

Редакционная коллегия:

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

Редакционный совет:

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

Адрес редакции: 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: ontogenez@list.ru

Зав. редакцией Е.Д. Гасило

Москва

ООО «Тематическая редакция»

Оригинал-макет подготовлен ООО «ИКЦ «АКАДЕМКНИГА»

© Российская академия наук, 2022

© Редколлегия журнала “Онтогенез”
(составитель), 2022

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

Подписано к печати 29.12.2021 г.

Формат 60 × 88¹/₈

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 4, 2022

ОБЗОРЫ

Роль базальных ганглиев в развитии и организации вокального поведения певчих птиц <i>Н. Ю. Ивлиева</i>	241
Генетическая регуляция морфогенеза механорецепторов <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Д. П. Фурман, Т. А. Бухарина</i>	250
Астроциты мозга — свита делает короля <i>М. А. Александрова, К. К. Сухинич</i>	265
CRISPR/Cas: история и перспективы <i>А. А. Шмакова, О. П. Шмакова, А. А. Карпухина, Е. С. Васецкий</i>	287

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Возможное участие микроглии в установлении связи между центральной и периферической нервной системой <i>Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский</i>	301
--	-----

ИСТОРИЯ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

Арчил Карпезович Дондуа (1929–2021) <i>Р. П. Костюченко, Е. Р. Гагинская, Д. Ю. Власов, В. И. Ефремов</i>	311
--	-----

Contents

Vol. 53, No. 4, 2022

REVIEWS

The Role of the Basal Ganglia in the Development and Organization of Vocal Behavior in Songbirds <i>N. Yu. Ivlieva</i>	241
Genetic Regulation of Morphogenesis of <i>Drosophila melanogaster</i> Mechanoreceptors <i>D. P. Furman and T. A. Bukharina</i>	250
Astrocytes of the Brain—Retinue Plays the King <i>M. A. Aleksandrova and K. K. Sukhinich</i>	265
CRISPR/Cas: History and Perspectives <i>A. A. Shmakova, O. P. Shmakova, A. A. Karpukhina, and Y. S. Vassetzky</i>	287

RESEARCH PAPERS

Connection between the Central and Peripheral Nervous System. The Role of Microglia <i>E. A. Kolos and D. E. Korzhevskii</i>	301
---	-----

MILESTONES

Archil K. Dondua (1929–2021) <i>R. P. Kostyuchenko, E. R. Gaginskaya, D. Y. Vlasov, and V. I. Efremov</i>	311
--	-----

УДК 612.821.6+57.017.64

РОЛЬ БАЗАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ В РАЗВИТИИ И ОРГАНИЗАЦИИ ВОКАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ ПЕВЧИХ ПТИЦ

© 2022 г. Н. Ю. Ивлиева*

ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, ул. Бутлерова, 5А, Москва, 117485 Россия

*e-mail: nivlieva@mail.ru

Поступила в редакцию 15.01.2022 г.

После доработки 11.03.2022 г.

Принята к публикации 26.03.2022 г.

Базальные ганглии играют важную роль в развитии двигательного поведения, однако, механизмы и специфика их участия в процессах научения и организации движения не ясны, особенно противоречивы представления о роли дофаминергической модуляции базальных ганглиев. Поведенческая модель научения пению у певчих птиц бесценна для прояснения многих ключевых вопросов по этим проблемам. Рассмотренные в обзоре данные позволяют предположить, что активный генератор варибельности встроен в конструкцию базальных ганглиев для обеспечения адаптивного уровня стабильности поведения.

Ключевые слова: научение, развитие, певчие птицы, вокальное поведение, движение, варибельность, базальные ганглии, область X, дофамин, вентральная область покрышки среднего мозга

DOI: 10.31857/S0475145022040048

ВВЕДЕНИЕ

Роль базальных ганглиев (БГ) в организации двигательной функции давно является предметом непрерывных дискуссий и до сих пор не прояснена. Основная проблема состоит в определении механизмов участия БГ в обеспечении движения и в двигательном научении. Еще более остро стоит вопрос о функциональной роли дофамина в БГ, в первую очередь в стриатуме, так как возможности участия в ключевых процессах, в которые критически вовлечен дофамин, нередко представляются взаимоисключающими (Wise, 2013; Майоров, 2018; Wise, McDevit, 2018; Coddington, Dudman, 2019; Woolley, 2019; Ивлиева, 2021).

Определенные уникальные особенности делают певчих птиц очень ценным объектом для изучения физиологии двигательного научения. В первую очередь, пение — это экологически значимый и хорошо поддающийся количественной оценке сложный двигательный навык, который, будучи сформированным в критический период созревания, у взрослых птиц отличается стабильностью, но при этом может направленно изменяться в результате научения. Эта поведенческая модель, помимо прочего, позволяет исследовать проблемы формирования, реализации и модификации двигательных последовательностей, а также механизмов генерации двигательной варибельности. Ключевые свойства и аспекты развития пения имеют много параллелей с человеческой

речью (Aamodt et al., 2020; Tuack, 2020). Несмотря на то, что пение и речь формировались в эволюции независимо, выявляется высокая степень конвергенции генетических и физиологических механизмов обеспечения этих функций (Pfenning et al., 2014; Aamodt et al., 2020). Структурная организация переднего мозга птиц существенно отличается от организации переднего мозга млекопитающих, однако между ними существует значительная нейроанатомическая гомология, хорошо прослеживающаяся в строении БГ (Reiner et al., 2004; Jarvis et al., 2005; Pfenning et al., 2014). Особым преимуществом использования певчих птиц для изучения механизмов двигательного научения является наличие в их переднем мозге и таламусе специфических для пения, анатомически обособленных ядер; подобных образований нет в мозге птиц с неразвитой способностью к пению (Jarvis, 2004; Pfenning et al., 2014). И наконец, благодаря сенсорной обратной связи в отдельных коротких элементах звуковой последовательности песни посредством процессов научения могут происходить направленные адаптивные изменения определенных легко измеряемых звуковых параметров (например, частоты звука) (Tumer, Brainard, 2007), что служит бесценной поведенческой моделью, позволяющей подступиться к изучению физиологии точечных направленных модификаций отдельных элементов двигательной последовательности и

открывающей возможность исследования механизмов “внутреннего” подкрепления.

РАЗВИТИЕ ПЕСНИ У МОЛОДЫХ ПТИЦ

Певческое поведение, подобно речи людей, не является врожденным, но в определенном виде оно возникает спонтанно и постепенно модифицируется в результате научения. Как и при других формах двигательного научения, молодые певчие птицы демонстрируют изменчивость подпесни (subsongs), которая постепенно уменьшается в результате вокальной практики, подобной лепету младенцев (Tuask, 2020). Молодые птицы запоминают песню взрослого “наставника” (чаще отца) на раннем этапе развития (в период сенсорного научения). Молодые зебровые амадины сначала начинают исполнять простую песню, состоящую из однообразных звуков разной длительности, затем в последовательности звуков появляется стереотипный слог (“протослог”) длительностью около 100 мс. И в последующем новые слоги возникают в результате дифференциации этого “протослога” на несколько типов слогов, пока песня не кристаллизуется во взрослую песню, состоящую из 3–7 различных слогов (Tchernichovski et al., 2001; Aronov et al., 2008). Птицы постепенно “уточняют” свои изначально вариативные подпесни в соответствии с песней-образцом в течение критического периода сенсомоторного научения. Став взрослыми, они воспроизводят относительно стереотипную по акустической структуре и последовательности песню — практически точную имитацию песни своего “наставника”.

МОДИФИКАЦИЯ ЭЛЕМЕНТОВ ВОКАЛЬНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ У ВЗРОСЛЫХ ПТИЦ

Песня взрослых бенгальских вьюрков и некоторых родственных им видов состоит из относительно постоянной последовательности “слогов” длиной 30–100 мс, каждый из которых характеризуется выраженной стереотипной акустической структурой. Важно отметить, что такая стереотипия поддерживается за счет активного процесса, зависящего от обратной связи (Brainard, Doupe, 2000).

При этом и у взрослых птиц сохраняются определенные возможности модификации песни. Очень красивая модель обучения взрослых бенгальских вьюрков была предложена Тьюмером и Брайнардом (2007), в ней птиц обучают с негативным подкреплением, когда при исполнении конкретного заранее предопределенного слога в зависимости от взятой птицей основной частоты (или в соответствие с иной закономерностью в других вариантах методики) экспериментатором

подается обратная связь в виде короткого (в пределах 100 мс, что сопоставимо с длительностью слога) шумового импульса (само по себе это воздействие является нейтральным для птицы, но возникая по ходу песни, оно оказывается аверсивным) (Tumer, Brainard, 2007). Такое обучение вызывает адаптивное изменение основной частоты в направлении, которое снижает воздействие шума: например, если шум подается в связи с исполнением слога с основной частотой ниже порога, заданного в эксперименте, то птица именно этот и только этот слог начинает чаще исполнять с более высокой частотой. Эти изменения развиваются в течение нескольких часов обучения. К этой поведенческой модели мы еще вернемся.

ОБЛАСТЬ X – ЦЕНТРАЛЬНОЕ ЗВЕНО БГ ПЕВЧИХ ПТИЦ, ОТВЕТСТВЕННОЕ ЗА ФОРМИРОВАНИЕ И ПОДДЕРЖАНИЕ ВОКАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ

Анализ типов клеток, особенностей связей и генетической экспрессии в нейронах позволяет заключить, что система, отвечающая за пение у птиц, представлена структурами, гомологичными образованиям переднего и промежуточного мозга млекопитающих, что справедливо и для дофаминергических входов (в эти структуры) из среднего мозга (Reiner et al., 2004; Jarvis et al., 2005; Pfenning et al., 2014). В свою очередь базальные ганглии — эволюционно консервативный модуль структур переднего мозга, сохраняющий общие черты строения от ланцетника до человека (Grillner, Robertson, 2016). Критичным для пения образованием БГ птиц является так называемая область X (area X), содержащая в себе элементы стриатума, паллидума и, возможно, субталамического ядра (Perkel et al., 2002; Reiner et al., 2004). Эта область присутствует только у певчих птиц и представляет собой одно из ключевых звеньев среди специализированных для пения мозговых образований. Образования эти включают в себя слуховые области и два двигательных пути: один — задний — непосредственно связывает высший вокальный центр (HVC, аббревиатура используется как имя собственное) с исполнительным двигательным регионом (robust nucleus of the arcopallium (RA)); другой — переднемозговой путь (anterior forebrain pathway (AFP)) — также связывает HVC с RA, но не напрямую: он образован входами из HVC в область X, которая в свою очередь проецируется в вентральный паллидум (Chen et al., 2019) и в медиальную часть дорзолатерального таламуса, DLM (dorsolateral thalamus medial part; nucleus dorsolateralis anterior, pars medialis (Reiner et al., 2004)), а нейроны этого ядра свои аксоны направляют к латеральному магноцеллюлярному ядру нидопаллиума (LMAN, lateral magnocellular nucleus of the anterior nidopallium), которое проецируется

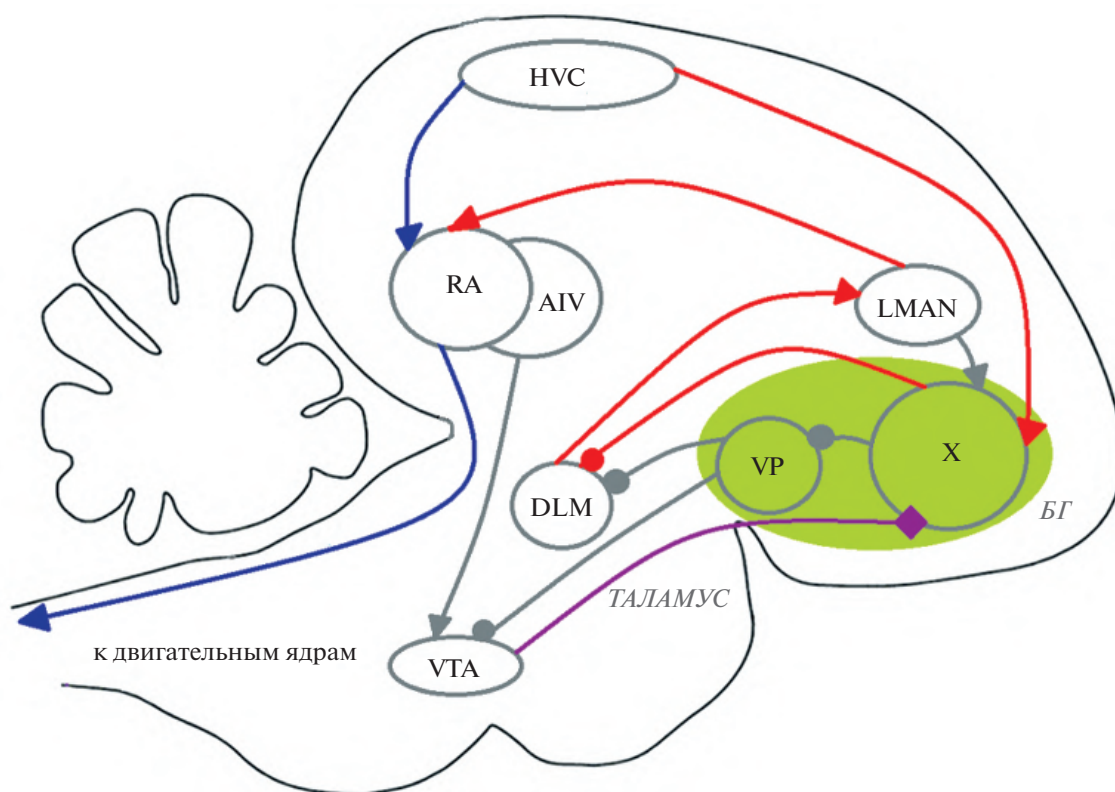


Рис. 1. Схема мозговых структур, контролирующих вокальное поведение певчих птиц. Область базальных ганглиев обозначена салатовым цветом. Структуры делятся на два пути: задний и передний. Задний путь (синие стрелки) напрямую связывает HVC (аббревиатура используется как имя собственное) и RA (robust nucleus of the arcopallium), которое непосредственно связано с мотонейронами ствола мозга. Передний путь (anterior forebrain pathway (AFP), основные связи показаны красным) образован входами из HVC в область X, которая проецируется в вентральный паллидум (VP) и в таламическое ядро DLM (dorsolateral thalamus medial part), а нейроны DLM проецируются к латеральному магнотеллюлярному ядру нидопаллиума LMAN (lateral magnocellular nucleus of the nidopallium). Область X получает входы от HVC, от LMAN и от дофаминергических нейронов среднего мозга (на схеме — VTA), которые получают входы из слуховых областей и из вентрального паллидума (VP). Глутаматергические проекции обозначены стрелками, ГАМК-ергические — кружками, проекции от VTA к области X — дофаминергические.

как обратно в область X, так и в исполнительный RA (Jarvis, 2004) (рис. 1). Как и стриатум млекопитающих, область X получает входы от дофаминергических нейронов среднего мозга, расположенных в компактной части черного вещества (SNc, substantia nigra pars compacta) и в вентральной области покрышки (VTA, Ventral tegmental area) (Person et al., 2008), эти входы более многочисленны по сравнению с остальной частью БГ птиц (Bottjer, 1993).

Задний двигательный путь аналогичен премоторной и первичной моторной коре у млекопитающих и достаточен для исполнения хорошо усвоенных элементов песни, а переднемозговой путь (AFP) необходим для научения пению в период созревания (Kao et al., 2005; Aronov et al., 2008; Hisey et al., 2018; Sánchez-Valpuesta et al., 2019) и модификации песен у взрослых птиц (Andalman, Fee, 2009; Mooney, 2009; Hoffmann et al., 2016; Tanaka et al., 2016). Предполагается, что эти про-

цессы научения происходят с участием пластических изменений в глутаматергических синапсах на проекционных нейронах области X (Woolley, 2019). В подтверждение этого Динг и Перкель продемонстрировали возникновение длительной потенциации возбуждающих входов к проекционным нейронам области X в условиях сочетания стимуляции пресинаптических окончаний и деполяризации шипикового нейрона в присутствии дофамина (Ding, Perkel, 2004). Также показано, что молекулярные маркеры синаптической пластичности в нейронах области X различаются в зависимости от социального контекста, в котором происходит пение (So et al., 2019; So, Miller, 2021).

Было показано, что у взрослых птиц область X в большей степени отвечает за научение спектральным аспектам при пении, но не участвует в модификации временной структуры исполняемой звуковой последовательности (Ali et al., 2013).

В то же время Танака с коллегами обнаружили, что локальное генетическое повреждение в области Х у взрослых птиц (посредством индуцированной вирусом аберрантной генетической экспрессии аналогичной той, что приводит к развитию хорей Гентингтона) вызывало специфический дефицит вокализации: птицы пели чаще и продолжительнее и в их песне дестабилизировалась последовательность слогов, но отдельные слоги не менялись (Tanaka et al., 2016). Эти изменения вокализации сопровождалась избирательной потерей среднешипиковых нейронов в области Х и заметным сокращением числа тормозных синапсов на паллидарных нейронах, при этом обратимой деактивации LMAN было достаточно для восстановления нормального вокального поведения. Интересно, что при блокаде выходных влияний из переднемозгового пути (AFP) в период научения в песне полностью отсутствуют признаки модификации частоты, но снятие блока без дополнительного обучения приводит к резкому изменению частоты исполнения модифицируемого колена в соответствующем обучению направлении (Charlesworth et al., 2012). Таким образом, навык может точно модифицироваться с участием БГ, которые могут отслеживать результаты поведенческих вариаций, производимых другими областями мозга, а затем направлять эти области мозга для реализации более успешного поведения; и вероятно, БГ “научаются” сами, но не обучают другие структуры, а “навязывают” им усвоенные изменения.

ПРОБЛЕМА ГЕНЕРАЦИИ ВАРИАбельНОСТИ. ЗНАЧЕНИЕ ВАРИАбельНОСТИ ДЛЯ НАУЧЕНИЯ. РОЛЬ ОБЛАСТИ Х

Хотя определенный диапазон поведенческой изменчивости представляется необходимым для многих видов нового двигательного научения, в литературе моторная вариабельность часто рассматривается как неотъемлемое нежелательное свойство, определяемое конструкцией системы и требующее специальных затрат/механизмов для его минимизации (Renart, Machens, 2014; Dhawale et al., 2017; James et al., 2018). В отношении ниже лежащих отделов двигательной системы такой взгляд на изменчивость разделяется многими (Dhawale et al., 2017); вопрос о том, является ли поведенческая вариабельность результатом подобных неотъемлемых свойств конструкции нервной системы на более высоких уровнях регуляции движения или же необходимо допустить существование неких активных процессов, обеспечивающих такую вариабельность, является открытым. В качестве центральных источников двигательной вариабельности в исследованиях на млекопитающих особого внимания заслуживают различные области коры (Heston et al., 2018;

Churchland et al., 2006), причем не обязательно двигательные области (Naar et al., 2017), так что БГ в силу организации связей получают существенно варьирующий сигнал уже на входе. Однако есть основания считать, что БГ являются самостоятельным источником вариабельности.

В явном виде этот вопрос ставится именно в исследованиях на певчих птицах. Было показано, что разрушение LMAN или блокирование исходящих из него проекций почти полностью устраняет небольшие колебания частоты в каждом отдельном колена песни, а также одновременно и варьирование спайковой активности в исполнительном двигательном ядре, получающем проекции из LMAN (Kao et al., 2005; Ölveczky et al., 2005, 2011). Это позволило авторам говорить об “инъекции” изменчивости со стороны стриато-паллидарной системы в центральные моторные механизмы организации пения. Такая изменчивость играет роль при научении песне у молодых птиц, а также в адаптивных точечных модификациях исполнения отдельных колена у взрослых птиц (Tumer, Brainard, 2007; Dhawale et al., 2017). В пользу участия БГ в генерации изменчивости, необходимой для научения, свидетельствует и тот факт, что именно они играют ключевую роль на стадии интенсивного освоения пения молодыми птицами (аналогичной стадии лепета у младенцев) (Aronov et al., 2008). Установлена определенная роль дофаминергической трансмиссии в регуляции уровня вариабельности: в частности, показано, что в присутствии самки поющий самец демонстрирует более стереотипную песню и эта модуляция происходит с участием дофамина (Sasaki et al., 2006); было выявлено, что ключевую роль здесь играют D1-рецепторы (Leblois et al., 2010), экспрессия которых связана с FoxP2 (Murugan et al., 2013). Также получены свидетельства существования очень интересного механизма, в котором под влиянием дофамина в паллидарных нейронах области Х (area X) повышается вероятность возникновения спаренных возбuditельно-тормозных изменений мембранного потенциала, которые обеспечивают более стабильную импульсацию выходных нейронов БГ и в соответствие с этим меньшую моторную вариабельность (Budzillo et al., 2017).

Здесь важно упомянуть одно не вполне очевидное преимущество активно поддерживаемой изменчивости в двигательной системе — она может способствовать большей стабильности моторных актов (Бернштейн, 1947), и Даффи с соавторами с помощью математического моделирования показали (Duffy et al., 2019), что варьирование паттерна активности премоторного ядра (высшего вокального центра, HVC) улучшает поддержание стереотипного певческого поведения птиц. В свете таких возможностей достаточно определенный вывод, сделанный Хестоном с коллегами, о том,

что активность БГ в противовес корковой активности обеспечивает стабильность песни (Heston et al., 2018), представляется скорее проблемой, чем решением. Такие взаимосвязи представляют дополнительный интерес в контексте взглядов Бернштейна на формирование навыка через “обыгрывание вариантов задачи” (Бернштейн, 1947: “чем полнее и надежнее освоен двигательный навык, тем шире круг вариантов и осложненных задачи, которые не приводят к дезориентации и деавтоматизации”).

ДОФАМИНЕРГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ ПЕВЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ

Как уже упоминалось, область Х является важной мишенью для дофаминергических нейронов среднего мозга, проекции в нее направляет, главным образом, VTA, а также SNpc (Person et al., 2008). Подкрепление и инициация движения — основные функции, с которыми тесно связана активность ДЕ-нейронов среднего мозга, главной мишенью которых являются БГ. Однако критическое участие одного и того же мозгового субстрата в процессах подкрепления и мотивации к выполнению действия является парадоксальным (Wise, 2013); в частности, Вайз и МакДевит пишут: “Мы разделяем два мотивационных эффекта стимуляции: один связан с состоянием (ума) животного до того, как оно получит вознаграждение, а другой — с состоянием после того, как вознаграждение было заработано и употреблено”; и нередко возможности осуществления этих двух функций (эффектов) являются взаимоисключающими (Wise, McDevit, 2018).

Основные противоречия обнаруживаются в связи с доминирующей в настоящее время концепцией о том, что дофаминергические нейроны кодируют ошибку предсказания вознаграждения, которая в свою очередь служит обучающим сигналом в проекционных структурах (главным образом, в стриатуме) (Schultz, 2013). Эта влиятельная гипотеза получила весомую поддержку в экспериментах по классическому обусловливанию (Steinberg et al., 2013; Coddington, Dudman, 2019). Если же речь идет о действии, совершаемом животным, то в соответствие с этой гипотезой, активность ДЕ-нейронов, являясь оценочной, должна следовать за выполненным движением. Однако исследования двигательных инструментальных условных рефлексов приносят гораздо менее согласованные результаты (Coddington, Dudman, 2019; Lerner et al., 2021; Ивлиева, 2022), в частности, в них многократно показано, что активность ДЕ-системы *предшествует* движению, что свидетельствует скорее в пользу того, что дофаминергические нейроны обеспечивают выполнение движения; главным же аргументом в пользу этого является

патогенез и симптоматика паркинсонизма (Hernandez et al., 2019).

Модель научения у певчих птиц в исследованиях этой проблемы позволила получить довольно определенные ответы: в этих работах убедительно доказано именно подкрепляющее действие дофамина сигнала (Hoffmann et al., 2016; Gadagkar et al., 2016; Xiao et al., 2018; Hisey et al., 2018), причем этот короткий фазный сигнал опосредует точечные изменения единственного звена в двигательной/певческой последовательности; с другой стороны, этот сигнал особым образом интерпретируется в понятиях ошибки предсказания.

Упомянутые работы были выполнены с привлечением поведенческой модели с обратной связью, о которой упоминалось здесь ранее (Tumer, Brainard, 2007). Напомню, птиц обучали с негативным подкреплением, когда при исполнении конкретного заранее предопределенного слога экспериментатором подается обратная связь в виде короткого шумового воздействия. Было обнаружено, что в ответ на шумовую обратную связь ДЕ-нейроны реагировали короткой паузой в активности, когда же шумовой импульс во время исполнения этого слога не подавался, вместо паузы в активности нейронов фиксировалось фазное возбуждение (Gadagkar et al., 2016). Таким образом эта активность родственна тому паттерну, который в исследованиях на млекопитающих трактуется как ошибка предсказания вознаграждения, однако, особенно ценным это наблюдение делает тот факт, что продемонстрированная активность связана с движением, которое было инициировано животным, и оценивается здесь не внешнее событие как таковое, а результат предпринятого действия. Интересно, что если портящий песню стимул подавался в небольшом проценте случаев (в 20% по сравнению с 50%), то регистрировалась только тормозная реакция в ответ на шумовой импульс, а активации в отсутствие воздействия шума отсутствовала. Важно, что, хотя подобная реакция наблюдалась у небольшой доли ДЕ-клеток, но в подмножестве проецирующихся в Х-область нейронов такая реакция была присуща подавляющему большинству клеток. Также эта активность не была непосредственно связана с движением, в то время как связь с движением во время пения определялась у многих нейронов VTA. Когда же в более поздних работах исследователи имитировали такую активность ДЕ-нейронов посредством оптогенетических манипуляций, они добились изменения основной частоты в целевом слоге, аналогичного тому, что возникало в ответ на шумовое воздействие (Hisey et al., 2018; Xiao et al., 2018). При этом Хиси с коллегами подтвердили ведущую роль дофамина сигнала в этих процессах, показав, что введение D1-антагониста в область Х препятствует проявлению эффектов оптогенетической стимуляции

(Hisey et al., 2018). Также они показали, что активация D1-рецепторов в области X необходима для точного копирования песни “учителя” в процессе развития вокализации у молодых птиц. Кёрни с коллегами посредством кратковременной оптогенетической стимуляции осуществляли интерференцию синаптических входных сигналов в VTA до и после модифицируемого слога и подтвердили оценочную функцию активности ДЕ-системы, а также показали разнонаправленные влияния на нее со стороны специализированной на детекции обратной связи области слуховой коры и вентрального паллидума (Keatney et al., 2019). Вентральный паллидум, в свою очередь, также необходим для научения пению и направляет в VTA связанные с ошибкой сигналы (Chen et al., 2019).

Оказалось, что с дофаминовой модуляцией связаны и эффекты FOXP2. Так, экспериментальный “нокдаун” FOXP2 в области X одновременно вызывает повышение вариабельности песни (Murgan et al., 2013), нарушает возможность контекстно-зависимой модуляции вокальной изменчивости и снижает уровни дофаминового D1-рецептора и DA- и цАМФ-регулируемого нейронального фосфопротеина (DARPP-32), компонента в сигнальном каскаде D1-рецепторов (Aamodt et al., 2020).

Приведенные результаты вполне определенно свидетельствуют в пользу оценочной и подкрепляющей функций дофаминового сигнала, однако, и в исследованиях на певчих птицах получены данные, допускающие важную непосредственную роль медиатора в организации текущего движения.

Янагихара с коллегами на молодых самцах показали, что пик активности популяции нейронов VTA и SNc приходится на момент инициации подпесни, причем эта активность не связана с движениями головой при пении (Yanagihara et al., 2021); авторы считают, что такая активность служит триггером для начала песни. А Чен с коллегами удалось продемонстрировать, что связь активности ДЕ-нейронов среднего мозга с движениями сильно зависит от поведенческого контекста: во время пения активность некоторых нейронов тесно связана с воспроизведением отдельных слогов, а вне периода пения эти же клетки проявляют связь с определенными движениями (и при пении эта связь пропадает) (Chen et al., 2021). Подобная закономерность отмечена ими и в активности нейронов вентрального паллидума.

Мотивационная функция дофамина находится в центре исследования Кима с коллегами (Kim et al., 2021). Более того — они исследовали “внутреннюю мотивацию” и в результате показали, что подавление спонтанного ненаправленного пения (посредством выключения света в период бодрствования птиц) ведет к росту мотивации петь и эта мотивация модулируется посредством D2-рецепторов.

Таким образом, ДЕ-нейроны птиц, как и ДЕ-нейроны млекопитающих, изменяют частоту разряда как в связи с инициацией движения, так и в связи с результатами действия. Выраженность одних или других реакций в активности отдельных клеток в большой степени зависит от контекста или распределена между разными группами клеток.

Рассмотренные данные позволяют предположить, что D1-рецепторы вовлечены в сохранение и поддержание наиболее стабильного вокального паттерна, особенно точно соответствующего “образцу” в конце периода научения. D2-рецепторы, возможно, в большей степени причастны “спонтанным” исследовательским видам поведения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

БГ птиц участвуют в развитии вокального поведения у молодых певчих птиц, а также в модификации песни у взрослых птиц. Научение пению, как и большинство видов двигательного научения, требует исходного диапазона поведенческой изменчивости. Вопрос об истоках такой изменчивости в исследованиях на певчих птицах находит важные ответы: результаты большого числа исследований свидетельствуют в пользу того, что именно БГ являются активным источником такой вариабельности. В то же время БГ участвуют в адаптивной направленной модификации отдельных элементов песенной последовательности. Две эти функции формально разнонаправлены, но накопленные к настоящему моменту экспериментальные данные свидетельствуют в пользу динамического взаимодействия этих двух тенденций в процессе адаптации вокального поведения к условиям окружающей среды.

Очевидно, ключевую роль в интеграции механизмов адаптации играет ДА, что прослеживается от клеточного уровня, например, в регуляции спаренных возбuditельно-тормозных изменений мембранного потенциала (Budzillo et al., 2017) до уровня поведения организма (например, в регуляции вокальной вариабельности в зависимости от социального контекста (Sasaki et al., 2006) или в многократно показанном участии в процессах научения). Вероятно, D1-рецепторы опосредуют осуществление точных стереотипных реализаций/направленных изменений, а D2-рецепторы — пробных исследовательских вариабельных подпесен.

Хочется отметить, что такая общебиологическая дилемма изменчивости и стабильности (молекулярной структуры, макро-организации, функциональных свойств, поведения и т.д.) решается в рассмотренной нами системе чрезвычайно интересно: похоже, что активный генератор изменчивости встроен в конструкцию БГ для обеспечения адаптивного уровня стабильности поведения. Возможно, такие внедренные стохастические источ-

ники являются атрибутами всех процессов, способных к развитию.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бернштейн Н.А.* О построении движений. М.: Наука, 1947. 254 с.
- Ивлиева Н.Ю.* Роль стриатума в организации произвольного движения // Журн. высш. нерв. деят. 2021. Т. 30. № 2. С. 164–183.
<https://doi.org/10.31857/S00444677210200522021>
- Майоров В.И.* Функции дофамина в инструментальном условном рефлексе // Журн. высш. нерв. деят. 2018. Т. 68. № 4. С. 404–414.
<https://doi.org/10.1134/S0044467718040093>
- Aamodt C.M., Farias-Virgens M., White S.A.* Birdsong as a window into language origins and evolutionary neuroscience // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2020. V. 375. № 1789. P. 20190060.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0060>
- Ali F., Otchy T.M., Pehlevan C. et al.* The basal ganglia is necessary for learning spectral, but not temporal, features of birdsong // Neuron. 2013. V. 80. № 2. P. 494–506.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.049>
- Andalman A.S., Fee M.S.* A basal ganglia-forebrain circuit in the songbird biases motor output to avoid vocal errors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 30. P. 12518–12523.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0903214106>
- Aronov D., Andalman A.S., Fee M.S.* A specialized forebrain circuit for vocal babbling in the juvenile songbird // Science. 2008. V. 320. № 5876. P. 630–634.
<https://doi.org/10.1126/science.1155140>
- Bottjer S.W.* The distribution of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the brains of male and female zebra finches // J. Neurobiol. 1993. V. 24. № 1. P. 51–69.
<https://doi.org/10.1002/neu.480240105>
- Brainard M.S., Doupe A.J.* Auditory feedback in learning and maintenance of vocal behavior // Nat. Rev. Neurosci. 2000. V. 1. № 1. P. 31–40.
<https://doi.org/10.1038/35036205>
- Budzillo A., Duffy A., Miller K.E. et al.* Dopaminergic modulation of basal ganglia output through coupled excitation-inhibition // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 22. P. 5713–5718.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1611146114>
- Caveney S., Cladman W., Verellen L. et al.* Ancestry of neuronal monoamine transporters in the Metazoa // J. Experimental Biology. 2006. V. 209. P. 4858–4868.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02607>
- Charlesworth J.D., Warren T.L., Brainard M.S.* Covert skill learning in a cortical-basal ganglia circuit // Nature. 2012. V. 486. № 7402. P. 251–255.
<https://doi.org/10.1038/nature11078>
- Chen R., Puzerey P.A., Roeser A.C.* Songbird ventral pallidum sends diverse performance error signals to dopaminergic midbrain // Neuron. 2019. V. 103. № 2. P. 266–276. e4.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.04.038>
- Chen R., Gadagkar V., Roeser A.C. et al.* Movement signaling in ventral pallidum and dopaminergic midbrain is gated by behavioral state in singing birds // J. Neurophysiol. 2021. V. 125. № 6. P. 2219–2227.
<https://doi.org/10.1152/jn.00110.2021>
- Churchland M.M., Afshar A., Shenoy K.V.* A central source of movement variability // Neuron. 2006. V. 52. № 6. P. 1085–1096.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.034>
- Coddington L.T., Dudman J.T.* Learning from action: Reconsidering movement signaling in midbrain dopamine neuron activity // Neuron. 2019. V. 104. № 1. P. 63–77.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.08.036>
- Dhawale A.K., Smith M.A., Ölveczky B.P.* The role of variability in motor learning // Annu. Rev. Neurosci. 2017. V. 40. P. 479–498.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031548>
- Duffy A., Abe E., Perkel D.J. et al.* Variation in sequence dynamics improves maintenance of stereotyped behavior in an example from bird song // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. № 19. P. 9592–9597.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1815910116>
- Gadagkar V., Puzerey P.A., Chen R. et al.* Dopamine neurons encode performance error in singing birds // Science. 2016. V. 354. № 6317. P. 1278–1282.
<https://doi.org/10.1126/science.aah6837>
- Haar S., Donchin O., Dinstein I.* Individual movement variability magnitudes are explained by cortical neural variability // J. Neurosci. 2017. V. 37. № 37. P. 9076–9085.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1650-17.2017>
- Heston J.B., Simon J. 4th, Day N.F. et al.* Bidirectional scaling of vocal variability by an avian cortico-basal ganglia circuit // Physiol. Rep. 2018. V. 6. № 8. P. e13638.
<https://doi.org/10.14814/phy2.13638>
- Hoffmann L.A., Saravanan V., Wood A.N. et al.* Dopaminergic contributions to vocal learning // J. Neurosci. 2016. V. 36. № 7. P. 2176–2189.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3883-15.2016>
- James S.S., Papapavlou C., Blenkinsop A. et al.* Integrating brain and biomechanical models – a new paradigm for understanding neuro-muscular control // Front. Neurosci. 2018. V. 12. P. 39.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00039>
- Jarvis E.D.* Learned birdsong and the neurobiology of human language // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2004. V. 1016. P. 749–777.
<https://doi.org/10.1196/annals.1298.038>
- Jarvis E.D., Güntürkün O., Bruce L. et al.* Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution // Nat. Rev. Neurosci. 2005. V. 6. № 2. P. 151–159.
<https://doi.org/10.1038/nrn1606>

- Kao M.H., Doupe A.J., Brainard M.S. Contributions of an avian basal ganglia-forebrain circuit to real-time modulation of song // *Nature*. 2005. V. 433. № 7026. P. 638–643.
<https://doi.org/10.1038/nature03127>
- Kearney M.G., Warren T.L., Hisey E. et al. Discrete evaluative and premotor circuits enable vocal learning in songbirds // *Neuron*. 2019. V. 104. № 3. P. 559–575. e6.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.025>
- Kim Y., Kwon S., Rajan R. et al. Intrinsic motivation for singing in songbirds is enhanced by temporary singing suppression and regulated by dopamine // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. 20350.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-99456-w>
- Leblois A., Wendel B.J., Perkel D.J. Striatal dopamine modulates basal ganglia output and regulates social context-dependent behavioral variability through D1 receptors // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. P. 5730–5743.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5974-09.2010>
- Lerner T.N., Holloway A.L., Seiler J.L. Dopamine, updated: reward prediction error and beyond // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2021. V. 67. P. 123–130.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.10.012>
- Mooney R. Neural mechanisms for learned birdsong // *Learn Mem.* 2009. V. 16. № 11. P. 655–669.
<https://doi.org/10.1101/lm.1065209>
- Murugan M., Harward S., Scharff C. et al. Diminished FoxP2 levels affect dopaminergic modulation of corticostriatal signaling important to song variability // *Neuron*. 2013. V. 80. P. 1464–1476.
- Ölveczky B.P., Otchy T.M., Goldberg J.H. et al. Changes in the neural control of a complex motor sequence during learning // *J. Neurophysiol.* 2011. V. 106. № 1. P. 386–397.
<https://doi.org/10.1152/jn.00018.2011>
- Ölveczky B.P., Andalman A.S., Fee M.S. Vocal experimentation in the juvenile songbird requires a basal ganglia circuit // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. № 5. P. e153.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030153>
- Perkel D.J., Farries M.A., Luo M. et al. Electrophysiological analysis of a songbird basal ganglia circuit essential for vocal plasticity // *Brain Res. Bull.* 2002. V. 57. № 3–4. P. 529–532.
[https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00690-6](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00690-6)
- Person A.L., Gale S.D., Farries M.A., Perkel D.J. Organization of the songbird basal ganglia, including area X // *J. Comp. Neurol.* 2008. V. 508. P. 840–866.
<https://doi.org/10.1002/cne.21699>
- Reiner A., Perkel D.J., Bruce L.L. et al. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei // *J. Comp. Neurol.* 2004. V. 473. № 3. P. 377–414.
<https://doi.org/10.1002/cne.20118>
- Renart A., Machens C.K. Variability in neural activity and behavior // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2014. V. 25. P. 211–220.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.02.013>
- Sánchez-Valpuesta M., Suzuki Y., Shibata Y. et al. Cortico-basal ganglia projecting neurons are required for juvenile vocal learning but not for adult vocal plasticity in songbirds // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019. V. 116. № 45. P. 22833–22843.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1913575116>
- Sasaki A., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R. et al. Social context-dependent singing-regulated dopamine // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 35. P. 9010–9014.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1335-06.2006>
- Schultz W. Updating dopamine reward signals // *Current Opinion in Neurobiology*. 2013. V. 23. № 2. P. 229–238.
- So L.Y., Munger S.J., Miller J.E. Social context-dependent singing alters molecular markers of dopaminergic and glutamatergic signaling in finch basal ganglia Area X // *Behav Brain Res.* 2019. V. 360. P. 103–112.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.12.004>
- So L.Y., Miller J.E. Social context-dependent singing alters molecular markers of synaptic plasticity signaling in finch basal ganglia Area X // *Behav. Brain Res.* 2021. V. 398. P. 112955.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112955>
- Steinberg E.E., Keiflin R., Boivin J.R. et al. A causal link between prediction errors, dopamine neurons and learning // *Nature Neuroscience*. 2013. V. 16. № 7. P. 966–973.
<https://doi.org/10.1038/nn.3413>
- Tanaka M., Singh Alvarado J., Murugan M. et al. Focal expression of mutant huntingtin in the songbird basal ganglia disrupts cortico-basal ganglia networks and vocal sequences // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. E1720–E1727.
- Tchernichovski O., Mitra P.P., Lints T. et al. Dynamics of the vocal imitation process: how a zebra finch learns its song // *Science*. 2001. V. 291. № 5513. P. 2564–2569.
<https://doi.org/10.1126/science.1058522>
- Tumer E.C., Brainard M.S. Performance variability enables adaptive plasticity of “crystallized” adult birdsong // *Nature*. 2007. V. 450. № 7173. P. 1240–1244.
<https://doi.org/10.1038/nature06390>
- Tyack P.L. A taxonomy for vocal learning // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2020. V. 375. № 1789. 20180406.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0406>
- Wise R.A. Dual roles of dopamine in food and drug seeking: the drive-reward paradox // *Biological Psychiatry*. 2013. V. 73. № 9. P. 819–826. Doi pii: S0006-3223(12)00772-X.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.09.001>
- Wise R.A., McDevit R.A. Drive and reinforcement circuitry in the brain: origins, neurotransmitters, and projection fields // *Neuropsychopharmacology*. 2018. V. 43. № 4. P. 680–689.
<https://doi.org/10.1038/npp.2017.228>
- Woolley S.C. Dopaminergic regulation of vocal-motor plasticity and performance // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2019. V. 54. P. 127–133.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.10.008>
- Xiao L., Chattree G., Oscos F.G. et al. A basal ganglia circuit sufficient to guide birdsong learning // *Neuron*. 2018. V. 98. № 1. P. 208–221. e5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.020>
- Yanagihara S., Ikebuchi M., Mori C. et al. Neural correlates of vocal initiation in the VTA/SNC of juvenile male zebra finches // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 22388.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-01955-3>

The Role of the Basal Ganglia in the Development and Organization of Vocal Behavior in Songbirds

N. Yu. Ivlieva*

*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences,
ul. Butlerova 5a, Moscow, 117485 Russia*

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

The basal ganglia play an important role in the development of motor behavior, however, the mechanisms and specifics of their role in the processes of learning and movement organization are not clear, and hypothesis about the computations of dopaminergic modulation of the basal ganglia are especially controversial. The behavioral model of song learning in songbirds is invaluable in clarifying many of the key questions about these issues. The data reviewed in this paper suggest that an active variability generator is built into the structure of the basal ganglia to provide an adaptive level of behavioral stability.

Keywords: learning, development, songbirds, vocal behavior, movement, variability, basal ganglia, area X, dopamine, ventral tegmental area

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА МЕХАНОРЕЦЕПТОРОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2022 г. Д. П. Фурман^{a, b, *}, Т. А. Бухарина^{a, b, **}

^aФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН” (ИЦиГ СО РАН),
просп. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

^bНовосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: furman@bionet.nsc.ru

**e-mail: bukharina@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 14.03.2022 г.

После доработки 11.04.2022 г.

Принята к публикации 17.04.2022 г.

Механорецепторы дрозофилы (щетинки), представленные макро- и микрохетами, расположены на теле насекомого упорядоченным образом и являются результатом детерминированной конверсии эктодермальных клеток имагинальных дисков в прогениторные нейральные клетки с последующей дифференцировкой производных этих клеток в компоненты механорецептора, состоящего из двух поверхностных кутикулярных структур — щетинки с цоколем и двух подлежащих нейральных компонентов — нейрона и клетки глии. Морфогенез механорецепторов проходит три сменяющих друг друга стадии: 1) сегрегация от массы эктодермальных клеток доменов, потенциально компетентных к нейральному пути развития — пронеиральных кластеров (ПК); 2) обособление в пронеиральном кластере родительской клетки механорецептора (РКМ) и 3) три асимметричных деления, которым подвергается РКМ и ее клетки-потомки со специализацией дочерних клеток последнего поколения в компоненты дефинитивного сенсорного органа. Формирование щетиночного рисунка упорядочено в пространстве и времени. Пространственная детерминация обусловлена позиционированием родительских клеток, а временная связана с двумя событиями синхронизации — завершением выделения РКМ для всех механорецепторов к 1–10-му часу после формирования пупария и ограничением по времени их вступления в первый асимметричный митоз. Проведенная нами реконструкция и анализ молекулярно-генетической системы, обеспечивающей перечисленные события морфогенеза отдельного механорецептора (и щетиночного узора в целом), выявила ее иерархическую организацию. Элементы системы группируются в три модуля, соответствующие стадиям морфогенеза сенсорного органа — генные сети “Neurogenesis: prepattern”, “Neurogenesis: determination” и “Neurogenesis: asymmetric division”. Функционирование системы последовательно ограничивает число клеток, компетентных к нейральному развитию, сначала до десятков на уровне кластеров, а затем до единственной родительской клетки в пределах кластера. Главным атрибутом и связующим звеном сетей является комплекс пронеиральных генов *achaete-scute* (*AS-C*), функционирование которого на этапе выделения РКМ контролируется центральным регуляторным контуром (ЦРК). Анализ функционирования ЦРК выявил две фазы его активности, различающиеся временами действия и композицией элементов. Кардинальное отличие второй фазы состоит в изменении содержания белка Phyl, отвечающего за деградацию пронеиральных белков ASC. В обзоре кратко охарактеризованы основные этапы морфогенеза механорецепторов, состав и взаимосвязи поддерживающих их генных сетей, а также рассмотрены меж- и внутриклеточные механизмы сегрегации РКМ.

Ключевые слова: дрозофила, механорецепторы, комплекс генов *achaete-scute*, генные сети, центральный регуляторный контур

DOI: 10.31857/S0475145022040036

ВВЕДЕНИЕ

Механорецепторы дрозофилы представлены макро- и микрохетами (щетинками), и их расположение на теле насекомого фиксировано: так, тринадцать пар макрохет торакса образуют т.н. щетиночный рисунок, в котором каждая из них

занимает строго определенную позицию и имеет приписанное название, тогда как микрохеты числом более 200 организованы в ряды, выровненные параллельно оси тела, но ни их количество, ни положение в рядах строго не фиксировано. Закономерности формирования механорецепторов

обоих типов сходны, хотя временные характеристики их морфогенеза несколько различаются. Каждый сенсорный орган состоит из группы специализированных элементов: двух кутикулярных, воспринимающих внешний раздражитель — собственно щетинки и цоколя вокруг ее основания, видимых на поверхности тела мухи, и двух подлежащих нейтральных составляющих — клетки нейрона и клетки глии (Hartenstein, Posakony, 1989; Simpson, 1990; Cubas et al., 1991; Huang et al., 1991; Usui, Kimura, 1993; Simpson et al., 1999; Calleja et al., 2002; Renaud, Simpson, 2002; Lai, Orgogozo, 2004; Hartenstein, 2005; Usui-Ishihara, Simpson, 2005; Corson et al., 2017).

В общих чертах развитие отдельной щетинки и становление щетиночного рисунка в целом можно представить следующим образом (Hartenstein, 2005; Furman, Bukharina, 2008a, 2008b, 2012, 2015; Bukharina, Furman, 2015).

Прежде всего в эктодерме крыловых имагинальных дисков, состоящих из 50–60 тыс. клеток, закладывается прообраз (предструктура) щетиночного рисунка в виде пронеуральных кластеров из 20–40 клеток, потенциально способных к дифференцировке в нейтральном направлении (Stern, 1954; Simpson, 1996; Calleja et al., 2002; Reeves, Posakony, 2005; Pi, Chien, 2007; Usui et al., 2008).

Далее в пределах кластеров определяется клетка, призванная дать начало сенсорному органу — родительская клетка механорецептора (РКМ). Обычно она локализуется в центре кластера, хотя это правило может нарушаться (Cubas et al., 1991). Выделение РКМ контролируется посредством вне- и внутриклеточных механизмов. Именно от позиций родительских клеток в эктодерме имагинальных дисков зависит расположение механорецепторов на теле имаго, так что их сегрегация является определяющей стадией развития механорецептора (Ghysen, Dambly-Chaudiere, 1989; Nègre et al., 2003; Corson et al., 2017). Процесс детерминации родительских клеток подвержен временному контролю: несмотря на то, что РКМ для макрохет различной локализации появляются не одновременно, и их совокупное позиционирование занимает до 40 ч, к 1–10-му часу после формирования пупария будущий щетиночный рисунок полностью укомплектован всеми составляющими компонентами (Cubas et al., 1991; Huang et al., 1991; Usui, Kimura, 1993).

Цепь морфогенетических событий завершается тремя асимметричными делениями РКМ и дочерних клеток с последующей специализацией потомков последнего деления в упомянутые выше составляющие дефинитивного сенсорного органа (Roegiers et al., 2001; Roegiers, Jan, 2004; Pi, Chien, 2007; Schweisguth, 2015).

Формирование отдельного механорецептора и щетиночного рисунка в целом обеспечивается молекулярно-генетической системой, которая может быть представлена в виде трех генных сетей, соответствующих основным этапам морфогенеза элементов периферической нервной системы дрософилы: формированию пронеуральных кластеров, выделению РКМ и ее делению.

В обзоре дается характеристика генных сетей, поддерживающих последовательные этапы формирования внешних сенсорных органов дрософилы, и рассматриваются механизмы выделения РКМ.

ГЕННЫЕ СЕТИ МОРФОГЕНЕЗА МЕХАНОРЕЦЕПТОРОВ

На основе анализа и систематизации экспериментальных данных, экстрагированных из литературных источников, и с использованием технологии GeneNet (Ananko et al., 2000) нами была выполнена реконструкция молекулярно-генетической системы формирования щетиночного рисунка. Ее элементы группируются в три модуля — генные сети, соответствующие стадиям морфогенеза механорецепторов: “Neurogenesis: prepatter”, “Neurogenesis: determination” и “Neurogenesis: asymmetric division” (Furman, Bukharina, 2009; Бухарина, Фурман, 2009; Фурман, Бухарина, 2016). Сети функционируют на стадиях третьего личиночного и раннего кукольного возраста дрософилы, на которые приходится становление пространственной организации стереотипного щетиночного рисунка (рис. 1).

Генная сеть “Neurogenesis: prepatter” сформирована 89 объектами, в число которых входит 36 генов и 46 белков, объединенных 118 связями.

Действие сети обеспечивает первый этап морфогенеза механорецепторов, предопределяя топографию пронеуральных кластеров — зон инициации локальной экспрессии генов *achaete* и *scute* (комплекса *AS-C*), определяющей компетентность составляющих их клеток к нейтральному пути развития (рис. 1).

Сеть имеет несколько уровней управления и функционирует в режиме каскадной регуляции основного звена системы морфогенеза механорецепторов — комплекса *AS-C*, фокусирующего на себе действие большинства компонентов сети. Контроль его экспрессии осуществляется путем 18 прямых и 6 опосредованных регуляторных воздействий. Результат функционирования сети состоит в активации генов комплекса в клетках будущих кластеров, которая происходит при связывании с определенными элементами его регуляторной зоны ряда транскрипционных факторов: белков EGFR-сигнального пути, Pnr, Ush, Bar, Ara, Coup,

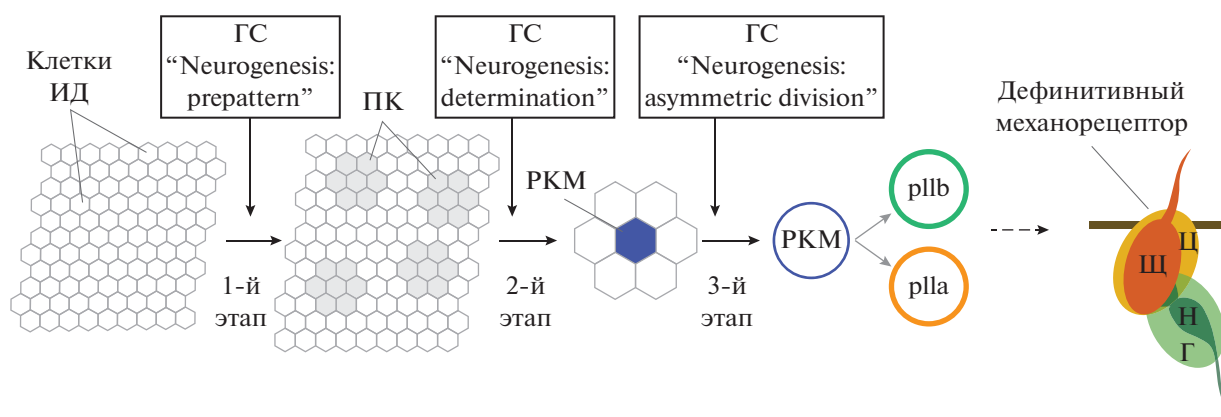


Рис. 1. Этапы морфогенеза механорецептора и поддерживающие их генные сети: 1-й этап — выделение proneйральных кластеров (Генная сеть “Neurogenesis: prepattern”), 2-й этап — обособление РКМ (Генная сеть “Neurogenesis: determination”), 3-й этап — асимметричное деление РКМ (Генная сеть “Neurogenesis: asymmetric division”). ИД — имажинальный диск; ПК — proneйральный кластер; пИа и пИб — дочерние клетки РКМ. Компоненты дефинитивного механорецептора и их позиции относительно поверхности тела (темная линия): н — нейрон, г — глиальная клетка, ц — цоколь щетинки, щ — щетинка.

Mirg и др. (подробнее см. Фурман, Бухарина, 2016; Furman, Bukharina, 2018).

Генная сеть “Neurogenesis: determination” обеспечивает важнейший второй этап развития макрохет — выделение РКМ — и является самой насыщенной по числу компонентов, что, по-видимому, отражает ее ведущее значение в общей системе морфогенеза макрохет (рис. 1). В нее входит 192 элемента, в том числе 72 гена, 95 белков и белковых комплексов, объединенных 251 связью.

Интегральный эффект сети сосредоточен на генах *achaete* и *scute* комплекса *AS-C*, экспрессия которых контролируется центральным регуляторным контуром (ЦРК), обеспечивающим определенное соотношение содержания белков ASC в клетках proneйрального кластера и РКМ (Furman, Bukharina, 2009; Bukharina et al., 2012).

Генная сеть “Neurogenesis: asymmetric division” поддерживает заключительный — третий этап морфогенеза макрохет (рис. 1). На этом этапе происходит три последовательных асимметричных митотических деления РКМ и ее дочерних клеток с последующей специализацией клеток-потомков последнего митоза в отдельные структурные компоненты механорецептора.

Сеть насчитывает 163 объекта, в том числе 55 генов, 83 белка и белковых комплекса, объединенных 158 связями (Бухарина, Фурман, 2009).

Основная роль в этой генной сети принадлежит белкам *Neur* и *Numb* — участникам Notch сигнального пути. Их неравновесное распределение в каждом раунде деления предопределяет дальнейшее направление дифференцировки дочерних клеток: только клетки, ставшие обладателями *Neur* и *Numb*, станут источниками сигнала, получают спо-

собность к нейральной специализации и в ходе формирования дефинитивного механорецептора дадут нейрон и клетку глии, тогда как клетки, лишенные их, будучи реципиентами сигнала, специализируются в щетинку и цоколь (Bardin et al., 2004; Fichelson et al., 2005; Furman, Bukharina, 2011; Giebel, Wodarz, 2012; Couturier et al., 2013; Schweisguth, 2015; Johnson et al., 2016).

Совокупность названных генных сетей образует иерархически организованную молекулярно-генетическую систему, обеспечивающую морфогенез отдельного механорецептора и щетиночного узора в целом (рис. 2). Связующим звеном сетей является комплекс proneйральных генов *AS-C* и белков ASC. Особую роль активность комплекса приобретает на этапе обособления родительских клеток механорецепторов.

Сети функционально связаны между собой (рис. 2). Переключение между сетями “Neurogenesis: prepattern” и “Neurogenesis: determination” происходит, когда в силу случайных причин в одной из клеток кластера возникает некоторое превышение содержания proneйральных белков, достаточное для запуска транскрипции *Delta* и механизма латерального ингибирования (Heitzler et al., 1996; zur Lage, Jarman, 1999).

Связь между сетями “Neurogenesis: determination” и “Neurogenesis: asymmetric division” реализуется с участием proneйральных белков ASC и их генов-мишеней *Delta* (*Dl*), *neur* и *lethal(2) giant larvae* (*lgl*). Активация экспрессии *Dl* запускает Notch-сигнальный путь и задает направление передачи сигнала. Функция белка *Neuralised* состоит в усилении способности клетки-индуктора к передаче сигнала.

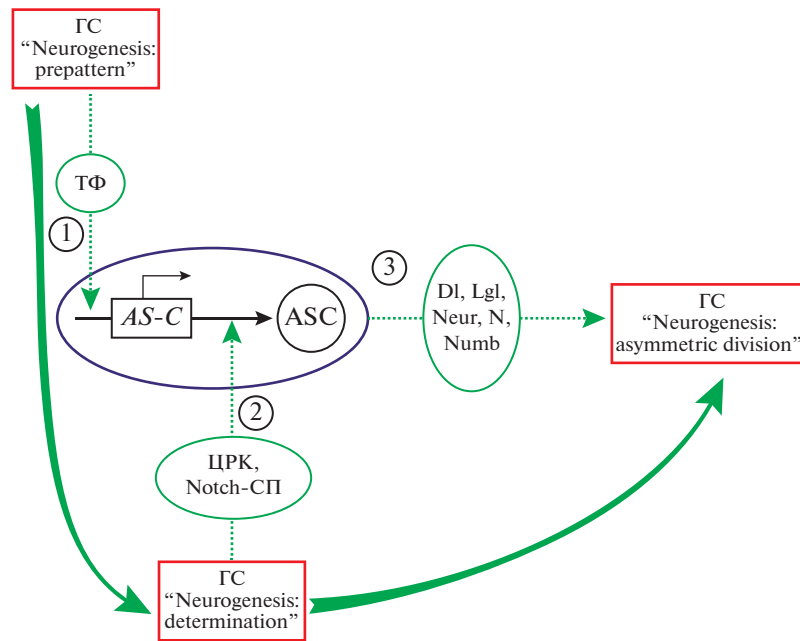


Рис. 2. Комплекс генов *AS-C* и белки *ASC* — центральное звено генных сетей, регламентирующих реализацию трех этапов формирования механорецепторов дрозофилы (цифры 1–3). ТФ — транскрипционные факторы. Пунктирными стрелками обозначены взаимодействия генных сетей с генами *AS-C* (прямоугольник) и белками *ASC* (круг). Сплошные стрелки указывают на иерархические взаимоотношения между сетями.

Белок *Lgl* определяет распределение белковых детерминант *Numb* и *Neur* в готовых к делению клетках при каждом раунде митозов. При наличии обоих этих детерминант клетки становятся источниками *Notch*-сигнала и в дальнейшем дифференцируются в нейральные компоненты механорецептора. При их отсутствии дочерние клетки становятся реципиентами сигнала и в дальнейшем дают кутикулярные структуры механорецептора (Bardin et al., 2004; Fichelson et al., 2005; Furman, Bukharina, 2011; Giebel, Wodarz, 2012; Couturier et al., 2013; Schweisguth, 2015; Johnson et al., 2016; Miller, Posakony, 2018).

Следует заметить, что сеть “Neurogenesis: determination” является самой насыщенной по числу входящих в нее генов и содержит 72 гена против 36 в сети “Neurogenesis: prepattern” и 55 в сети “Neurogenesis: asymmetric division”, что, по-видимому, отражает ее ведущее значение в общей системе морфогенеза макрохет (рис. 2).

Совокупность названных генных сетей образует иерархически организованную молекулярно-генетическую систему, обеспечивающую морфогенез как отдельного механорецептора, так и щетиночного узора в целом. Роль интегрирующего элемента для всех сетей выполняет комплекс пронеуральных генов *achaete-scute* (*AS-C*). Критически важное значение уровень пронеуральных белков, контролируемых этими генами, приобретает на этапе выделения родительской клетки меха-

норецептора. В этот период их активность контролируется центральным регуляторным контуром.

СЕГРЕГАЦИЯ РКМ — ЦЕНТРАЛЬНОЕ СОБЫТИЕ МОРФОГЕНЕЗА МЕХАНОРЕЦЕПТОРОВ

Существенной характеристикой морфогенеза механорецептора является последовательное сокращение числа клеток, компетентных к нейральному развитию. Этот процесс обеспечивается сочетанным действием как внутри-, так и межклеточных регуляторных механизмов.

На внутриклеточном уровне нейральная судьба клеток определяется количественным содержанием пронеуральных белков *Achaete* (*AC*) и *Scute* (*SC*) — транскрипционных факторов, кодируемых одноименным комплексом пронеуральных генов (*AS-C*), экспрессия которого контролируется центральным регуляторным контуром (Bukharina et al., 2012, 2016).

Изначально все клетки сформировавшегося пронеурального кластера эквипотентны относительно возможности стать РКМ. Окончательное переключение на развитие в нейральном направлении происходит при условии достижения в одной из клеток некоторого порогового уровня белков *ASC*, значительно превосходящего их содержание в клетках окружения. Клетки кластера, в которых необходимый уровень пронеуральных белков не был

достигнут, теряют свою предрасположенность к развитию по нейральному пути и разделяют судьбу эпидермальных клеток имажинального диска (Gómez-Skarmeta et al., 2003; García-Bellido, de Celis, 2009).

Именно параметр содержания белков ASC составляет кардинальное отличие родительской клетки, которое достигается как определенным режимом функционирования ЦРК, так и благодаря межклеточному эффекту латерального ингибирования, когда прогениторная клетка в процессе становления своего статуса конститутивно блокирует возможность нейральной дифференцировки соседних клеток.

Латеральное ингибирование обеспечивает Notch-сигнальный путь, опосредуемый трансмембранными белками — рецептором Notch и его лигандом Delta. Роль источника сигнала отводится клетке-носителю Delta, а роль реципиента исполняет клетка-носитель Notch (Simpson, 1990; Kunisch et al., 1994; Pi, Chien, 2007; Barad et al., 2011; Troost, 2015; Corson et al., 2017; Couturier et al., 2019; Bocci et al., 2020).

Первоначально лиганд и рецептор экспрессируются всеми клетками кластера, и вариации в экспрессии лигандов и рецепторов в соседних клетках незначительны, так что распространение сигнала не поляризовано и равновозможно для всех клеток до тех пор, пока в одной из них в результате случайных флуктуаций содержание лиганда не достигнет значений, достаточных для включения механизма латерального ингибирования. Одной из причин флуктуаций может явиться, например, более ранний синтез лиганда, вызванный, в свою очередь, повышенным уровнем пронеуральных белков, также возникшим в силу стохастичности внутриклеточных процессов.

Межклеточная передача сигнала приводит к активации в клетке-реципиенте генов комплекса *Enhancer of split (E(spl)-C*), кодирующего одноименный транскрипционный фактор — репрессор активности генов *AS-C*, что влечет подавление их экспрессии, падение содержания одноименных белков и постепенное прекращение функционирования ЦРК.

Поскольку пронеуральные белки активируют наработку Delta, в результате реципиентная клетка лишается способности индуцировать сигнал. В то же время в клетке-источнике сигнала, где ЦРК сохраняет активность, содержание белков ASC нарастает, и одновременно увеличивается содержание Delta. За счет такой положительной обратной связи достигается эффективное отклонение от начального содержания лиганда (Kunisch et al., 1994; Heitzler et al., 1996; Culi, Modolell, 1998; Usui et al., 2008; Couturier et al., 2019).

Так как направление передачи сигнала и его интенсивность определяются и количественным соотношением лиганд/активированный рецептор на мембранах соседних клеток кластера в процессе транс-взаимодействия, постоянная наработка Delta в одной из клеток шаг за шагом превращает ее в единственный источник поляризованной передачи сигнала.

Приобретению клеткой главенствующего статуса единственного индуктора сигнала может способствовать и т. н. цис-ингибирование активности рецептора, происходящее при колокализации Delta и Notch на ее мембране. При этом лиганд и рецептор, экспрессируемые в одной и той же клетке, связываются друг с другом и инактивируют передачу сигналов Notch (Yasugi, Sato, 2022). Сочетание эффектов цис- и транс-взаимодействий лигандов с рецепторами создает предпосылки для однонаправленной передачи сигнала клеткой-индуктором реципиентным клеткам окружения (Becam et al., 2010; Fiuza et al., 2010; del Álamo et al., 2011; Formosa-Jordan, Ibañes, 2014; Henrique, Schweisguth, 2019; Bocci et al., 2020).

В поляризации передачи сигнала участвует также белок Neuralised, осуществляющий убиквитинирование комплекса лиганда Dl с внеклеточным доменом Notch с последующей эвакуацией комплекса с мембраны клетки-индуктора путем эндоцитоза и освобождением места на мембране для новых молекул Dl. В прогениторной РКМ (индукторе сигнала) содержание Neur нарастает благодаря активации транскрипции одноименного гена пронеуральными белками, что интенсифицирует обновление пула лиганда на поверхности клетки-индуктора и способствует тем самым поляризации передачи сигнала (Lai et al., 2001; Le Borgne et al., 2005; Weinmaster, Fischer, 2011; Miller, Posakony, 2018).

Дополнительный стимул наработки белков ASC в прогениторной клетке создает антагонист Notch-пути — EGFR сигнальный путь, с участием лиганда Spitz запускающий авторегуляторную петлю экспрессии пронеуральных генов, что в свою очередь интенсифицирует наработку Delta и тем самым усиливает генерацию сигнала подавления способности соседних клеток к превращению в РКМ (Culi et al., 2001).

В результате создается ситуация, когда единственная клетка — индуктор сигнала — оказывается в окружении клеток, способных лишь к его восприятию. При этом в клетке стабилизируется состояние автономной экспрессии *AS-C*, при котором достигается критически необходимое содержание пронеуральных белков, позволяющее ей стать родоначальницей механорецептора, тогда как в остальных клетках кластера содержание

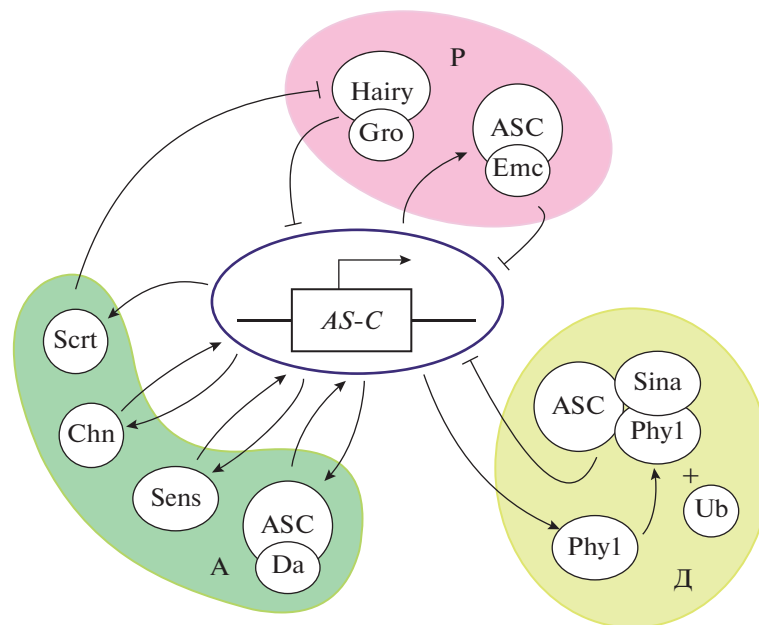


Рис. 3. Схема регуляторных взаимодействий в ЦПК генной сети “Neurogenesis: determination”, регламентирующих функциональное состояние proneйральных генов и белков. А — блок активации транскрипции *AS-C* (гетеродимер Da/ASC, Sens, Chn, Scrt); Р — блок репрессии транскрипции *AS-C* (гетеродимеры Emc/ASC и Hair/Gro); Д — блок деградации proneйральных белков (комплекс Phyl/Sina/ASC и Ub). Заостренные стрелки обозначают активирующее, а стрелки с тупыми концами — репрессорное воздействие на экспрессию генов *AS-C*.

пронейральных белков падает, и они утрачивают возможность нейрального пути дифференцировки, возвращаясь к эпидермальному статусу (Cubas et al., 1991; Martinez, Modolell, 1991; Usui, Kimura, 1992; Chang et al., 2008).

Таким образом, внутри- и межклеточные регуляторные механизмы обеспечивают оптимизацию функционирования *AS-C* как основного компонента, детерминирующего формирование механорецептора, определяя “точечную” позиционную специфичность экспрессии подконтрольных ЦПК proneйральных генов *AS-C* и тем самым топографию щетиночного рисунка.

СОСТАВ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОГО РЕГУЛЯТОРНОГО КОНТУРА

Судьбоносное событие, критически важное для морфогенеза механорецептора, состоит в выделении из proneйрального кластера родительской клетки, которое обеспечивается корректным функционированием генов *AS-C* под управлением центрального регуляторного контура, осуществляющего внутриклеточный контроль активности комплекса.

Кроме *AS-C*, в состав ЦПК входят гены *hairy*, *senseless (sens)*, *charlatan (chn)*, *scratch (scrt)*, *phyllopod (phyl)*. Гены объединены в функциональную систему прямыми и обратными связями посред-

ством белков и белковых комплексов, активирующих или репрессирующих транскрипцию генов-мишеней.

Набор белков ЦПК представлен транскрипционными факторами (ASC, Hair, Sens, Chn, Scrt), кофакторами (Daughterless — Da, Extramacrochaetae — Emc, Groucho — Gro), участниками системы протеасомной деградации белков — убиквитином (Ubiquitin — Ub) и E3 убиквитин лигазой Seven-in-absentia (Sina) и белком-адаптором для Sina — Phyllopod (Phyl) (Furman, Bukharina, 2009; Bukharina et al., 2012, 2016). Список генов и белков, составляющих ЦПК, приведен в табл. 1.

Все гены, входящие в ЦПК, служат для ASC целевыми объектами прямого действия. Единственное исключение составляет *hairy*, активность которого они репрессируют непрямым образом, иницируя экспрессию транскрипционного фактора Scrt, в свою очередь репрессирующего активность *hairy* (рис. 3).

На экспрессию собственных генов белки ASC действуют и как активаторы и как репрессоры транскрипции в зависимости от кофактора, с которым они образуют гетеродимерные регуляторно активные комплексы — Da или Emc соответственно (рис. 3).

Контур обеспечивает достижение и поддержание порогового уровня белков ASC в единственной клетке proneйрального кластера, что и определяет ее статус родительской клетки меха-

Таблица 1. Список генов и белков, входящих в ЦПК

Название гена	Источник данных	Название белка	Функция белка	Источник данных
<i>achaete (ac)</i>	FlyBase ID FBgn0000022	Achaete (Ac)	Транскрипционный фактор	UniProtKB – P10083
<i>scute (sc)</i>	FlyBase ID FBgn0004170	Scute (Sc)	Транскрипционный фактор	UniProtKB – P10084
<i>hairy (h)</i>	FlyBase ID FBgn0001168	Hairy (H)	Транскрипционный фактор	UniProtKB – P14003
<i>senseless (sens)</i>	FlyBase ID FBgn0002573	Senseless (Sens)	Транскрипционный фактор	UniProtKB – Q9N658
<i>charlatan (chn)</i>	FlyBase ID FBgn0015371	Charlatan (Chn)	Транскрипционный фактор	UniProtKB – Q7YU81
<i>scratch (sct)</i>	FlyBase ID FBgn0004880	Scratch (Sct)	Транскрипционный фактор	UniProtKB – Q7KMM2 UniProtKB – Q24140
<i>daughterless (da)</i>	FlyBase ID FBgn0267821	Daughterless (Da)	Коактиватор транскрипции <i>AS-C</i> в комплексе с ASC	UniProtKB – P11420
<i>extramacrochaetae (emc)</i>	FlyBase ID	Extramacrochaetae (Emc)	Корепрессор транскрипции <i>AS-C</i> в комплексе с ASC	UniProtKB – P18491
<i>groucho (gro)</i>	FlyBase ID FBgn0001139	Groucho (Gro)	Корепрессор транскрипции <i>AS-C</i> в комплексе с Hairy	UniProtKB – P16371
<i>ubiquitin (ub)</i>	FlyBase ID FBgn0029856	Ubiquitin (Ub)	Участник убиквитин-протеасомного пути деградации белков	UniProtKB – R9PY16
<i>seven-in-absentia (sina)</i>	FlyBase ID FBgn0003410	Seven-in-absentia (Sina)	Е3 убиквитин лигаза, участник системы протеасомной деградации белков	UniProtKB – P21461
<i>phyllopod (phyl)</i>	FlyBase ID FBgn0013725	Phyllopod (Phyl)	Адапторный компонент Е3 убиквитин-лигазного комплекса	UniProtKB – Q27934

норецептора. По-видимому, функционирование контура начинается еще на стадии формирования пронейральных кластеров, за 35–40 ч до образования пупариума, когда в клетках имажинального диска впервые отмечается экспрессия генов *AS-C*, и продолжается до первого митоза родительской клетки (Cubas et al., 1991; Skeath, Carroll, 1991).

Экспрессия генов *AS-C* и содержание белков ASC регулируется тремя блоками ЦПК разной функциональной направленности: блоком активации транскрипции *AS-C*; блоком репрессии транскрипции *AS-C* и блоком, отвечающим за деградацию белков ASC (рис. 3).

В процессе сегрегации родительской клетки механорецептора условно можно выделить две

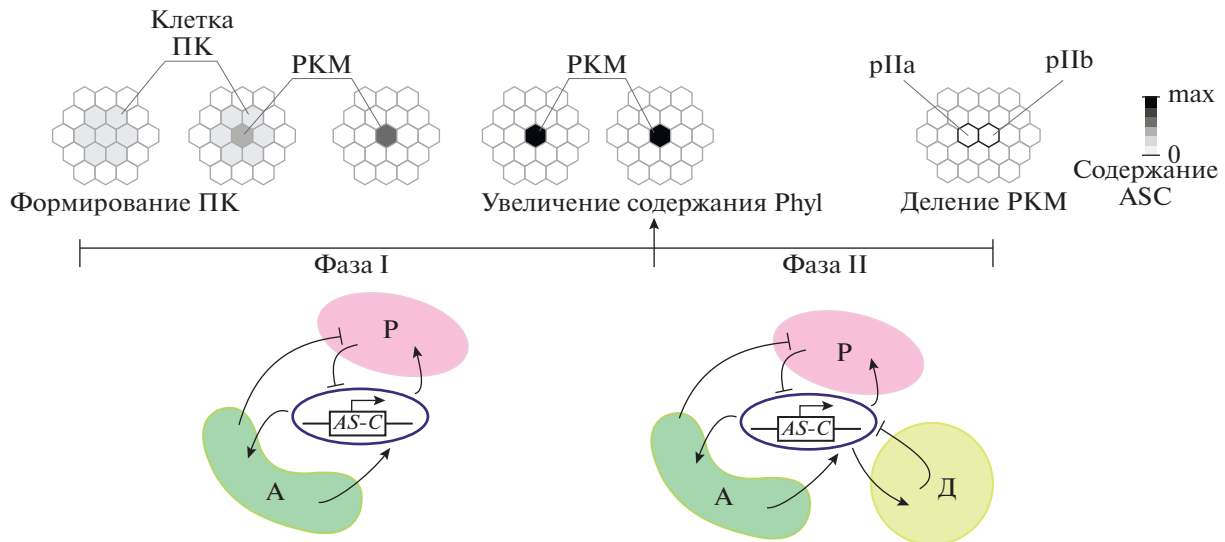


Рис. 4. Две фазы функционирования ЦРК в родительской клетке механорецептора. А — блок активации, Р — блок репрессии, Д — блок деградации. Градиентом серого обозначены относительные уровни пронеуральных белков в РКМ и клетках окружения.

фазы. Продолжительность первой соответствует периоду установления ее нейрального статуса, связанного с достижением максимального содержания пронеуральных белков, и варьирует для механорецепторов разного типа и различной локализации, составляя не менее 10-ти часов (Cubas et al., 1991; Huang et al., 1991; Pi et al., 2004; Chang et al., 2008).

В составе ЦРК в этот период функционируют только блоки активации и репрессии, причем эффект блока активации превалирует, обеспечивая увеличение содержания белков ASC до максимального значения и удержание его на этом уровне. Эффект достигается как за счет прямой активации транскрипции *AS-C* белками Sens, Chn и гетеродимерами ASC/Da, так и за счет репрессии транскрипции *hairy*, обусловленной действием Scrt (рис. 4, фаза I) (Furman, Bukharina, 2009; Bukharina et al., 2012, 2016).

Показана корреляция достигнутых пиковых значений уровня пронеуральных белков с задержкой клеточного цикла РКМ на стадии G2 (Usui, Kimura, 1992; Kimura et al., 1997; Nègre et al., 2003; Chang et al., 2008). Для перехода клетки к первому дифференцирующему делению требуется снижение их содержания, которое происходит в течение второй фазы функционирования ЦРК. Продолжительность этой фазы значительно короче, в частности при формировании микрохет она занимает 2–4 ч (Chang et al., 2008). По ее окончании белки ASC перестают детектироваться, и клетка переходит к митозу (Pi et al., 2004; Chang et al., 2008).

В это время доминирующее влияние переходит к блоку деградации пронеуральных белков (рис. 4, фаза II). Деградация белков ASC феноменологически сопряжена с адапторным белком Phyl, экспрессию которого запускают пронеуральные белки (Pi et al., 2001, 2004; Chang et al., 2008; Miller et al., 2014). Показано, что экспрессия *phyl* в клетках пронеуральных кластеров существенно выше, чем в эпидермальных клетках окружения (Reeves, Posakony, 2005), а в РКМ превышает соответствующие характеристики для клеток кластера, уже утративших к моменту обособления РКМ свою нейральную потенцию (Buffin, Gho, 2010).

Белок Phyl востребован во время двух стадий морфогенеза внешних сенсорных органов — сначала при детерминации родительской клетки, а затем в спецификации клеточной судьбы ее потомков от первого клеточного деления, будучи одной из мишеней для Notch сигнального пути. В то же время наличие этого белка предопределяет возможность перехода прогениторных клеток к первому митозу. Мутации одноименного гена проявляются нарушением формирования полноценного щетиночного рисунка (Pi et al., 2001, 2004, 2007; Chang et al., 2008).

Phyl входит в состав убиквитинизирующего комплекса Phyl/Sina. Функция комплекса состоит в реализации необходимого этапа метаболизма белков в клетке — опознавании белков, в том числе и ASC, предназначенных для деградации и утилизации в протеасомах (Pi et al., 2001; Li et al., 2002; Chang et al., 2008; Shilo, 2009). Целенаправлен-

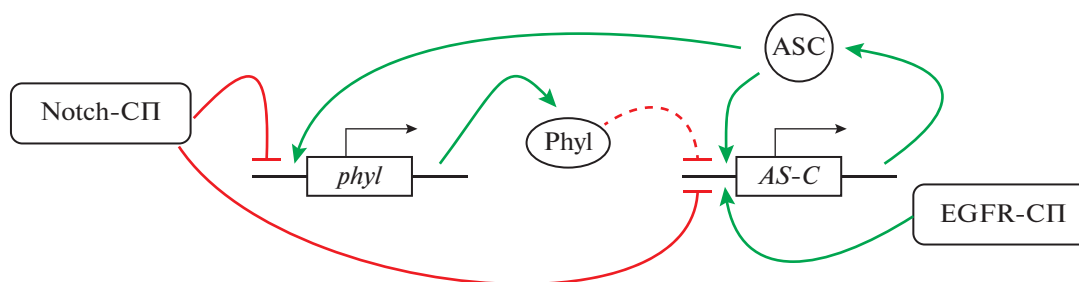


Рис. 5. Механизмы регуляции экспрессии *phyl* в РКМ механорецептора. Заостренные стрелки (↑) указывают на активирующее, а стрелки с тупыми концами (⊥) — на репрессирующее прямое (сплошная линия) и не прямое (пунктирная линия) воздействие на целевой ген.

ная деградация белков через убиквитин/ протеасомный путь является важным и широко используемым механизмом контроля динамики клеточных регуляторов, в данном случае — транскрипционных факторов, каковыми являются пронеуральные белки.

Снижение содержания белков ASC влечет ослабление влияния активаторного блока ЦРК и одновременное усиление влияния репрессорного блока на экспрессию собственных генов (рис. 3 и рис. 4, фаза II). В итоге происходит остановка их транскрипции, что служит дополнительным фактором истощения пула одноименных белков. Образующаяся петля отрицательной обратной связи, инициированная белками ASC, задает продолжительность предмитотической стадии G2 клеточного цикла и самую возможность перехода родительской клетки к делению, т.е., запуская собственную деградацию, эти белки контролируют время вступления родительских клеток в митоз (Chang et al., 2008).

Таким образом, пронеуральные белки играют двоякую роль в судьбе РКМ, сначала удерживая ее на стадии G2 до окончательного определения нейрального статуса, а затем разрешая переход к делению через активацию процесса собственной деградации, действующую по механизму образующейся петли отрицательной обратной связи ASC-Phyl.

Остановка клеточного цикла имеет существенное значение для развития механорецепторов. Показано, что сокращение стадии G2 приводит к нарушению детерминации РКМ и отклонениям от стандартного числа, размера и расположения механорецепторов (Usui, Kimura, 1992; Kimura et al., 1997; Nègre et al., 2003; Ayeni et al., 2016; Meserve, Duronio, 2017). Задержка обеспечивает необходимые условия для накопления достаточного уровня пронеуральных белков, поскольку на время митоза процессы синтеза прекращаются (Kimura et al., 1997).

Кроме того, пролонгация этой стадии, с одной стороны предотвращает несанкционированное деление родительских клеток, которое могло бы привести к отклонению от развития регламентированного числа механорецепторов, и, с другой стороны, создает предпосылки для синхронизации делений РКМ. Возможно, для инициации митозов необходим некий генерализованный регуляторный сигнал, каковым может оказаться экдизон, определенный уровень которого необходим для формирования органов периферической нервной системы дрозофилы (Sliter, 1989; Henrich et al., 1993).

Синхронизация клеточных делений особенно важна для формирования многоэлементных регулярных структур и наблюдается, в частности, в популяции родительских клеток микрохет нотума и многочисленных сенсилл края крыла дрозофилы (Hartenstein, Posakony, 1989; Huang et al., 1991; Nègre et al., 2003; Ayeni et al., 2016).

Таким образом, две фазы функционирования ЦРК различаются одним компонентом — белком Phyl. Впервые Phyl обнаруживается в родительской клетке значительно позднее белков ASC, для которых ген *phyl* является транскрипционной мишенью (Pi et al., 2004; Chang et al., 2008).

Биологический смысл такой отсроченной экспрессии Phyl при детерминации родительской клетки состоит, видимо, в необходимости накопления пронеуральных белков до уровня, необходимого для безальтернативного перехода клетки в нейральный статус.

Экспрессия *phyl* в РКМ находится под действием разнонаправленных механизмов контроля — негативной регуляции его активности через Notch сигнальный путь (Pi et al., 2001; Chang et al., 2003) и позитивной регуляции через пронеуральные белки и EGFR сигнальный путь (Pi et al., 2004; Huang et al., 2004; Pi, Chien, 2007; Chang et al., 2008; Miller et al., 2014) (рис. 5).

Пока в течение первой фазы функционирования ЦРК происходит необходимая для определе-

ния нейральной судьбы клетки наработка пронеуральных белков по механизму автоактивации генов *AS-C* и с участием Notch- и EGFR сигнальных путей, *phyl*, видимо, в большей степени испытывает репрессивное влияние, так что его экспрессия выражена слабо, и содержание соответствующего белка в клетке незначительно.

С достижением порогового уровня пронеуральных белков происходит перераспределение факторов воздействия на экспрессию *phyl* – негативное влияние Notch пути ослабевает, тогда как активирующее влияние *AS-C* начинает преобладать. В результате интенсифицируется наработка *Phyl*, что через какое-то время приводит к понижению содержания пронеуральных белков за счет создавшейся петли отрицательной обратной связи и, как следствие, переходу РКМ к первому асимметричному делению.

Следует заметить, что отложенное появление белка или интенсивное его накопление в количествах, значимых для изменения состояния клетки, является достаточно распространенным явлением. Аналогичные эффекты описаны для многих белков дрозофилы и позвоночных. Хрестоматийный пример такого рода дают некоторые белки теплового шока дрозофилы, для которых характерно низкое базальное содержание в клетке в стандартных условиях и быстрое его возрастание в ответ на индуцирующий сигнал – повышение температуры, уровень экдизона и др., а также многие белки, связанные с онтогенетическими процессами и/или участвующие в сигнальных путях. Такой режим может быть важен как для синхронизации клеточных популяций в ходе онто- и морфогенеза, так и для быстрой координированной активации генов в короткое время и/или при быстрой дифференцировке (Lagha et al., 2013; Saunders et al., 2013; Gaertner, Zeitlinger 2014; Watts et al., 2019; Abuhashem et al., 2022).

Отсроченная экспрессия функционально активного белка может обеспечиваться различными механизмами на всех этапах его наработки – от инициации транскрипции соответствующего гена до пост-трансляционных модификаций. Инициация транскрипции рассматривается как самый распространенный регулятор временной и пространственной активности генов и, соответственно, временных характеристик динамики появления или накопления соответствующих белков (Lagha et al., 2013; Saunders et al., 2013; Gaertner, Zeitlinger 2014; Watts et al., 2019; Abuhashem et al., 2022). Возможно, что и наблюдаемое отложенное появление *Phyl* связано с эффектом задержки транскрипции соответствующего гена.

Предлагаемые сценарии только феноменологически описывают закономерности выделения РКМ как основного этапа формирования меха-

норецептора и роли участвующих генов и белков под управлением ЦРК. К сожалению, их конкретизация в настоящее время не представляется возможной, поскольку отсутствуют полные экспериментальные данные о динамических параметрах, характеризующих этот процесс в целом, как и детали транскрипционной активности генов и координированного синтеза и деградации целевых белков.

Существенно, что, как показывают результаты математического и компьютерного моделирования функционирования ЦРК в родительской клетке механорецептора при допущении биологически оправданных параметров модели, контур функционирует без осцилляций и обеспечивает нарастание уровня белков *AS-C* до порогового значения с выходом на плато и последующим снижением до фоновых значений, что свидетельствует о канализованности процесса детерминации РКМ и ее подготовки к асимметричному делению (Golubiatnikov et al., 2018; Bukharina et al., 2020). Таким образом, функционирование ЦРК регламентирует экспрессию пронеуральных генов, обеспечивая определенное число и позиционирование механорецепторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленными многолетними исследованиями установлено, что пронеуральным генам *achaete* и *scute* комплекса *AS-C* принадлежит главенствующая роль в реализации программы морфогенеза механорецепторов дрозофилы на всех этапах его становления – от выделения пронеуральных кластеров из массы эпидермальных клеток имагинального диска до асимметричного деления прогениторных клеток.

Их функция состоит в двухэтапном определении судьбы клеток имагинального диска, сначала наделяя клетки пронеурального кластера потенциалом к развитию в нейральном направлении с возможностью изменения траектории развития, а затем детерминируя статус родительской клетки механорецептора с безальтернативным переключением в направлении нейральной дифференцировки путем ограничения собственной активности пределами родительской клетки и ингибирования собственной экспрессии в окружающих клетках кластера.

При этом в клетках пронеурального кластера содержание белков *AS-C* находится на базальном уровне, тогда как в родительской клетке оно сначала наращивается до максимальных значений, что останавливает клеточный цикл на стадии G2, а затем снижается, что позволяет клетке перейти к митозу.

Детерминацию РКМ как основной этап морфогенеза механорецепторов поддерживает генная сеть “Neurogenesis: determination”, а модуляцию экспрессии генов *AS-C* в рамках этой сети контролирует центральный регуляторный контур.

Функционирование ЦРК обеспечивает достижение и последующее поддержание в течение определенного времени уровня пронеуральных белков, которым детерминируется нейральный статус РКМ. Система сбалансированных регуляторных взаимодействий компонентов контура задает единственно правильный режим его функционирования и как результат — однозначную детерминацию родительской клетки механорецептора и направления специализации ее потомков. Существенно, что динамический процесс изменения содержания белков ASC, определяющий этот статус, не является осциллирующим, а последовательно проходит три фазы: 1) накопление ASC, 2) выход содержания ASC на плато, 3) снижение содержания ASC до остаточных значений, что подтверждается как экспериментальными данными, так и результатами математического и компьютерного моделирования (Pi et al., 2004; Chang et al., 2008; Bukharina et al., 2012, 2016, 2020; Golubyatnikov et al., 2018).

Регуляторные контуры с положительными и отрицательными обратными связями осуществляют настройку функционирования генных сетей, что позволяет находящимся под их управлением сетям достигать и поддерживать определенный функциональный статус и/или оперативно менять режим функционирования в условиях новых ситуаций, возникающих под влиянием внешних и внутренних факторов, оптимизируя реализацию генетических программ. Характерным свойством регуляторных контуров является авторегуляция, позволяющая эффективно контролировать экспрессию входящих в них генов, что особенно важно в случае транскрипционных факторов, причастных к таким процессам, как детерминация и поддержание клеточной судьбы и дифференцировка (Crews, Pearson, 2009).

Рассмотренный ЦРК, принимающий на себя функцию тонкой настройки экспрессии генов комплекса *achaete-scute*, кодирующих транскрипционные факторы, может служить одним из примеров механизма реализации общей стратегии направленного и необратимого определения клеточной судьбы в процессе морфогенеза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта № FWNR-2022-0020 “Системная биология и биоинформатика: реконструкция, анализ и моделирование структурно-функциональной организации и эволю-

ции генных сетей человека, животных, растений и микроорганизмов”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы внесли одинаковый вклад в подготовку статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бухарина Т.А., Фурман Д.П. Генетический контроль развития механорецепторов у *Drosophila melanogaster* — описание в базе данных “NEUROGENESIS” // Информ. Вест. ВОГиС. 2009. Т. 13. № 1. С. 186–193.
- Фурман Д.П., Бухарина Т.А. Анализ генной сети “NEUROGENESIS: PREPATTERN”, контролирующей первый этап формирования щетиночного узора у *Drosophila melanogaster* // Вавил. журн. ген. сел. 2016. Т. 20. № 6. С. 832–839.
<https://doi.org/10.18699/VJ16.199>
- Abuhashem A., Garg V., Hadjantonakis A.K. RNA polymerase II pausing in development: orchestrating transcription // Open Biol. 2022. V. 12. № 1. P. 210–220.
<https://doi.org/10.1098/rsob.210220>
- Ananko E.A., Kolpakov F.A., Kolchanov N.A. GeneNet database: a technology for a formalized description of gene networks // Proc. of the Second International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. BGRS'2000. Novosibirsk, Russia. 2000. P. 174–177.
- Ayeni J.O., Audibert A., Fichelson P. et al. G2 phase arrest prevents bristle progenitor self-renewal and synchronizes cell division with cell fate differentiation // Development. 2016. V. 143. № 7. P. 1160–1169.
<https://doi.org/10.1242/dev.134270>
- Barad O., Hornstein E., Barkai N. Robust selection of sensory organ precursors by the Notch-Delta pathway // Curr. Opin. Cell Biol. 2011. V. 23. № 6. P. 663–667.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.09.005>
- Bardin A.J., Le Borgne R., Schweisguth F. Asymmetric localization and function of cell-fate determinants: a fly's view // Curr. Opin. Neurobiol. 2004. V. 1. № 1. P. 6–14.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.12.002>
- Becam I., Fiuza U.M., Arias A.M., Milán M. A role of receptor Notch in ligand cis-inhibition in *Drosophila* // Curr. Biol. 2010. V. 20. № 6. P. 554–560.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.01.058>
- Bocci F., Onuchic J.N., Jolly M.K. Understanding the principles of pattern formation driven by notch signaling by

- integrating experiments and theoretical models // *Front Physiol.* 2020. V. 11. P. 929.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00929>
- Buffin E., Gho M. Laser microdissection of sensory organ precursor cells of *Drosophila* microchaetes // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 2. e9285.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009285>
- Bukharina T.A., Golubyatnikov V.P., Golubyatnikov I.V., Furman D.P. Model investigation of central regulatory contour of gene net of *D. melanogaster* macrochaete morphogenesis // *Rus. J. Dev. Biol.* 2012. V. 43. № 1. P. 49–53.
<https://doi.org/10.1134/S106236041201002X>
- Bukharina T.A., Furman D.P. The mechanisms determining bristle pattern in *Drosophila melanogaster* // *Russ. J. Dev. Biol.* 2015. V. 4. № 3. P. 99–110.
<https://doi.org/10.1134/S1062360415030029>
- Bukharina T.A., Golubyatnikov V.P., Furman D.P. Gene network controlling the morphogenesis of *D. melanogaster* macrochaetes: an expanded model of the central regulatory circuit // *Rus. J. Dev. Biol.* 2016. V. 47. № 5. P. 288–293.
<https://doi.org/10.1134/S1062360416050040>
- Bukharina T.A., Akinshin A.A., Golubyatnikov V.P., Furman D.P. Mathematical and numerical models of the central regulatory circuit of the morphogenesis system of *Drosophila* // *J. Appl. Ind. Math.* 2020. V. 14. № 2. P. 249–255.
<https://doi.org/10.1134/S1990478920020040>
- Calleja M., Renaud O., Usui K. et al. How to pattern an epithelium: lessons from *achaete-scute* regulation on the notum of *Drosophila* // *Gene.* 2002. V. 292. № 1–2. P. 1–12.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00628-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00628-5)
- Chang C.W. Pi H., Chien C.T., Hsu C.P. Network modeling of *Drosophila* external sensory organ precursor formation: the role of recently studied genes // *J. Genet. Mol. Biol.* 2003. V. 14. № 4. P. 243–251.
- Chang P.J., Hsiao Y.L., Tien A.C. et al. Negative-feedback regulation of proneural proteins controls the timing of neural precursor division // *Development.* 2008. V. 135. № 18. P. 3021–3030.
<https://doi.org/10.1242/dev.021923>
- Corson F., Couturier L., Rouault H. et al. Self-organized Notch dynamics generate stereotyped sensory organ patterns in *Drosophila* // *Science.* 2017. V. 356. № 6337. P. 501.
<https://doi.org/10.1126/science.aai7407>
- Couturier L., Mazouni K., Schweisguth F. Inhibition of Notch recycling by Numb: relevance and mechanism(s) // *Cell Cycle.* 2013. V. 12. № 11. P. 1647–8.
<https://doi.org/10.4161/cc.24983>
- Couturier L., Mazouni K., Corson F., Schweisguth F. Regulation of Notch output dynamics via specific E(spl)-HLH factors during bristle patterning in *Drosophila* // *Nat. Commun.* 2019. V. 10(1). P. 3486.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11477-2>
- Crews S.T., Pearson J.C. Transcriptional autoregulation in development // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. № 6. R241–246.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.015>
- Cubas P., de Celis J.F., Campuzano S., Modolell J. Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc // *Genes Dev.* 1991. V. 5. № 6. P. 996–1008.
<https://doi.org/10.1101/gad.5.6.996>
- Culi J., Modolell J. Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling // *Genes Dev.* 1998. V. 12. № 13. P. 2036–2047.
<https://doi.org/10.1101/gad.12.13.2036>
- Culi J., Martín-Blanco E., Modolell J. The EGF receptor and N signalling pathways act antagonistically in *Drosophila* mesothorax bristle patterning // *Development.* 2001. V. 128. № 2. P. 299–308.
- del Álamo D., Rouault H., Schweisguth F. Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling // *Curr. Biol.* 2011 V. 21. № 1. R40–R47.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.034>
- Fichelson P., Audibert A., Simon F., Gho M. Cell cycle and cell-fate determination in *Drosophila* neural cell lineages // *Trends Genet.* 2005. V. 21. № 7. P. 413–420.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.05.010>
- Fiuzza U.-M., Klein T., Arias A.M., Hayward P. Mechanisms of ligand-mediated inhibition in Notch signaling activity in *Drosophila* // *Dev. Dyn.* 2010. V. 239. № 3. P. 798–805.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.22207>
- Formosa-Jordan P., Ibañes M. Competition in Notch signaling with cis enriches cell fate decisions // *PLoS ONE.* 2014. V. 9. № 4. e95744.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095744>
- Furman D.P., Bukharina T.A. Genetic control of macrochaetae development in *Drosophila melanogaster* // *Russ. J. Dev. Biol.* 2008a. V. 39. № 4. P. 195–206.
<https://doi.org/10.1134/S1062360408040012>
- Furman D.P., Bukharina T.A. How *Drosophila melanogaster* forms its mechanoreceptors // *Curr. Genomics.* 2008b. V. 9. № 5. P. 312–323.
<https://doi.org/10.2174/138920208785133271>
- Furman D.P., Bukharina T.A. The gene network determining development of *Drosophila melanogaster* mechanoreceptors // *Comp. Biol. Chem.* 2009. V. 33. P. 231–234.
<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2009.04.001>
- Furman D.P., Bukharina T.A. *Drosophila* mechanoreceptors as a model for studying asymmetric cell division // *Int. J. Dev. Biol.* 2011. V. 55. № 2. P. 133–141.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.103129df>
- Furman D.P., Bukharina T.A. Morphogenesis of *Drosophila melanogaster* macrochaetes: cell fate determination for bristle organ // *J. Stem Cells.* 2012. V. 7. № 1. P. 19–41.
- Furman D.P., Bukharina T.A. The development of bristle pattern in *Drosophila melanogaster*: prepattern and *achaete-scute* genes // *Vavilov J. Genetics and Breeding.* 2018. V. 22. № 8. P. 1046–1054.
<https://doi.org/10.18699/VJ18.449>
- Gaertner B., Zeitlinger J. RNA polymerase II pausing during development // *Development.* 2014. V. 141. № 6.

- P. 1179–1183.
<https://doi.org/10.1242/dev.088492>
- García-Bellido A., de Celis J.F. The complex tale of the achaete-scute complex: a paradigmatic case in the analysis of gene organization and function during development // *Genetics*. 2009. V. 182. № 3. P. 631–639.
<https://doi.org/10.1534/genetics.109.104083>
- Ghysen A., Dambly-Chaudiere C. Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system // *Trends Genet.* 1989. V. 5. P. 251–255.
- Giebel B., Wodarz A. Notch signaling: numb makes the difference // *Curr. Biol.* 2012. V. 22. № 4. R133–R135.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.006>
- Golubyatnikov V.P., Kazantsev M.V., Kirillova N.E. et al. Mathematical and numerical models of two asymmetric gene networks // *Siberian Electron. Math. Rep.* 2018. V. 15. P. 1271–1283.
<https://doi.org/10.17377/semi.2018.15.103>
- Gomez-Skarmeta J.L., Campuzano S., Modolell J. Half a century of neural prepattern: the story of a few bristles and many genes // *Nat. Rev. Neurosci.* 2003. V. 4. № 3. P. 587–598.
<https://doi.org/10.1038/nrn1142>
- Hartenstein V., Posakony J.W. Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster* // *Development*. 1989. V. 107. № 2. P. 389–405.
- Hartenstein V. Development of insect sensilla // In: *Comprehensive Molecular Insect Science* / Ed. Gilbert L.I. Amsterdam; Boston: Elsevier, 2005. V. 1. P. 379–419.
<https://doi.org/10.1016/b0-44-451924-6/00012-0>
- Heitzler P., Bourouis M., Ruel L. et al. Genes of the enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in *Drosophila* // *Development*. 1996. V. 122. № 1. P. 161–171.
- Henrich V.C., Livingston L., Gilbert L.I. Developmental requirements for the ecdysoneless (ecd) locus in *Drosophila melanogaster* // *Dev. Genet.* 1993. V. 14. № 5. P. 369–377.
<https://doi.org/10.1002/dvg.10201405068293578>
- Henrique D., Schweisguth F. Mechanisms of Notch signaling: a simple logic deployed in time and space // *Development* 2019. V. 146. № 3. dev172148.
<https://doi.org/10.1242/dev.172148>
- Huang F., Dambly-Chaudiere C., Ghysen A. The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila* // *Development*. 1991. V. 111. P. 1087–1095.
- Johnson S.A., Zitserman D., Roegiers F. Numb regulates the balance between Notch recycling and late-endosome targeting in *Drosophila* neural progenitor cells // *Mol. Biol. Cell.* 2016. V. 27. № 18. P. 2857–2866.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E15-11-0751>
- Kimura K., Usui-Ishihara A., Usui K. G2 arrest of cell cycle ensures a determination process of sensory mother cell formation in *Drosophila* // *Dev. Genes Evol.* 1997. V. 207. № 3. P. 199–202.
<https://doi.org/10.1007/s004270050108>
- Kunisch M., Haenlin M., Campos-Ortega J.A. Lateral inhibition mediated by the *Drosophila* neurogenic gene Delta is enhanced by proneural proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. № 21. 10139–10143.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.10139>
- Lagha M., Bothma J.P., Esposito E. et al. Paused Pol II coordinates tissue morphogenesis in the *Drosophila* embryo // *Cell*. 2013. V. 15. № 5. P. 976–987.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.045>
- Lai E.C., Deblandre G.A., Kintner C., Rubin G.M. *Drosophila* Neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of Delta // *Devel. Cell*. 2001. V. 1. № 6. P. 783–794.
- Lai E.C., Orgogozo V.A. Hidden program in *Drosophila* peripheral neurogenesis revealed: fundamental principles underlying sensory organ diversity // *Dev. Biol.* 2004. V. 269. № 1. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.01.032>
- Le Borgne R., Bardin A., Schweisguth F. The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling // *Development*. 2005. V. 132. P. 1751–1762.
- Li S., Xu C., Carthew R.W. Phyllopod acts as an adaptor protein to link the sina ubiquitin ligase to the substrate protein tramtrack // *Mol. Cell Biol.* 2002. V. 22. № 19. P. 6854–6865.
<https://doi.org/10.1128/MCB.22.19.6854-6865.2002>
- Martinez C., Modolell J. Cross-regulatory interactions between the proneural achaete and scute genes of *Drosophila* // *Science*. 1991. V. 251. № 5000. P. 1485–1487.
<https://doi.org/10.1126/science.1900954>
- Meserve J.H., Duronio R.J. A population of G2-arrested cells are selected as sensory organ precursors for the interommatidial bristles of the *Drosophila* eye // *Dev. Biol.* 2017. V. 430. № 2. P. 374–384.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.06.023>
- Miller S.W., Rebeiz M., Atanasov J.E., Posakony J.W. Neural precursor-specific expression of multiple *Drosophila* genes is driven by dual enhancer modules with overlapping function // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 48. P. 17194–17199.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1415308111>
- Miller S.W., Posakony J.W. Lateral inhibition: Two modes of non-autonomous negative autoregulation by *Neuralized* // *PLoS Genet.* 2018. V. 14. № 7. P. e1007528.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007528>
- Nègre N., Ghysen A., Martinez A.-M. Mitotic G2-arrest is required for neural cell fate determination in *Drosophila* // *Mech. Dev.* 2003. V. 120. № 2. P. 253–265.
[https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00419-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00419-7)
- Pi H., Wu H.J., Chien C.T. A dual function of phyllopod in *Drosophila* external sensory organ development: cell fate specification of sensory organ precursor and its progeny // *Development*. 2001. V. 28. № 14. P. 2699–2710.
- Pi H., Huang S.K., Tang C.Y., Sun Y.H., Chien C.T. Phyllopod is a target gene of proneural proteins in *Drosophila* external sensory organ development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 22. P. 8378–8383.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0306010101>

- Pi H., Chien C.T. Getting the edge: neural precursor selection // J. Biomed. Sci. 2007. V. 14. № 4. P. 467–473. <https://doi.org/10.1007/s11373-007-9156-4>
- Reeves N., Posakony J.W. Genetic programs activated by proneural proteins in the developing *Drosophila* PNS // Dev. Cell. 2005. V. 8. № 3. P. 413–425.
- Renaud O., Simpson P. Movement of bristle precursors contributes to the spacing pattern in *Drosophila* // Mech. Dev. 2002. V. 119. № 2. P. 201–211. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(02\)00381-7](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(02)00381-7)
- Roegiers F., Younger-Shepherd S., Jan L.Y., Jan Y.N. Two types of asymmetric divisions in the *Drosophila* sensory organ precursor cell lineage // Nat. Cell Biol. 2001. V. 3. № 1. P. 58–67. <https://doi.org/10.1038/35050568>
- Roegiers F., Jan Y.N. Asymmetric cell division // Curr. Opin. Cell. Biol. 2004. V. 16. № 2. P. 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.02.010>
- Saunders A., Core L.J., Sutcliffe C. et al. Extensive polymerase pausing during *Drosophila* axis patterning enables high-level and pliable transcription // Genes Dev. 2013 V. 27. № 10. P. 1146–1158. <https://doi.org/10.1101/gad.215459.113>
- Shilo B.Z. Phyllopod at the intersection of developmental signalling pathways // EMBO J. 2009. V. 28. № 4. P. 311–312. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.291>
- Simpson P. Lateral inhibition and the development of the sensory bristles of the adult peripheral nervous system of *Drosophila* // Development. 1990. V. 109. № 3. P. 509–519.
- Simpson P. A prepattern for sensory organs. *Drosophila* development // Curr. Biol. 1996. № 6. P. 948–950.
- Simpson P., Woehl R., Usui K. Development and evolution of bristle patterns in Diptera // Development. 1999. V. 126. № 7. P. 1349–1364.
- Skeath J.B., Carroll S.B. Regulation of achaete-scute gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing // Genes Dev. 1991. V. 5. № 6. P. 984–985. <https://doi.org/10.1101/gad.5.6.984>
- Sliter T.J. Imaginal disc-autonomous expression of a defect in sensory bristle patterning caused by the lethal(3)ecdysoneless1 (1(3)ecd1) mutation of *Drosophila melanogaster* // Development. 1989. V. 106. № 2. P. 347–354.
- Stern C. Two or three bristles // Am. Sci. 1954. V. 42. P. 213–247.
- Schweisguth F. Asymmetric cell division in the *Drosophila* bristle lineage: from the polarization of sensory organ precursor cells to Notch-mediated binary fate decision // Dev. Biol. 2015. V. 4. № 3. P. 299–309. <https://doi.org/10.1002/wdev.175>
- Troost T., Schneider M., Klein T. A re-examination of the selection of the sensory organ precursor of the bristle sensilla of *Drosophila melanogaster* // PLoS Genet. 2015. V. 11. № 1. P. e1004911. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004911>
- Usui K., Kimura K.I. Sensory mother cells are singled out from among mitotically quiescent clusters of cells in the wing disc of *Drosophila* // Development. 1992. V. 116. № 3. P. 601–610.
- Usui K., Kimura K.I. Sequential emergence of the evenly spaced microchaetes on the notum of *Drosophila* // Roux's Arch. Dev. Biol. 1993. V. 203. № 3. P. 151–158. <https://doi.org/10.1007/BF00365054>
- Usui K., Goldstone C., Gibert J.M. et al. Redundant mechanisms mediate bristle patterning on the *Drosophila* thorax // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. № 23. V. 105(51). P. 20112–20117. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804282105>
- Usui-Ishihara A., Simpson P. Differences in sensory projections between macro- and microchaetes in *Drosophila* flies // Dev. Biol. 2005 V. 277. № 1. P. 170–183. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.09.017>
- Watts J.A., Burdick J., Daigneault J. et al. Cis elements that mediate RNA polymerase II pausing regulate human gene expression // Am. J. Hum. Genet. 2019. V. 105. № 4. P. 677–688. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.08.003>
- Weinmaster G., Fischer J.A. Notch ligand ubiquitylation: what is it good for? // Dev. Cell. 2011. V. 21. № 1. P. 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.006>
- Yasugi T., Sato M. Mathematical modeling of Notch dynamics in *Drosophila* neural development // Fly (Austin). 2022. V. 16. № 1. P. 24–36. <https://doi.org/10.1080/19336934.2021.1953363>
- zur Lage P., Jarman A.P. Antagonism of EGFR and Notch signalling in the reiterative recruitment of *Drosophila* adult chordotonal sense organ precursors // Development. 1999. V. 126. № 14. P. 3149–3157. <https://doi.org/10.1242/dev.126.14.3149>

Genetic Regulation of Morphogenesis of *Drosophila melanogaster* Mechanoreceptors

D. P. Furman^{1, 2, *} and T. A. Bukharina^{1, 2, **}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, pr. Akad. Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

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

*e-mail: furman@bionet.nsc.ru

**e-mail: bukharina@bionet.nsc.ru

The *Drosophila* mechanoreceptors represented by macro- and microchaetae (bristles), residing on the head and body of imago according to a strictly ordered pattern, are the result of determined conversion of the ectodermal cells of imaginal discs into progenitor neural cells with subsequent differentiation of derivatives of

these cells into components of a mechanoreceptor. The definite mechanoreceptor consists of two superficial cuticular structures – bristle with socket and two underlying neural components – a neuron and a glial cell. The sensor organ forms in three stages: (1) segregation from the mass of ectodermal cells of domains potentially competent for the neural pathway of development – proneural clusters (PCs); (2) separation of a single sensory organ precursor (SOP) cell in every proneural cluster; and (3) its asymmetric division with further specialization of the daughter cells into the components of definitive mechanoreceptor. Bristle pattern formation is ordered in space and time. Spatial determination is due to the positioning of parental cells, while temporal determination is associated with two events of synchronization – the completion of SOP isolation for all mechanoreceptors by 1–10 hours after puparium formation and time limit for their entry into the first asymmetric mitosis. Our reconstruction and analysis of the molecular genetic system, which provides the listed events of morphogenesis of both individual mechanoreceptor and the overall bristle pattern, revealed its hierarchical organization. The elements of the system are grouped into three modules that correspond to the stages of sensory organ morphogenesis – the gene networks named “Neurogenesis: prepattern”, “Neurogenesis: determination”, and “Neurogenesis: asymmetric division”. This system limits the number of neurally predetermined cells, first to dozens at the level of clusters and then to a single parent cell within a cluster. The main attribute and connecting link of the networks is the *achaete-scute* (*AS-C*) proneural gene complex and the central regulatory circuit (CRC) controls its functioning at the stage of SOP isolation. In addition to *AS-C*, the CRC contains *hairy*, *senseless* (*sens*), *charlatan* (*chn*), *scratch* (*scrt*), and *phyllopod* (*phyl*) genes. These genes are linked by positive and negative feedbacks mediated via the proteins and protein complexes, which activate or repress transcription of their target genes. CRC functioning ensures a significant excess of the content of proneural proteins in a single cell of the cluster, which determines its status as a SOP cell. Analysis of the CRC operation has shown that its activity comprises two phases differing in the time when they act and the composition of their elements. A specific feature of the second phase is the presence of Phyl protein, involved in degradation of proneural AS-C proteins. In this review we briefly characterize the main stages of mechanoreceptor morphogenesis, the composition and relationships of the gene networks that support them, and consider the inter- and intracellular mechanisms of SOP segregation.

Keywords: drosophila, mechanoreceptors, *achaete-scute* gene complex, gene networks, central regulatory circuit

АСТРОЦИТЫ МОЗГА – СВИТА ДЕЛАЕТ КОРОЛЯ

© 2022 г. М. А. Александрова^а, *, К. К. Сухинич^а, **^аФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: mariaaleks@inbox.ru

**e-mail: transpl@hotmail.com

Поступила в редакцию 20.03.2022 г.

После доработки 27.04.2022 г.

Принята к публикации 30.04.2022 г.

В ткани мозга, помимо нейронов, есть множество других клеток, объединенных под названием глия. По современным данным у человека насчитывается примерно одинаковое число нейронов и глиальных клеток. Среди клеток глии, астроциты занимают особое место благодаря своей фантастической multifunctionality, которая все еще продолжает открываться с новых сторон. История изучения астроцитов насчитывает более сотни лет. За это время за ними прочно закрепилась роль опорных и обслуживающих клеток, и поэтому они всегда находились в “тени” нейронов. Новые молекулярно-генетические инструменты, позволяющие маркировать клетки, манипулировать ими *in vitro* и *in vivo*, контролируемо удалять гены и регулировать их экспрессию, а также новые методы визуализации клеток открыли широкие возможности для решения многих фундаментальных проблем. Благодаря им были сделаны два важных открытия: астроциты близки в функциональном отношении к нейронам, а также играют важную роль в восстановлении и регенерации мозга. В направлениях, связанных с каждым из этих открытий, активные исследования ведутся с 90-х годов прошлого века. Однако в каждом из них исследования шли самостоятельным путем, и они практически не пересекались. В этом нет ничего удивительного, так как современные исследования зачастую узко специализированы и погружаются в такую глубину, где теряется ощущение целостности объекта и проблемы. В случае с астроцитами примерно так и получилось. В одном направлении исследования, чрезвычайно важные для понимания функций мозга, были сфокусированы на физиологии астроцитов и их участия в регуляции синаптической активности нейронов. Исследования в рамках другого направления были связаны с изучением нейральных стволовых клеток. Благодаря им у астроцитов были обнаружены свойства стволовых клеток, а также способность репрограммироваться в нейроны. Массивы данных, полученных в ходе изучения астроцитов, огромны. Поэтому каждый из посвященных этим клеткам обзоров охватывает, как правило, лишь одну узкую тему. В связи с этим цель нашего обзора – объединение информации, полученной в рамках двух упомянутых направлений исследований. Благодаря этому будет сформировано наиболее полное представление о современном уровне знаний в области биологии астроцитов; будут намечены новые пути изучения нормального функционирования мозга и его реконструкции.

Ключевые слова: развитие астроцитов, механизмы клеточной дифференцировки, трехчастный синапс, пластичность астроцитов, репрограммирование в нейроны, астроциты человека

DOI: 10.31857/S0475145022040024

ВВЕДЕНИЕ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АСТРОЦИТОВ

Во всех обзорах, посвященных глиальным клеткам, непременно указывается, что глия, впервые описанная Рудольфом Вирховым в 1846 г., изначально представлялась как однородная соединительная ткань, поддерживающая нервные клетки. Однако позже С. Рамон и Кахаль и другие исследователи описали в мозге морфологически разные типы и нервных и глиальных клеток. По современным данным у человека насчитывается примерно одинаковое число нейронов (86.1 млрд) и глиальных клеток (84.6 млрд), но их соотношение меняется

в зависимости от области мозга (von Bartheld et al., 2016). В ЦНС к глии относятся две категории клеток: макроглия (астроциты и олигодендроциты), клетки нейрального происхождения, и микроглия, клетки мезенхимного ряда. В неокортексе мозга человека отношение глия/нейрон 3.72 (60.8 млрд глии и 16.3 млрд нейронов), а в мозжечке 0.23 (16.1 млрд глии и 69.1 млрд нейронов). В отношении коры мозга известно, что соотношение глиальных клеток в ней следующее: олигодендроцитов 75.6%, астроцитов 17.3%, микроглия 6.5% (Pelvig et al., 2008).

Астроциты имеют множество разных, важных функций для поддержания жизнедеятельности

нейронов и всей ткани мозга как в развитии, так во взрослой нервной системе, при старении и болезнях (Zhou et al., 2019; Ишунина и др., 2020). Традиционное представление об астроцитах сводилось к тому, что они выполняют опорную функцию, поддерживают ионный гомеостаз, обеспечивают структурную и защитную функции в ЦНС, участвуют в формировании гематоэнцефалического барьера. Эти характеристики дополнили новые удивительные открытия последних десятилетий (Verkhratsky, Nedergaard, 2018). Теперь очевидно, что дифференцированные астроциты через свои экстраординарные отростки взаимодействуют со многими тысячами синапсов и регулируют их функциональную активность. Астроциты занимают и обслуживают определенные пространственные домены в мозге, они экспрессируют глиотрансмиттеры, множество рецепторов, канальные белки и транспортеры, метаболически поддерживают нервные клетки, контролируют дыхание, участвуют в образовании синапсов и регуляции синаптической передачи вплоть до поддержания когнитивных процессов. Во многих работах поднимается вопрос о том, что в функциональном отношении астроциты становятся равными партнерами нервных клеток (Гомазков, 2019; Farhy-Tselnicker, Allen, 2018; Forsberg, Herlenius, 2019; Akdemir et al., 2020).

В дополнение к информационным функциям астроцитов, в последние годы раскрылась их регенеративная роль в мозге (Gotz, Bocchi, 2021). Благодаря открытию нейральных стволовых клеток (НСК) и детальному их изучению в развитии и во взрослом мозге сложилось понимание того, что НСК являются не чем иным как специализированными типами астроцитов (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009). Более того, стволовые свойства обнаружались и в паренхимных астроцитах взрослого мозга, за что они получили название “латентных предшественников” (Alunni, Bally-Cuif, 2016). Несмотря на то, что нейроны и астроциты происходят от единого базального стволового предшественника, дифференцированные астроциты много пластичнее нейронов, они проявляют реактивность при повреждении, сохраняют эпигенетическую память и способность к пролиферации (Barker et al., 2018). Эти свойства в определенных условиях *in vitro* и *in vivo* позволяют астроцитам репрограммироваться в нервные клетки, что делает их чрезвычайно значимыми с точки зрения регенерации (Wang et al., 2021).

Формирование этих уникальных физиологических и регенераторных свойств непосредственно связано с развитием астроцитов, их морфофункциональной и молекулярной дифференцировкой. Поэтому в обзоре будут рассмотрены современные данные о генезе нервной ткани, молекулярные механизмы переключения с нейро- на глиогенез, развитие и дифференцировка астроцитов, уча-

стие в контроле синаптической активности и их пластические свойства, способность к репрограммированию в нейроны и способы ее регуляции.

РАЗВИТИЕ И СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ АСТРОЦИТОВ

В мозге млекопитающих известно несколько путей возникновения астроцитов, и все они реализуются только после генерации нервных клеток. Нейроны возникают первыми, вслед за закрытием нервной трубки со стадии эмбриогенеза Э10–11 у мышей. По завершении нейрогенеза на Э17–18 начинает образовываться глия, и в первую очередь астроциты, что наиболее детально изучено в коре мозга у грызунов (McConnell, 1992; Noctor et al., 2004). У мышей в коре генерация нейронов завершается до рождения, и их число сохраняется вплоть до периода старения. По окончании генерации нейронов начинается астрогенез на Э17–18, а олигодендроциты обнаруживаются около момента рождения. Однако основная масса клеток обоих типов макроглии (астроциты и олигодендроциты) образуется в течение первого месяца постнатального развития, когда их число увеличивается в шесть–восемь раз. Считается, что механизм последовательной во времени генерации разных типов нейронов и глии жестко запрограммирован и опирается на эндогенные факторы (Qian et al., 2000). Подтверждается это тем, что такая же последовательность генерации клеток реализуется *in vitro* при культивировании ранних кортикальных клеток, выделенных из мозга эмбриона (Qian et al., 2000; Shen et al., 2006).

Все типы нейронов и макроглиальных клеток возникают из нейральных стволовых клеток (НСК), которые в онтогенезе меняют морфологию и молекулярные свойства, сохраняя стволовость. Изначально стволовыми свойствами обладают нейроэпителиальные клетки. Они генерируют первые нейроны и одновременно морфологически и молекулярно дифференцируются в клетки радиальной глии (РГ). Клетка РГ, собственно, и является базальным предшественником, нейральной стволовой клеткой, которая генерирует основные типы нейронов и глии в эмбриогенезе и в постнатальный период, когда она становится нейральной стволовой клеткой взрослого мозга (Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009).

За время эмбрионального развития клетки РГ изменяют свои генеративные свойства, морфологию и поведение. В период производства нейронов клетки РГ имеют биполярную форму, тело расположено в вентрикулярной зоне (ВЗ), базальный отросток прикрепляется к верхней пиальной поверхности, а апикальный к стенке желудочка эмбрионального мозга (Schmechel, Rakic, 1979; de Azevedo

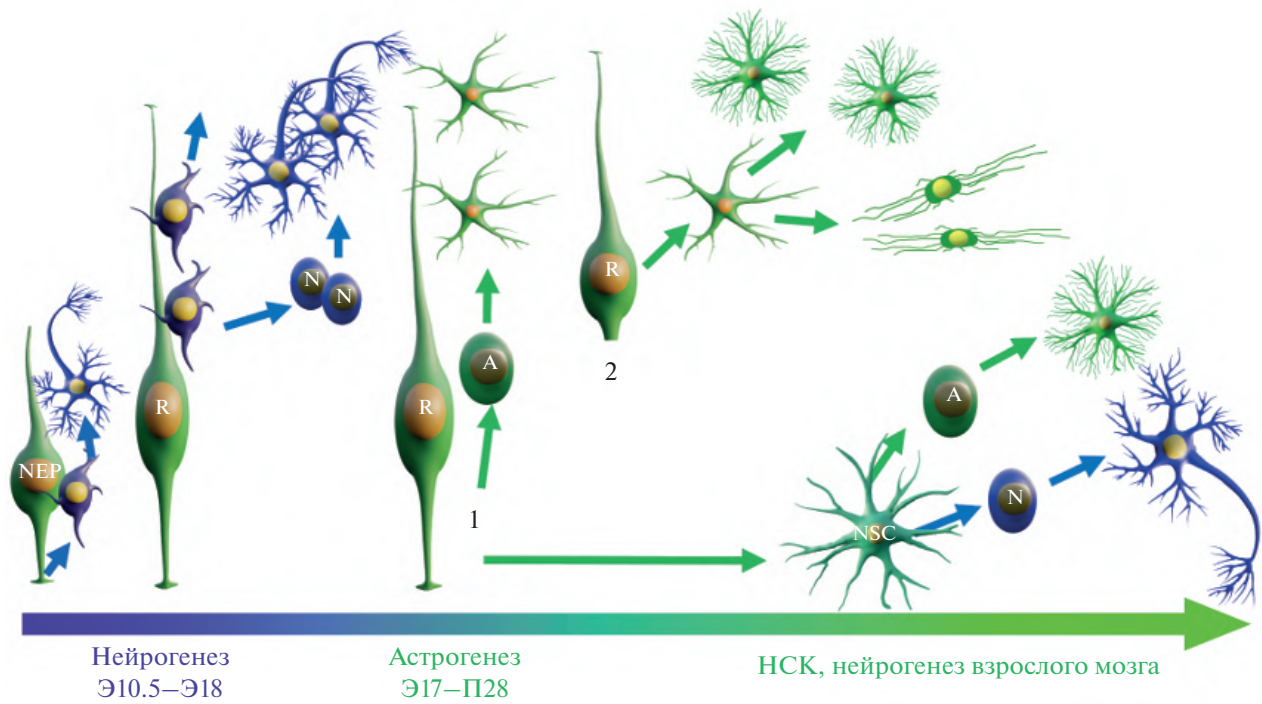


Рис. 1. Схема основных этапов нейрогенеза. Нейроны возникают из клеток нейроэпителия (NEP) и радиальной глии (R). Затем клетки радиальной глии переключаются на астрогенез (A). 1 – первая волна астрогенеза идет при ассиметричном делении R. 2 – при второй волне астрогенеза клетки радиальной глии напрямую, без деления, трансформируются в астроциты, которые активно пролиферируют и образуют популяции протоплазматических и фиброзных астроцитов соответственно. Подробное объяснение в тексте.

et al., 2003; Noctor et al., 2004). Путем симметричных и ассиметричных делений РГ поддерживает себя и продуцирует нейроны, затем она переходит к генерации глии, и первые астроциты появляются в коре мозга при ассиметричном делении между поздней эмбриональной (Э17–Э18) и перинатальной стадией (Magavi et al., 2012) (рис. 1). Подобно нейронам, астробласты мигрируют вдоль радиального отростка материнской клетки РГ из вентрикулярной зоны в толщу коры (Rakic, 1972; Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009; Burns et al., 2009). По ходу миграции они претерпевают несколько циклов деления, в результате которых возникают множественные скопления астроцитов в одной и той же кортикальной колонке. В отличие от нейронов, тела которых уже находятся в дефинитивной позиции при терминальном делении, астроциты продолжают делиться по ходу миграции, в результате их дочерние клетки образуют популяцию астроцитов верхнего слоя в коре мозга (Ge, Jia, 2016).

После окончания первого этапа генерации астроцитов при ассиметричном делении РГ, начинается вторая волна глиогенеза, когда клетки возникают иным путем, за счет прямой трансформации радиальной глии в астроциты уже без деления (рис. 1). При этом клетки радиальной

глии втягивают апикальный отросток и открепляются от желудочка, подтягивают тело к верхней пиальной поверхности мозга, где превращаются в клетки переходной формы, которые дифференцируются в протоплазматические или фиброзные астроциты, распределяющиеся по серому (слои нейронов) и белому веществу (слои волокон) коры, соответственно (Noctor et al., 2004; Tabata, 2015; Ge, Jia, 2016). Прямая трансформация радиальной глии в астроциты считается эволюционно консервативным механизмом, она была детально документирована при картировании клеточной судьбы у Nestin-CreER мышей и прослежена у других видов млекопитающих (Voigt, 1989; Burns et al., 2009).

Возникшие из РГ астроциты симметрично делятся, и скорость их пролиферации усиливается вплоть до 10 постнатального дня у мышей, и общее их количество увеличивается вплоть до конца первого месяца жизни. В этот период делятся уже дифференцированные клетки, за счет чего возникает около половины всей популяции астроцитов в ЦНС (Bandeira et al., 2009; Ge, Jia, 2016). Так как астроциты образуются и развиваются в окружении нервных клеток, интересен тот факт, что число астроцитов коррелирует с уровнем сенсорной активности нейронов в данной области мозга. В

экспериментах со зрительной депривацией показано, что выращенные в темноте мыши имеют низкую в сравнении с контрольными животными плотность астроцитов в зрительной коре и повышенную в слуховой коре (Stogsdill et al., 2017). Эти тонкие сенсорные взаимодействия нейронов и астроцитов поднимают вопрос о том, что нарушения развития и дисфункция астроцитов могут лежать в основе ряда психических расстройств, например, таких как шизофрения и заболевания аутистического спектра (Sloan, Barres, 2014).

Основную популяцию астроцитов мозга составляют протоплазматические и фиброзные клетки. К ним еще добавляется несколько типов специализированных астроцитов: клетки РГ, клетки Мюллера в сетчатке и клетки Бергмана в мозжечке, поверхностные астроциты, астроциты гипоталамуса, астроциты у мозговой оболочки (glia limitans), на границе в третьем желудочке, питуициты нейрогипофиза и взрослые нейральные стволовые клетки (Verkhratsky, Nedergaard, 2018).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ ГЕНЕРАЦИИ АСТРОЦИТОВ

Астроциты появляются вслед за нейронами из тех же предшественников, поэтому главным для определения их судьбы является подавление нейрогенной программы в стволовых клетках РГ и активация астроцитарных генов. Здесь требуется четкое переключение между нейро- и астрогенезом от которого зависит образование определенного числа клеток обоих типов и формирование нейронных сетей. Определением судьбы материнской РГ управляют многие внешние сигналы и внутренние механизмы, приводящие к понижению нейрогенных и усилению астрогенных компетенций РГ со временем развития. Для выяснения конкретных механизмов были использованы многие методы: оригинальные системы культивирования клеток, нокаутные и трансгенные мыши, электропорация плазмид *in vivo*, иммуногистохимия и т.д., что детально описано в обзоре (Miller, Gauthier, 2007). В период нейрогенеза канонический путь экспрессии астроцитарных генов ингибирован сигнальными путями JAK/STAT, что предотвращает преждевременную дифференцировку астроцитов (Kanski et al., 2014). Механизмы, регулирующие подавление пронеуральных генов *Ngn1*, *Ngn 2*, *NeuroD1*, *Mash1* и др., в достаточной степени изучены (Miller, Gauthier, 2007; Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009; Verkhratsky, Nedergaard, 2018). Роль основных регуляторов выполняют сигнальные пути JAK-STAT, Notch и BMP-SMAD (Namihira et al., 2009) (рис. 2). В начальный период сигнальный путь Notch индуцирует ремоделирование астроцитарных генов, что изменяет ком-

петентность материнской РГ. Notch подавляет нейрогенез связываясь с промотором астроцитарного гена GFAP, это защищает его от DNMT1-зависимого метилирования (Deneen et al., 2006; Namihira et al., 2009). Цитокины LIF, CNTF и CN-1 активируют сигнальный путь JAK/STAT (Bonni et al., 1997; He et al., 2005; Duong et al., 2019). В дополнение активируются транскрипционные факторы *sox9* и *NF1A* (Kang et al., 2012). Модуляторное влияние оказывают сигнальные молекулы WNT, BMP и SHH, которые подавляют пронеуральные гены *Ngn1* и *Ngn 2* в клетках радиальной глии (Freeman, 2010). Ядерный фактор NF1A индуцирует GLAST в прогениторах глиальных клеток (Namihira et al., 2009). Регуляторная активность всех этих факторов приводит к деметилированию и экспрессии специфических генов астроцитов, таких как GFAP, GLAST и S100 β (Kanski et al., 2014; Molofsky, Deneen, 2015). В развивающейся коре мозга грызунов астроцит-специфические гены в норме начинают деметилироваться на E14.5, однако астроциты удается выявить по морфологическим и молекулярным признакам начиная с E17–18 (Natada et al., 2008) и только с использованием определенных маркеров.

МАРКЕРЫ АСТРОЦИТОВ

Идентификация астроцитов является не самой простой задачей. Это связано с тем, что на разных этапах дифференциации и функционального состояния уровень экспрессии маркерных белков меняется и, кроме того, маркеры могут быть общими с другими типами клеток мозга. Отсутствие четких маркеров, как для предшественников, так и для промежуточных стадий дифференциации осложняет анализ развития астроцитов и природы их гетерогенности (Holst et al., 2019). Еще более усложняет характеристику то, что астроциты очень пластичны и размножаются после спецификации (Ge, Jia, 2016).

Одним из наиболее важных и часто используемых маркеров, является глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), который обеспечивает структурную стабильность и подвижность астроцитов. В мозге грызунов в норме высокий уровень экспрессии GFAP характерен для фиброзных астроцитов и очень низкий для протоплазматических, поэтому GFAP не годится для обнаружения всей популяции астроцитов. Интересно, что когда для прослеживания дифференцировочной судьбы астроцитов были созданы трансгенные линии мышей GFAP-Cre, то оказалось, что у них одновременно с астроцитами маркируются и нейральные стволовые клетки (Zhuo et al., 2001; Garcia et al., 2004). Экспрессия GFAP традиционно используется как индикатор созревания астроцитов. Именно на основе анализа GFAP получены данные о механизмах дифференцировки астроцитов и иденти-

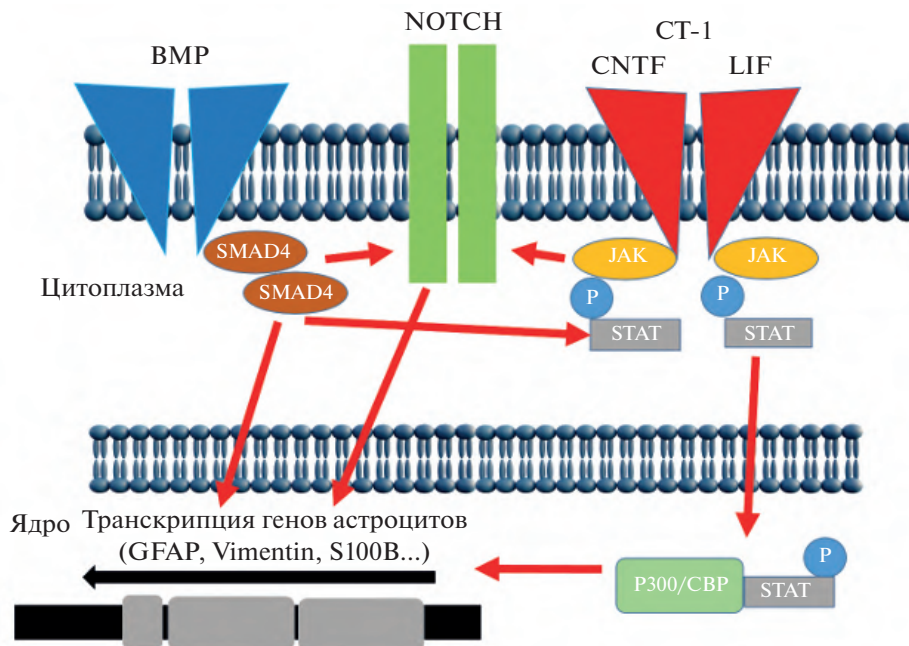


Рис. 2. Три сигнальных пути JAK-STAT, Notch и BMP-SMAD определяют эмбриональное развитие астроцитов. Факторы CNTF, LIF, CT-1 отвечают за инициацию глиогенеза, они активируют канонический сигнальный путь JAK/STAT, что стимулирует транскрипцию астроглиальных генов. Сигнальные пути JAK/STAT и Notch действуют синергетически. Notch также участвует в деметилировании и, следовательно, в эпигенетической регуляции астроцитарных генов во время дифференцировки. Сигнальный путь Notch способствует астрогенезу путем прямой активации промотора GFAP. Лиганды BMP связываются с соответствующими рецепторами и индуцируют фосфорилирование SMAD и его димеризацию с SMAD4, которые в комплексе являются активатором транскрипции астроцитарных генов GFAP и S100β.

фицированы сигнальные пути JAK-STAT, BMP и Notch в качестве центральных регуляторов их дифференцировки из клеток-предшественников (Bonni et al., 1997; Barnabé-Heider et al., 2005). Несмотря на это, все еще остаются вопросы относительно маркирования GFAP в процессе развития. Например, нет понимания того, почему у приматов, включая человека, в коре мозга клетки РГ экспрессируют GFAP уже в самом начале нейрогенеза, тогда как у грызунов он начинает экспрессироваться, когда нейрогенез практически завершен (Holst et al., 2019; Allerano et al., 2021).

Среди генов-маркеров, которые экспрессируются в ходе дифференцировки астроцитов выделяют белки, связанные с мембраной GLT1, Cx43, Cx30, Kir4.1 и Aqp4; цитоплазматические белки GFAP, S100b, AldoC и GS, и секреторные белки Thbs1, Gpc4, Gpc6, Hevin и SPARC (Raponi et al., 2007; Allen, Eroglu, 2017; Farhy-Tselnicker, Allen, 2018; Akdemir et al., 2020). Аквапорин 4 (AQP4) и коннексины (Cx43, 30) используются для выявления контактов отростков-ножек астроцитов, однако они также экспрессируются в нейронах, олигодендроцитах и эпендимных клетках. Хотя транспортеры глутамата GLT-1, GLAST экспрессируются в астроцитах и нейронах, считается, что все же 80% общего белка GLT-1 определяется в

астроцитах гиппокампа (Furness et al., 2008). Большей специфичности маркирования удалось достичь на трансгенных мышах. Миллер использовал специфическую область промотора GLT-1 для создания трансгенных мышей, на которых обнаружил новые типы астроцитов в сером веществе в коре мозга (Miller et al., 2019). На мышах, полученных при скрещивании линий Aldh1L1-GFP с EAAT2-tdtomato удалось выявить селективную популяцию астроцитов, локализованных в слоях I и II в коре (Morel et al., 2019).

Интересно, что астроциты мозга человека хорошо распознаются антителами к мембраносвязанному белку *CD44*, которые выявляют детали их морфологии до такой степени, которая невозможна для антител к *GFAP* (Sosunov et al., 2014). Недавно представлен новый поверхностный маркер астроцитов человека *CD49f*, не связанный с их реактивностью, который можно применять для выявления фетальных и iPSC астроцитов человека (Barbar et al., 2020). Транскрипционный фактор *Sox9* определен как специфичный маркер астроцитов взрослого мозга, в отличие от фактора *NFIA*, который обнаруживается в некоторых классах нейронов и клетках-предшественниках олигодендроцитов (Sun et al., 2017).

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА АСТРОЦИТОВ

По окончании фазы пролиферации астроциты проходят поэтапное созревание, когда транзиторные популяции приобретают уникальные морфологические и молекулярные свойства. Исследования генетических траекторий клонов предшественников астроцитов в спинном мозге мышей *in vivo* и на клетках человека *in vitro* с применением молекулярного профилирования выявили двухфазную модель индукции генов. На ранней фазе экспрессируются гены клеточного цикла и цитоскелета, а в более поздней, канальные и метаболические гены. Интересен тот факт, что в дифференцированных астроцитах обнаружена экспрессия многих генов активных в раннем развитии, это предполагает сохранение ими ювенильных черт и пластичности (Zhang et al., 2016).

За время развития нейроморфологии были охарактеризованы сотни типов нервных клеток, в то время как паренхимные астроциты, несмотря на морфологическую и функциональную неоднородность, продолжают классифицировать на два типа: протоплазматические и фиброзные в зависимости от структуры и расположения (Sofroniew, Vinters, 2010). Протоплазматические астроциты занимают пространство среди нервных клеток. Те из них, которые располагаются между нейронами и эндотелиальными клетками сосудов являются частью, так называемой нейро-васкулярной единицы (Iadecola, 2017; Stackhouse, Mishra, 2021).

В настоящее время стало ясно, что протоплазматические астроциты развивают намного более сложную сеть отростков, чем полагали ранее. Через неделю после появления клетки имеют мало отростков, через две недели число ветвлений и объем занимаемых ими территорий значительно увеличивается, а к концу третьей недели на отростках образуется множество новых точек роста, от которых вырастают крошечные дистальные выросты, перисинаптические астроцитарные отростки (ПАО). Эти отростки размером менее 50 нм придают клетке “губчатую” морфологию и не являются GFAP (Bushong et al., 2004; Freeman, 2010). В это же время наложение друг на друга основных отростков у соседних астроцитов становится минимальным, и клетки распределяются по четким территориям (Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007; Farhy-Tselnicker, Allen, 2018). При этом посредством щелевых контактов между отростками, астроциты объединяются в мелкие и крупные сети. Например, в сером веществе коры мозга сети образуются из 50–100 астроцитов, объединенных вместе (Houades et al., 2008).

Перисинаптические астроцитарные отростки подрастают к синапсам и образуют с ними тесный контакт (Farhy-Tselnicker, Allen, 2018). В сером веществе коры мозга ПАО имеют разветвления, которые охватывают пре- и постсинапсы, а кроме

того, образуют прямые контакты с капиллярами, так называемыми перикапиллярными отростками или ножками астроцитов (endfeet). ПАО одного астроцита контактируют со многими тысячами синапсов, активность которых они модулируют посредством двунаправленной сигнализации. ПАО охватывают синапсы в различной степени в зависимости от области мозга и нервной сети. Например, в коре мозжечка ПАО клеток Бергмановской глии (специализированные астроциты мозжечка) полностью покрывают большинство синапсов, тогда как в области CA1 гиппокампа ПАО проникают лишь в половину синапсов и только частично (Santello et al., 2019). Несмотря на развитие современных высокоточных методов, детальная морфологическая классификация подтипов протоплазматических астроцитов затруднена. Сложные структуры ПАО плохо поддаются микроскопическому анализу, однако, прогресс в развитии методов визуализации позволит решить эту проблему (Носова и др., 2021; Minge et al., 2021).

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АСТРОЦИТОВ

Астроциты — электрически не возбудимые клетки, которые используют специфические механизмы влияния на формирование и функционирование синапсов, как во время развития, так и у взрослых млекопитающих. Одним из основных мессенджеров являются Ca^{2+} волны, которые играют роль посредника в коммуникации между астроцитами, астроцитами и нейронами и, между астроцитами и другими глиальными клетками (Torres, 2012; Швалев и др., 2018). Нарушение нормального баланса кальциевых ионов в астроцитах сопровождается многими патологическими проявлениями в ЦНС, в частности, такие как эпилепсия и болезнь Паркинсона (Гомазков, 2019; Walrave et al., 2020; Bantle et al., 2021). Перисинаптические отростки астроцитов несут многие метаболитные и ионотропные рецепторы к нейромедиаторам, благодаря которым способны отслеживать текущее функциональное состояние синапса. Активация этих рецепторов генерирует динамические Ca^{2+} волны, которые наблюдаются как в клеточных телах, так и в дистальных отростках астроцитов (Allen, Eroglu, 2017; Браже и др., 2019). Скорости распространения кальциевых волн различаются в ПАО и в соме с крупными ветвями. Астроциты дифференциально реагируют на активность синапсов, с которыми связаны тонкими отростками, и других, где, они взаимодействуют с глобальными популяциями клеток через крупные отростки (Khakh, Sofroniew, 2015; Farhy-Tselnicker, Allen, 2018).

Важнейшей формой ответа астроцита на нейротрансмиттеры является повышение уровня внутриклеточного кальция, что, в свою очередь,

может приводить к высвобождению из астроцитов молекул-передатчиков, таких как глутамат, D-серин, АТФ/аденозин или ГАМК, называемых глиотрансмиттерами (Agaque et al., 2014). Для функции мозга чрезвычайно важно, что глиотрансмиттеры могут модулировать активность не только самих астроцитов, но и окружающих их нейронов (Parouin et al., 2017). Здесь нужно подчеркнуть, что кальциевые волны, которые генерируют астроциты, медленнее, чем нейротрансмиссия в нервных клетках, поэтому возникает немало вопросов об особенностях их регуляторной функции. Улучшенные методы кальциевой визуализации обнаружили пространственно-временное разнообразие астроцитарных Ca^{2+} сигналов, которые могут лежать в основе способности астроцитов кодировать и обрабатывать различные паттерны синаптической активности (Bindocci et al., 2017).

Астроциты, располагающиеся во всех слоях и всех областях коры мозга взрослых млекопитающих, функционально различаются, это связывают как с их происхождением, так и расположением в мозге (Lozzi et al., 2020). Гетерогенность может закладываться в раннем развитии и быть связанной с тем, что клетки нейроэпителлия представляют смесь предшественников, возникших в разное время в разных областях нервной трубки (Bayraktar et al., 2014). Кроме того, сами астроциты возникают разными путями и в разное время, что так же предопределяет их гетерогенность. Протоплазматические и фиброзные астроциты образуются из различных линий предшественников, что показано с использованием ретровирусных векторов для прослеживания судьбы клеток и иммуногистохимии (Parnavelas, 1999; Garcia-Marques, Lopez-Mascaraque, 2013). Кроме того, различия в фенотипах протоплазматических астроцитов связывают не только с пространственным локусом их происхождения, но и с типом клетки материнской РГ. Распределение астроцитов по регионам мозга идет вслед за нейронами, в результате чего формируются структуры, содержащие оба типа клеток. Ранее считалось, что в коре мозга астроглиальные клоны мигрируют радиально по отростку РГ вслед за нейронами и остаются в пределах той же самой колонки (Magavi et al., 2012). Однако сейчас методом секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq) с пространственной реконструкцией в коре головного мозга взрослых мышей и человека обнаружено наличие слоев астроцитов, не совпадающих со слоями нейронов (Bayraktar et al., 2020). Очевидно, что гетерогенность астроцитов намного шире, и она только начинает открываться благодаря современным методам молекулярно-генетического анализа.

Если кортикальные астроциты быстро размножаются в течение первой постнатальной недели, то динамика пролиферации астроцитов в подкорковых областях мозга мышей иная. В гипоталамусе

обнаружено меньшее число пролиферирующих астроцитов по сравнению с корой в течение первой постнатальной недели, однако с П15 по П30 она становится более активной, чем в коре и по проценту пролиферирующих астроцитов, и по плотности их расположения (Shoneye et al., 2020). В спинном мозге клетки РГ переключаются на генерацию глии (примерно на Э12.5 у мыши), что регулируется фактором *Scl* (также известным как *Tal1*) из семейства bHLH и гомеодоменными белками *Rax6* и *Nkx6.1*. Экспрессия *Scl*, ограниченная вентральным р2-доменом, способствует генерации астроцитов и, одновременно, подавляет продукцию транскрипционного фактора *Olig2* и олигодендроцитов (Miyoyama et al., 2005). Экспрессия *Rax6* и *Nkx6.1* разграничивает домены р1, р2 и р3, что приводит к выделению трех молекулярно различных субпопуляций астроцитов в белом веществе спинного мозга (Hochstim et al., 2008). Молекулярное и функциональное разнообразие астроцитов регулируют паттерны сигналов, распределенные в пространстве и времени, которые к настоящему не совсем определены и требуют тонкого методологического решения (Lozzi et al., 2020).

АСТРОЦИТЫ – УНИКАЛЬНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ

Среди многочисленных детально охарактеризованных функций астроцитов, их взаимодействие с нейронами посредством регуляции активности синапсов с предполагаемым вкладом в обработку информации и когнитивные процессы, сегодня активно изучается и остро дискутируется (Santello et al., 2019). К настоящему времени многими исследованиями доказано, что протоплазматические астроциты с их тончайшими перисинаптическими отростками, которые несут множество рецепторов, являются неотъемлемыми функциональными элементами синапсов (Шушарина и др., 2018; Khakh, Deneen, 2019). Тесно контактируя с пре- и постсинапсами нейронов через ПАО, астроциты активно участвуют в утилизации, рециркуляции и синтезе нейротрансмиттеров. Их способность быстро удалять избыток нейротрансмиттеров из синаптической щели гарантирует эффективность синаптической передачи и поддержание возбудимости нейронов.

В мозге глутамат является одним из важнейших возбуждающих нейротрансмиттеров, однако его избыток чрезвычайно токсичен для нейронов. Число глутаматергических синапсов, контактирующих с астроцитами, различается в разных отделах мозга: от 60–90% в мозжечке, 90% в области поля баррелов в коре, 50–90% в гиппокампе и 80% в стриатуме (Farhy-Tselnick, Allen, 2018).

Астроциты захватывают глутамат из синаптической щели используя транспортер GLT-1 и ЕААТ и перерабатывают в глутамат-глутаминовом цикле (Bak et al., 2006; Allen, Eroglu, 2014).

Астроциты очень чувствительны к активности глутаматергических нейронов и в норме постоянно регулируют синаптическую передачу и пластичность в этих синапсах (Angulo et al., 2004). Однако если, например, при патологии нарушается обратный захват глутамата астроцитами, то из-за его переизбытка в межклеточном пространстве может активироваться токсическое повреждение нейронов (Колосеев, 2015; Limbad et al., 2020). Имеется достаточно доказательств того, что астроциты способны регулировать синаптическую активность, вызванную и другими нейротрансмиттерами, такими как, ГАМК, ацетилхолин, АТФ и норадреналин во многих отделах мозга (Zorec et al., 2012).

После поглощения астроцитами глутамат метаболизируется с участием фермента глутаматдегидрогеназы (GDH), у большинства млекопитающих он присутствует в форме GDH1, тогда как у человека обнаружены две изоформы GDH1 и 2 (Zhang et al., 2016). Исклительная экспрессия двух изоформ фермента в мозге человека означает усиленное окисление глутамата и эффективный глутамат-глутаминовый цикл, свидетельствующий о более устойчивой глутаматергической активности.

Интересно, что астроциты выступают не только в роли регуляторов глутаматергических синапсов во взрослом мозге, но и непосредственно участвуют в их формировании при развитии (Shan et al., 2021). Как уже было сказано, астроциты массово возникают в коре мозга в период постнатального развития, когда идет активное развитие аксонов и дендритов нервных клеток. Именно в это время незрелые астроциты экспрессируют нейротрофические и синаптогенные факторы. Среди них NGF, BDNF, GDNF и тромбоспондин, хевин, глипикан, TNF α , WNT, TGF β , SPARC, холестерин, хондроитинсульфат протеогликан, которые поддерживают рост аксонов и дендритов (Allen, Eroglu, 2017), и стимулируют формирование и функционирование глутаматергических синапсов, доминирующих в коре мозга (Verkhatsky, Nedergaard, 2018).

Чрезвычайно важно, что отростки астроцитов одновременно с формированием контактов с синапсами, подрастают к кровеносным сосудам и капиллярам, полностью покрывая их к 20 дню после рождения, что завершает построение гематоэнцефалического барьера и образование нейроваскулярных единиц (Blanchette, Daneman, 2015; Kugler et al., 2021). Благодаря этим контактам формируются тонкие взаимоотношения астроцитов с эндотелием сосудов, посредством которых

они регулируют энергетический обмен и кровоток, используя кальциевые волны и другие механизмы.

По результатам вышеприведенных работ сложилась новая концепция о “трехчастном синапсе” (Tripartite synapses) (Araque et al., 1999; Perea et al., 2009; Гомазков, 2019), в основе которой лежит представление о том, что астроциты не просто изолируют синапсы своими отростками, а принимают и активно регулируют синаптическую активность. В соответствии с этой концепцией, астроциты становятся участниками передачи информации в нейронных сетях, так как в ответ на активность нейронов в синапсах, они регулируют синаптическую передачу. В их функцию входит: удаление из синаптической щели глутамата (или другого трансммиттера), его транспортировка и переработка; регуляция кровотока и захват глюкозы из капилляров с переносом полученных продуктов (глутамина и лактата) обратно в пресинапс (рис. 3). Все это обеспечивает длительность синаптической передачи и поддержание долговременной потенции (Tang et al., 2014; Farhy-Tselnick, Allen, 2018; Perez-Catalan et al., 2021). Эти взаимодействия дополняются еще и нейротрофической поддержкой, например, BDNF, созревание которого регулируется астроцитами, что необходимо для стабилизации синаптической передачи (Vignoli et al., 2021). В настоящее время концепция “трехчастного синапса” находит множество экспериментальных подтверждений. Есть данные о том, что долговременная потенция (LTP) в гиппокампе связана с изменением пространственных отношений между ПАО и синапсами, показано, что большее количество ПАО тесно контактируют с активированными синапсами во время индукции LTP (Bernardinelli et al., 2014; Santello et al., 2019). Известно, что передача сигналов норадреналина через β -рецепторы, которая способствует консолидации памяти, происходит при высвобождении лактата из астроцитов. Гликоген, запасенный в астроцитах и переработанный в лактат, энергетически обеспечивает молекулярные изменения в нейроне, необходимые для формирования долговременной памяти (Tang et al., 2014; Gao et al., 2016). Активность астроцитов в синаптических контактах влияет на стабилизацию синаптической передачи и долговременную потенцию, и соответственно на процессы обучения и памяти (Wade et al., 2011; Loprinzi, 2019; Vignoli et al., 2021; Zhang et al., 2021). Важно, что в дополнение к стабилизации синапсов, астроциты играют важную роль в их элиминации, так же зависящей от активности нейронов (Lee et al., 2021). Эта фагоцитарная функция расширяет возможности астроцитов в регуляции синаптических взаимодействий между нейронами.

В недавно вышедшем обзоре, где обсуждается функция астроцитов в переработке информации

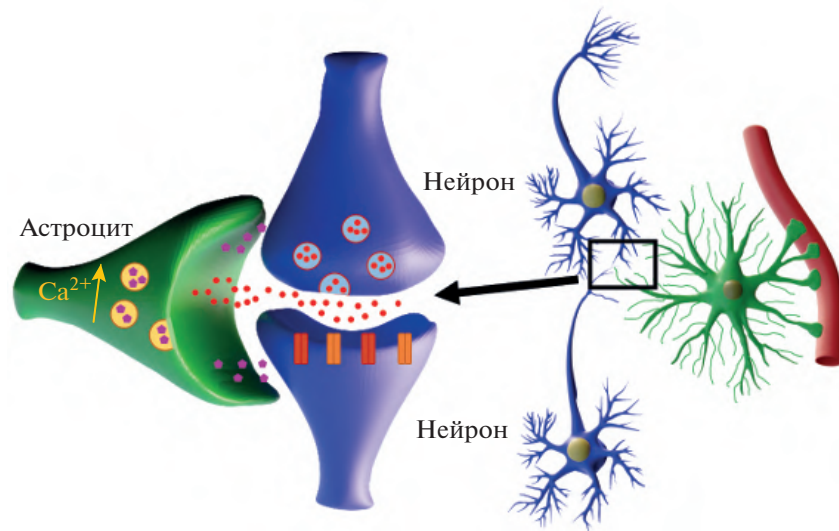


Рис. 3. Трехчастный синапс. Участие астроцита в регуляции активности синапса. Перисинаптические отростки астроцита окружают синапсы и захватывают глутамат (красные кружки) из синаптической щели, который, в свою очередь, активирует в астроците повышение внутриклеточного Ca^{2+} и выброс глиотрансмиттеров (малиновые звездочки). Другими отростками астроцит захватывает глюкозу из капилляра. В результате астроцит осуществляет метаболическую и глиотрансмиттерную регуляцию активности синапса.

и когнитивных нарушениях, авторы выделяют несколько уровней синаптической сигнализации астроцитов (Santello et al., 2019). Во-первых, нано уровень, где сигнал от ПАО влияет на синаптическую активность и пластичность на уровне точечных локальных взаимодействий. Во-вторых, микро уровень, когда один астроцит координирует синаптические ансамбли, находящиеся на его территории. В-третьих, уровень синцития, когда пространственно разные группы астроцитов (объединенные щелевыми контактами) формируют функциональные домены соответственно нескольким нейрональным сетям, и совместно координируют их возбудимость и энергетические потребности. И, наконец, четвертый мезо уровень, когда астроциты из нескольких областей мозга согласованно реагируют на активность дистантных нервных волокон и тем самым оказывают генерализованное влияние на состояние мозга (Santello et al., 2019). Хотя астроциты не могут модулировать синапсы в масштабе времени синаптических событий, считается, что их более медленные Ca^{2+} волны регулируют базовые свойства синапса, высвобождение медиатора и постсинаптическую возбудимость. Накопленные за последние десятилетия данные указывают на то, что механизмы и функциональные последствия передачи сигналов в системах астроцит-нейрон много сложнее, чем думали изначально (Perez-Catalan et al., 2021). Острые дискуссии возникают в связи с тем, что новые данные ставят под сомнение традиционную парадигму, согласно которой функция мозга является исключительно результатом деятельно-

сти нейронных сетей. Новая концепция постулирует, что функция нервной системы фактически возникает в результате совместной активности нейро-глиальных сетей (Adamsky et al., 2018; Farhy-Tselnicker, Allen, 2018; Santello et al., 2019). Конечно, есть много веских причин полагать, что у астроцитов и так достаточно важных функций, чтобы не претендовать на когнитивную деятельность (Verkhatsky, Nedergaard, 2018). Тем не менее, уже сейчас очевидно, что астроциты выходят из “тени” нервных клеток и становятся их равными партнерами. Межклеточная коммуникация нейронов и глии и их сетевые взаимодействия широко исследуются, поскольку они могут открыть новые пути к познанию функции мозга.

УЧАСТИЕ АСТРОЦИТОВ В ПОВРЕЖДЕНИИ МОЗГА И РЕГЕНЕРАЦИИ

Совершенно иная, но не менее интригующая функция астроцитов связана с их способностью к пластическим перестройкам и участию в регенерации нервной системы. Хорошо известно, что в мозге постмитотические клетки, такие как нейроны и олигодендроциты, не могут возобновить деление даже после травмы, и подвергаются полиплоидии или гибели при активации генов клеточного цикла (Arendt, 2012). В нормально функционирующем мозге астроциты так же находятся в стабильном состоянии, но в ответ на травму они резко повышают уровень экспрессии GFAP в отростках, изменяют молекулярные свойства и пролиферируют, активируя каскад внутриклеточных

изменений, который получил название реактивный глиоз (Sofroniew, Vinters, 2010). Глиоз модулируется цитокинами, среди них наиболее детально изучены роли интерлейкина-1бета (IL-1 β), интерферона (IFN γ) и трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- β 1) (John et al., 2003). Традиционно реактивный астроглиоз рассматривается как процесс, приводящий к патологическим изменениям в ЦНС (Sofroniew, Vinters, 2010; Robel et al., 2015). На границе зоны повреждения астроциты образуют барьер из своих клеточных тел и отростков, который блокирует рост аксонов и нормальное проведение импульсов, и может служить причиной развития ряда заболеваний мозга, например, эпилепсии (Robel et al., 2015). При незначительных повреждениях астроциты увеличивают отростки и активируют в них экспрессию GFAP, образуя узкие плотные волоконные рубцы, а при обширных травмах клетки начинают пролиферировать через 3–5 сут после травмы, и многие повторно входят в клеточный цикл через неделю (Susarla et al., 2014). Например, в зонах мозга, окружающих очаг поражения после инсульта, идет пролиферация астроцитов и обширное разрастание их отростков далеко за пределы их собственной стабильной территории. Новые границы отделяют и изолируют поврежденную ткань от соседней жизнеспособной нервной ткани, что может приводить к изменению архитектуры ткани и функции мозга (Sofroniew, Vinters, 2010; Sofroniew, 2020). При тяжелых поражениях мозга в астроцитах повышается экспрессия не только генов, кодирующих GFAP, но и S100b, Aldh1l1 генов, происходит гипертрофия клеточных тел и отростков. Более того, часто наблюдается взаимодействие реактивных астроцитов с другими типами клеток (например, фибробластами), совместно образуя сложный глио-мезодермальный рубец (Sofroniew, Vinters, 2010).

Молекулярные исследования реактивных астроцитов при различных повреждениях мозга показывают изменения транскриптомов, которые существенно различаются как по числу, так и по типам генов, экспрессия которых меняется (Zamanian et al., 2012). Основные изменения обнаружены в генах, кодирующих белки внеклеточного матрикса, что показывает способность реактивных астроцитов модифицировать микроокружение в процессе формирования глиального рубца. В реактивных астроцитах высоко экспрессируются гены не только GFAP, но и гены виментина и нестина, что свидетельствует о понижении уровня их дифференцировки вследствие травмы (Цыба и др., 2020). Другие группы генов, экспрессия которых повышена в реактивных астроцитах, кодируют цитокины, белки презентации антигена и пути комплемента, указывая на роль астроцитов в иммунной реакции при повреждении. В то же время считается, что однозначно интерпретировать эти

результаты затруднительно, поскольку транскриптомомы могут меняться и на разных стадиях развития патологического процесса, например, в разное время после инсульта (Zamanian et al., 2012). Хотя представления о механизмах этих процессов далеко не полны, а порой противоречивы, доминирующая точка зрения сводится к тому, что реактивные астроциты провоцируют нейротоксичность, воспаление, увеличение уровней провоспалительных факторов (таких как интерлейкины, IFN- γ , TGF β , ROS, NO), глутамата, S100b, а глиальные рубцы рассматриваются как блокаторы регенерации аксонов (Becerra-Calixto, Cardona-Gómez, 2017).

Однако из каждого правила есть исключения, и в ряде случаев реакция глии может быть позитивной, активирующей восстановление и регенерацию нервной ткани (Li et al., 2008; Sofroniew, Vinters, 2010; Sofroniew, 2020). Предполагается, что реактивные астроциты способны приобретать свойства малодифференцированных клеток, и благодаря высвобождению нейротрофических (NGF, BDNF, CNTF), ангиогенных факторов (VEGF), и модуляции иммунного ответа способствуют выживанию нейронов и ангиогенезу (Goss et al., 1998; Burns et al., 2009; Zamanian et al., 2012). Помимо того, они экспрессируют аполипротеин-E (АПОЕ), тромбоспондин, SPARK и хевин, которые совместно с нейротропными факторами активируют синаптогенез и развитие новых синаптических контактов на нейронах в области повреждения (Chiarelli et al., 2021).

Таким образом, реактивные астроциты, помимо негативного влияния, при определенных обстоятельствах оказывают нейропротекторное и противовоспалительное действие. В этих случаях они проявляют пластичность и демонстрируют свойства постнатальных астроцитов, которые обеспечивают появление новых синапсов и их поддержание, рост нейронов и реорганизацию нейронных сетей (Becerra-Calixto, Cardona-Gómez, 2017).

ПЛАСТИЧНОСТЬ АСТРОЦИТОВ ВЗРОСЛОГО МОЗГА

Базой для раскрытия пластических свойств астроцитов послужили исследования в области нейральных стволовых клеток. Фундаментальный вклад в изучение астроцитов в онтогенезе внесли Магдалена Гётц и ее сотрудники. Проследивая изменения реактивных астроцитов *in vivo*, они установили, что именно дифференцированные астроциты, а не циркулирующие глиальные предшественники (NG2), отвечают на повреждение мозга гипертрофией, повышением уровня GFAP и пролиферацией (Mori et al., 2005). Более того, когда эти реактивные астроциты помещали в культуру *in vitro* на среды для стволовых клеток, они образовывали нейросферы и вели себя как нейральные стволовые клетки (Buffo et al., 2008). Продол-

жая исследование уже с генетическим картированием клонов реактивных астроцитов в коре мозга взрослых мышей при травме *in vivo*, было обнаружено, что, хотя большинство пролиферирующих клеток вновь возвращается к судьбе астроцитов, некоторые приобретают свойства стволовых клеток (Buffo et al., 2008). Вслед за этой пионерской работой, многими было показано, что астроциты в реактивном состоянии дедифференцируются и проявляют свойства нейральных стволовых клеток (Robel et al., 2011; Shimada et al., 2012; Sirko et al., 2013; Dimou, Gotz, 2014; Magnusson et al., 2014).

Естественно, возник вопрос, какова природа пластичности и нейрогенных потенциалов взрослых астроцитов? Ответ на него находится в хорошо документированных исследованиях стволовых клеток при развитии нервной ткани. Из них становится ясно, что клетки нейроэпителия, стволовые клетки радиальной глии, астроциты и НСК взрослого мозга являются единой линией клеток, сочетающих глиальные и стволовые свойства (Doetsch, 2003; Mori et al., 2005; Kriegstein, Alvarez-Buylla, 2009). Сегодня доказано, что клетки нейроэпителия переходят в стволовые клетки радиальной глии, которые генерируют нейроны и затем глию, после чего РГ сама трансформируется в астроциты, расселяющиеся по всему мозгу. Небольшая часть клеток РГ сохраняется в специализированных нишах, где они функционируют уже как стволовые клетки взрослого мозга (Doetsch et al., 1999; Merkle et al., 2004). НСК взрослого мозга являются специализированными астроцитами, несущими ключевые морфологические и молекулярные характеристики нейроэпителия, включая экспрессию маркеров *nestin*, *BLBP* и *Sox2* (Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Они обеспечивают постоянное восстановление нейронов и глии в нейрогенных областях взрослого мозга (Bayraktar et al., 2014). Помимо НСК, оказалось, что и паренхимные астроциты, находящиеся вне нейрогенных ниш, при повреждении могут проявлять повышенную пластичность, подобную НСК, и продуцировать нейроны (Buffo et al., 2006; Sirko et al., 2013; Sofroniew et al., 2015). Было проведено сравнение НСК субвентрикулярной зоны с паренхимными астроцитами стриатума и коры мозга мышей путем секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq). Исследование показало значимую общность в генах НСК и астроцитов, в которых прослеживается континуум от астроцитов к покоящимся стволовым клеткам и далее к активированным стволовым клеткам (Llorens-Bobadilla et al., 2015). Активацию транскрипционной программы стволовых клеток в паренхимных астроцитах связывают с тем, что они обладают многими общими свойствами и имеют схожие транскрипционные сети с НСК взрослого мозга (Magnusson et al., 2020). Астроциты со свойствами покоящихся нейральных ство-

ловых клеток, получили название “латентные прогениторы” (Alunni, Bally-Cuif, 2016; Frisén, 2016; Zamboni et al., 2020), к ним еще относятся клетки Мюллеровой глии в сетчатке, которые способны пролиферировать в ответ на факторы повреждения и активировать нейрогенную программу (Gao et al., 2021). В настоящее время накапливается все больше данных в пользу высокой пластичности паренхимных астроцитов, в регуляции которой участвуют эпигенетические механизмы и внутренние программы транскрипции, определяющие функции астроцитов и контроль над их регенеративным и дегенеративным потенциалом (Pavlou et al., 2019).

РЕГУЛЯЦИЯ НЕЙРОГЕННОЙ ПРОГРАММЫ В ПАРЕНХИМНЫХ АСТРОЦИТАХ

Усиление скрытой нейрогенной способности и репрограммирование астроцитов на нейрогенную программу может происходить в естественных условиях при некоторых травмах мозга, а в эксперименте оно осуществляется посредством повышения эктопической экспрессии паннейральных и ряда других факторов (Ofenbauer, Tursun, 2019). Разработанные на сегодняшний день молекулярно-генетические алгоритмы включают нейрогенные транскрипционные факторы (ТФ), факторы плюрипотентности, сигнальные молекулы и факторы роста, малые молекулы, системы CRISPR-Cas и др. Разные сочетания факторов репрограммируют астроциты сразу в нейроны или через дедифференцировку в нейральные прогениторы или НСК, включающие пролиферативную стадию (Magnusson et al., 2020; Wang et al., 2021) (рис. 4). Хотя термин “прямое нейрональное репрограммирование” был предложен Фербухеном в 2010 г. (Verbuchen et al., 2010), впервые обратила внимание на регуляторное влияние уровня экспрессии нейрогенных транскрипционных факторов М. Гётц и сотр. Они обнаружили, что повышенная экспрессия паннейронального *Pax6* в культивируемых постнатальных астроцитах подавляла активность GFAP и репрограммировала клетки в сторону нейронной дифференцировки с активацией β -тубулин-III (Heins et al., 2002). В дальнейшем транскрипционные факторы для репрограммирования выбирали согласно их роли в дифференцировке нейронов во время развития мозга. Было установлено, что повышение экспрессии ТФ *Ngn2* и *Ascl1* (последний представляет пионерный фактор, делающий хроматин более доступным для факторов транскрипции (Raposo et al., 2015)), совместно или по отдельности репрограммируют астроциты в нейроны *in vitro* (Berninger et al., 2007). Используя ретровирусный вектор (VSV-G) с генами *Pax6*, *Ngn2*, *Mash1*, и репортерным GFP, методами видеомикроскопии и иммуногистохимией авторы (Berninger et al., 2007)

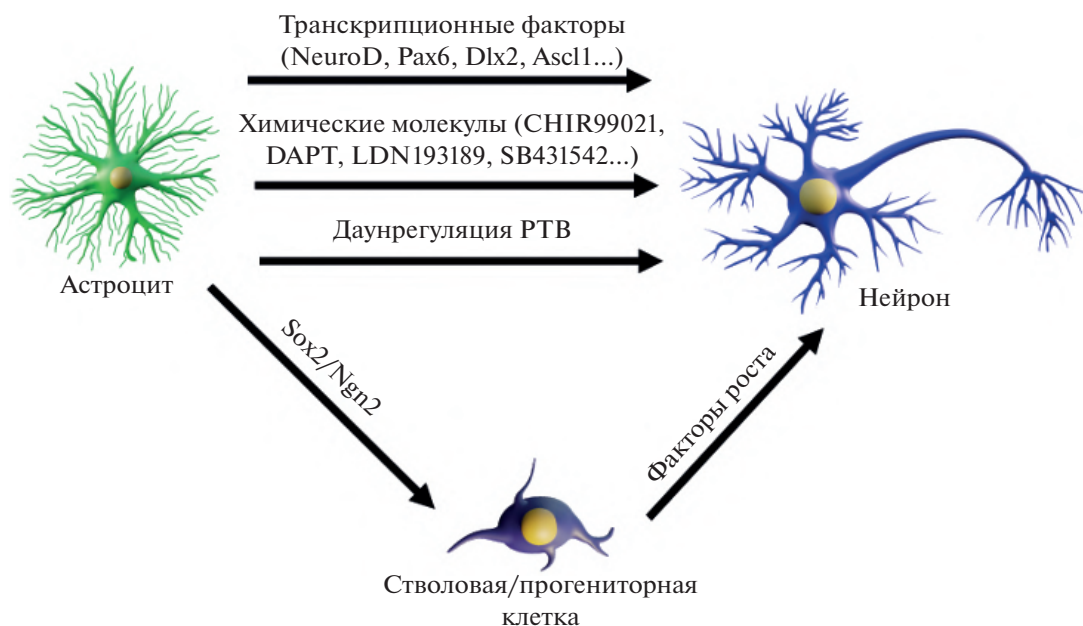


Рис. 4. Основные пути репрограммирования астроцитарных клеток в нейроны.

показали изменение морфологии астроцитов в сторону нейроноподобной. Индуцированные клетки сначала экспрессировали маркер незрелых нейронов *Tuj1*, а затем *MAP2* и *NeuN*, нейроны приобретали глутаматергическую или гамкергическую идентичность, демонстрировали спонтанную активность и генерировали потенциалы действия (Berninger et al., 2007). По данным японских исследователей, понижение дифференцировки мышечных астроцитов в культуре происходит на фоне усиления ацетилирования H3K9K14 вблизи *NeuroG1* и *NeuroG2* (Hirabayashi et al., 2009). Предполагается, что многие нижестоящие мишени у этих ТФ не блокируются, поэтому повышение их экспрессии может напрямую привести к репрограммированию астроцитов (Robel et al., 2011).

В настоящее время большое число пронеуральных ТФ используется для конверсии астроцитов: *Ascl1*, *Ngn2*, *NeuroD1*, *Pax6* и *Dlx2*, *Brn2*, *Myt1l*, *Zfp238* и др. Регион специфичные астроциты коры головного мозга, мозжечка и спинного мозга репрограммируются с помощью ТФ с разной эффективностью. Ряд авторов связывает это с различиями в уровне экспрессии сигнального пути Notch, который играет важную роль в поддержании стволовых клеток и репрограммировании (Hu et al., 2019).

Как уже было сказано, репрограммирование астроцитов в нейроны может проходить без пролиферации или через последовательные деления с переходными состояниями предшественника. Енс Магнуссон полагает, что прямое превращение мало перспективно из-за того, что один астроцит дает один нейрон, в то время как дедифференцирован-

ный пролиферирующий астроцит образует 30–40 нейробластов (Magnusson et al., 2020). В процессе дедифференцировки в менее специализированную стадию астроциты приобретают сходный с НСК транскрипционный профиль и пролиферативную активность, которая находится под контролем сигнальной системы Notch (Magnusson et al., 2014). Поэтому у мутантных мышей с подавленной сигнальной системой Notch астроциты способны пролиферировать и генерировать новые нейроны в ответ на повреждение мозга. Недавно, методом секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq) были получены молекулярные портреты астроцитов в состоянии репрограммирования, когда сигнальная система Notch заблокирована фактором *Rbpj*. В этой экспериментальной ситуации кортикальные астроциты понижали дифференцировку, разворачивали нейрогенную программу и на молекулярном уровне с удивительной точностью воспроизводили кортикальный нейрогенез (Zamboni et al., 2020).

Кроме нейрогенных ТФ, влиять на судьбу астроцитов можно путем регуляции экспрессии других ТФ и мишеней. Факторы плюрипотентности *Nanog*, *OCT4*, *FOXP1*, *SOX2*, *Klf-4*, *c-MYC* и *CEND1* могут по отдельности или в сочетании друг с другом дедифференцировать постмитотические астроциты (Corti et al., 2012; Niu et al., 2013; Bulstrode et al., 2017). При анализе клеточных клонов в процессе репрограммирования астроцитов человека оказалось, что большинство клеток со сверхэкспрессией *CEND1* проходит от одного до двух асимметричных делений до дифференцирования в нейроны (Aravantinou-Fatorou et al., 2021).

Отработанные в культуре клеток методы прямого репрограммирования были воспроизведены *in situ* посредством эктопической экспрессии нейрональных ТФ в резидентных глиальных клетках мозга (Li., Chen, 2016; Gascon et al., 2016). Первые эксперименты выполнены на трансгенных GFAP-Cre мышцах, которым в стриатум инъектировали лентивирусную конструкцию с тремя репрограммирующими генами *Ascl1*, *Brn2*, *Myt1l* и *GFP*. Через 6 недель астроциты (примерно 120 клеток на животное) превращались в NeuN дифференцированные нейроны (Torper et al., 2013; Flitsch, Brüstle, 2019). В дальнейшем оказалось, что астроциты в коре, стриатуме и спинном мозге мышей могут репрограммироваться в глутаматергические и гамкергические нейроны с использованием или одного из факторов NeuroD1, *Ascl1*, *Sox2*, либо в их сочетаниях (Liu et al., 2015; Torper et al., 2015; Gascon et al., 2016; Sharif et al., 2021). Интересный факт обнаружен недавно в ходе транскриптомного анализа при конверсии астроцитов спинного мозга пронейральными факторами *Ascl1* и *Neurog2* *in vitro*. Оказалось, что каждый фактор сначала активирует свою нейрогенную программу, хотя позже они обе приводят к общему состоянию дифференцировки, характеризующей специфический интернейрон V2 (Kempf et al., 2021). В переднем мозге NeuroD1 может эффективно перепрограммировать астроциты в сером веществе коры в функциональные нейроны, в то время как астроциты в белом веществе мало подвержены репрограммированию (Liu et al., 2020). И хотя механизмы этого пока не ясны, очевидно, что разные способности к репрограммированию могут определяться эндогенными особенностями клеток, и возможностью участия микроокружения в этих процессах.

Среди нейрогенных ТФ NeuroD1 по эффективности занимает высокое место, преобразуя около ~90% астроцитов в мозге взрослых мышей в глутаматергические нейроны, включая мышей 14-месячного возраста с моделью болезни Альцгеймера (Guo et al., 2014). В недавних исследованиях было подтверждено, что репрограммирование на основе аденоассоциированного вируса (AAV) с NeuroD1 дает много новых нейронов, возникающих из астроцитов, и одновременно защищает поврежденные нейроны после ишемии мозга у мышей. Морфологические, молекулярные, электрофизиологические исследования продемонстрировали функциональность вновь образованных нервных клеток, а анализ поведения животных показал значительное улучшение как двигательных, так и когнитивных функций после преобразования астроцитов (Chen et al., 2019; Ge et al., 2020). Несмотря на эти оптимистические результаты, нужно отдавать себе отчет в том, что доказательная база репрограммирования астроцитов в нейроны в живом мозге чрезвычайно сложна и требует ра-

боты с линиями Cre-loxP и CreER мышей, тонких молекулярно-генетических методов и специфических маркеров. В настоящее время для доставки рекомбинантных ДНК-векторов ТФ используются ленти-, ретро- и аденоассоциированные вирусы (AAV), каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Сейчас возникла острая дискуссия об эффективности ТФ NeuroD1 в репрограммировании астроцитов в нейроны *in vivo* с доставкой AAV (Chen, 2021). Есть веские причины полагать, что не исключены методические ошибки, связанные с особенностями линий репортерных мышей, токсичностью AAV и возможностью попадания генов-мишеней в нервные клетки, что может приводить к ложным результатам (Xiang et al., 2021). Конечно, потребуется время на разрешение этих проблем, но в результате будут скорректированы методические неточности и установлена реальная эффективность репрограммирования, что очень важно для оценки перспектив регенерации в мозге.

В поисках путей для повышения репрограммирования астроцитов с помощью ТФ пришли к пониманию того, что одним из них может стать модуляция экспрессии сигнальных путей и микроРНК, участвующих в развитии мозга и функционировании взрослых НСК. Еще в работах Сирко с коллегами было установлено, что при острой травме мозга у мышей в реактивных астроцитах, приобретающих свойства НСК, активируется сигнальный путь Shh (Sirko et al., 2013). Далее экспериментально было показано (Yang et al., 2019), что репрограммирование астроцитов с помощью OCT4 значительно повышается при одновременной активации экспрессии Shh. В отношении астроцитов человека известно, что NEUROD1, ASCL1, LMX1A в комплексе с miR-218 и при одновременной активации сигнальных путей Shh и Wnt преобразуют их в дофаминергические нейроны в клеточной культуре и в мозге грызунов (Rivetti di Val Cervo et al., 2017). В модели болезни Паркинсона у мышей астроциты стриатума, трансфицированные лентивирусами с вышеуказанными факторами, превращались в дофаминергические нейроны, которые улучшали двигательное поведение, и именно miR-128 усиливал дедифференцировку астроцитов (Rivetti di Val Cervo et al., 2017). Повышение активности микроРНК, таких как miR-302, miR-367, miR-181a и др., или блокирование (например, miR-124) в сочетании с ТФ существенно влияет на конверсию астроцитов в нейроны (Griffiths et al., 2020).

Другая стратегия направлена на разработку комплексов малых молекул для регуляции экспрессии пронейральных генов с целью замены факторов транскрипции химическим репрограммированием (Das et al., 2019). В ряде работ показано, что малые молекулы, среди которых CHIR99021 (ингибитор GSK3); DAPT (ингибитор γ -секретазы,

подавляет сигнальный путь Notch), LDN193189 (ингибитор сигнального пути BMP) и SB431542 (ингибитор TGF- β /Activin/NODAL через подавление ALK5, ALK4), способны конвертировать астроциты мышей и эмбриональные астроциты человека в функциональные нейроны *in vitro* (Ma et al., 2019; Yin et al., 2019). Нейроны, химически конвертированные из астроцитов человека, переживают более 7 месяцев в культуре, демонстрируя потенциалы действия и синаптическую активность (Yin et al., 2019). Секвенирование РНК (scRNA-seq) выявило изменения транскриптомов астроцитов в процессе преобразования в нейроны, показавшее, что химическое репрограммирование может активировать сигнальный путь SHH в течение 24 часов после воздействия, в результате подавляются многие глиальные гены и гены клеточного цикла. После снижения астроцитарной идентичности возрастает экспрессия пронеуральных генов, участвующих в росте аксона и синаптогенезе. Комплекс малых молекул включает несколько этапов дифференциальной экспрессии генов в астроцитах: активацию сигнальных путей Shh, Wnt/ β -catenin и Notch и подавление TGF- β и JAK/STAT (Ma et al., 2019). Эти работы дают важное представление о молекулярных каскадах, запускаемых комплексом малых молекул, которые приводят к репрограммированию астроцитов в нейроны (Ma et al., 2019; Yin et al., 2019). Несмотря на то, что исследования по химической конверсии *in vivo* находятся на начальной стадии (Ma et al., 2021), они интересны для предполагаемой клинической трансляции, поскольку малые молекулы экономически целесообразны, не иммуногенны, могут нарабатываться в большом количестве и эффективно доставляться через мембрану в клетки.

Иная стратегия репрограммирования астроцитов в дофаминергические нейроны *in vivo* основана на подавлении РНК-связывающего белка РТВ (белок, связывающий полипиримидиновый тракт), который кодируется геном Ptbplb (Qian et al., 2020). Авторы трансдуцировали кортикальные астроциты мышей лентивирусом с РНК против РТВ (shРТВ) и через четыре недели обнаружили от 50 до 80% клеток с морфологией нейронов экспрессирующих shРТВ, окрашенных на Tuj1 и MAP2 и включенных в эндогенные нейронные сети. По всей видимости, астроциты из разных областей мозга могут быть преобразованы в разные подтипы нейронов с использованием этого метода. Аналогичное изменение фенотипа также достигается путем преобразования Мюллеровой глии и астроцитов в нейроны с использованием CRISPR-CasRx для подавления РТВ (Zhou et al., 2020; Russo et al., 2021).

Нет сомнения в необходимости разработки новых эффективных протоколов, однако многие исследователи обращают внимание на то, что не менее важно искать пути поддержания жизнеспособности индуцированных нейронов, защищать их от гибели и обеспечивать дифференцировку.

Известно, что многие вновь образованные нейроны гибнут от ферроптоза в результате генерации избыточных активных форм кислорода (АФК) (Gascon et al., 2017), поэтому пути, направленные на снижение и подавление АФК могут значительно повысить эффективность репрограммирования за счет сохранения образованных нейронов (Barker et al., 2018).

Очевидно, что быстро развившееся направление *in vivo* преобразования астроцитов в нейроны путем прямой конверсии чрезвычайно важно для фундаментальной биологии и регенеративной медицины (Rahman et al., 2021). Одновременно нужно отдавать себе отчет в том, что существует еще множество нерешенных проблем. Среди них, возможность истощения эндогенных клеток; риски возникновения глиальных опухолей; совершенствование систем доставки генов; оценка аутентичности перепрограммированных нейронов на уровне транскриптомов отдельных клеток; анализ репрограммирования астроцитов человека (критически отличных от грызунов) и т.д.

АСТРОЦИТЫ В МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА

Фундаментальные знания по биологии астроцитов главным образом получены в исследованиях на лабораторных животных, и немногие работы подчеркивают различия между астроцитами человека и грызунов (Eilam et al., 2016; Zhang et al., 2016; VigHodge et al., 2019; Li et al., 2021). Если многие типы клеток человека и других видов млекопитающих имеют значительное сходство, то к астроцитам это не относится. Эволюционный процесс удивительным образом отразился в астроцитах гоминид. У человекообразных обезьян и человека астроциты по морфологическим и функциональным свойствам значительно отличаются от других видов млекопитающих. Об астроцитах человека известно, что они начинают возникать со второго триместра развития плода (deAzevedo et al., 2003; Holst et al., 2019), клетки намного крупнее, морфологически сложнее, проявляют большой полиморфизм, и имеют более быструю и обширную синцитиальную кальциевую сигнализацию в сравнении с астроцитами у не приматов (Oberheim et al., 2006, 2009; Goldman, 2020). Исследование астроцитов человека в развитии по понятным причинам затруднены, но данные по зрелому мозгу показывают, что один кортикальный астроцит может охватывать отростками более двух миллионов индивидуальных синапсов (Oberheim et al., 2006). В коре мозга человека описано 4 класса GFAP позитивных клеток, которые относятся к типу протоплазматических астроцитов. По данным физиологических исследований, проведенных на переживающих срезах (приготовленных

из быстро выделенной ткани неокортекса человека), протоплазматические астроциты распространяют волны Ca^{2+} со скоростью 36 м/с, что примерно в четыре раза быстрее, чем у мышей. В слое 1 располагаются тела так называемых межслойных астроцитов, чьи отростки характеризуются извилистой морфологией и простираются на миллиметры в глубину коры через слои 2–4. Наибольшую длину имеют отростки астроцитов находящихся в слоях 2–6. Эти клетки в 2.6 раза больше в диаметре и имеют в 10 раз более длинные GFAP первичные отростки, чем их аналоги у грызунов. Более того, астроциты человека вытягивают от клеточного тела в 10 раз больше отростков GFAP, чем у грызунов. Только в мозге людей обнаружены уникальные поляризованные астроциты в слоях 5–6 коры, отростки которых протягиваются на миллиметры и характеризуются варикозными расширениями с пока еще неизвестными функциями (Falcone et al., 2019; Verkharatsky et al., 2019). В эволюционном отношении важно, что у нечеловеческих приматов протоплазматические астроциты проявляют промежуточный фенотип между грызунами и людьми: они меньше и не так сложны, как у человека, но больше, чем у грызунов. Нельзя исключить, что уникальные свойства морфологии и физиологии астроцитов могут быть как-то связаны с увеличением общего числа глутаматергических нейронов до 80% в мозге человека (Дьяконова, 2022), с регуляцией огромного числа их синапсов и защитой от эксайтотоксического повреждения.

Фиброзные астроциты в белом веществе мозга человека имеют многочисленные перекрывающиеся отростки. Если в мозге грызунов тела астроцитов лежат на поверхности сосуда, где их отростки-ножки образуют розетки, то в мозге человека тела астроцитов лежат вне сосуда, а к его поверхности тянутся их ножки-отростки и сплошь покрывают сосуд (Oberheim et al., 2006, 2009). Как и у грызунов, отростки астроцитов человека образуют щелевые проницаемые контакты с клетками эндотелия, через которые локально регулируют ток крови, транспорт метаболитов и водный обмен посредством кальциевых волн (Iadecola, 2017).

Данные о морфологических отличиях астроцитов в мозге человека и грызунов логично дополняют результаты транскриптомного анализа, из которого следует, что имеются значительные различия в экспрессии генов между человеком и мышами. По мере созревания, астроциты человека демонстрируют повышенную экспрессию генов, участвующих в передаче нервных импульсов, межклеточной сигнализации, метаболизме жирных кислот, клеточной адгезии и в ионном гомеостазе. Гены, кодирующие белки для регуляции передачи сигналов Ca^{2+} , оказались более обогащенными в астроцитах человека по сравнению с мышами

(Goldman, 2020). Набор генов, участвующих в метаболизме, в большей степени экспрессируется в астроцитах человека по сравнению с мышами. Более того, на основе сравнения данных о скорости метаболизма в астроцитах людей и у макак предполагается, что метаболизм в человеческом мозге может быть необычно высоким (Sim et al., 2009; Zhang et al., 2016).

Неожиданно ярко различия астроцитов человека и грызунов проявились при их трансплантации в мозг неонатальных иммунодефицитных мышей (Han et al., 2013). После пересадки большое число глиальных предшественников и астроцитов крупного размера с морфологией астроглии человека было выявлено в мозге у мышей. Астроциты человека формировали щелевые контакты с астроглией хозяина и распространяли Ca^{2+} волны в 3 раза быстрее, чем астроциты мыши. Электрофизиологические и поведенческие исследования показали, что у химер резко усилилась долговременная потенция (LTP), возможности к обучению и когнитивные способности, в то время как мыши с трансплантатами астроцитов мышей не обнаружили функциональных изменений (Han et al., 2013; Goldman, 2020). Эти результаты, в совокупности с данными морфологии, молекулярных и физиологических исследований показывают, что в процессе эволюции астроциты человека не только изменились морфологически и увеличились в размерах, но и значимо усилили свое участие в кооперации с нейронами для обработки сигнала. В отношении репрограммирования астроцитов человека данных пока немного. Тем не менее, известно, что они могут быть разными способами конвертированы в нейроны *in vitro* (Yin et al., 2019; Aravantinou-Fatorou et al., 2021) и даже после трансплантации в мозг мышей (Rivetti di Val Cervo et al., 2017).

Итак, эволюция привела к очень заметным морфологическим и функциональным изменениям в астроцитах человека, что, безусловно, должно иметь определенное значение для функции мозга, которое еще предстоит понять и оценить. Однако уже сейчас ясно, что новые знания по физиологии и репрограммированию, полученные на астроцитах грызунов, следует переносить на мозг человека с большой осторожностью. Совершенно очевидно, что при базовом сходстве, существуют значительные различия между гомологичными типами клеток человека, нечеловекообразных обезьян и грызунов, включая резкие изменения в размерах, распределение по слоям, в морфологии и экспрессии генов. Эти данные вносят новые важные знания в биологию астроцитов и еще раз подчеркивают необходимость всестороннего исследования мозга человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние десятилетия астроциты стали горячей темой в связи с открытиями, которые приблизили их к уровню нервных клеток в функциональном отношении, а по возможностям к регенерации — показали их преимущества по сравнению с нейронами. Мы постарались объединить новые, но разнонаправленные исследования в единое целое, чтобы дать наиболее полное представление о биологии астроцитов, и возможно найти общность в разных формах поведения этих клеток. Если посмотреть на функции астроцитов объемно, то становится ясно, что они осуществляют постоянный внутренний надзор за нервными клетками, начиная с раннего развития. Уже давно астроциты признаны важными структурными элементами нервной ткани, регуляторами гомеостаза и метаболизма, то только сейчас стало ясно, что их функция много шире, и они участвуют в контроле дифференцировки нейронов, образовании синапсов и их интеграции в сети. В сформированных синапсах астроциты отслеживают потоки информации, если нужно усиливают или ослабляют их, вплоть до полной элиминации. Астроциты объединяются в сети, поэтому могут контролировать работу синапсов как на локальном, так и на глобальном уровне мозга. Регуляция синаптической передачи делает астроциты равноправными партнерами нервных клеток и поднимает вопрос об их участии в когнитивных функциях мозга. Если нейроны представляют популяцию терминально дифференцированных клеток, то астроциты сохраняют высокую пластичность и эпигенетическую память. Общим базальным предшественником для нейронов и астроцитов является стволовая клетка радиальной глии, многие свойства которой передаются дифференцированным астроцитам. Нельзя исключить, что способность астроцитов к глиотрансмиссии (секреции и рецепции нейротрансмиттеров) является неким рудиментом нейронной функции, которая не блокируется полностью и сохраняется благодаря пластичности. При повреждении мозга астроциты первыми встают на его защиту и образуют специальные барьеры, отделяющие поврежденные ткани. В определенных условиях (изменение эпигенетического ландшафта, гиперэкспрессия пронеуральных факторов) астроциты проявляют свойства стволовых клеток, и могут репрограммироваться в нейроны *in vitro* и *in vivo*. Исследование механизмов репрограммирования астроцитов и их связь с процессами репарации мозга может послужить фундаментом для разработки новых терапевтических подходов к репарации поврежденного мозга.

Совершенно очевидно, что накопленные знания по физиологии и пластичности астроцитов показывают существование разнообразного и очень сложного набора механизмов, обеспечива-

ющих их взаимодействие с нейронами в норме и при патологии. Еще предстоит пройти огромный путь, чтобы оценить реальный вклад астроцитов в когнитивные процессы и в регенерацию мозга и, говоря словами М. Гётц “...мы только прикоснулись к глубине их биологии” (Götz, Bocchi, 2021).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доктору биологических наук, профессору В.В. Терских за творческое обсуждение статьи, критические замечания и важные рекомендации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИБР РАН № 0088-2021-0017.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящий обзор 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.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы внесли одинаковый вклад в подготовку и написание текста обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Браже А.Р., Доронин М.С., Попов А.В. и др. Исследование паттернов кальциевой динамики в сетях астроцитов головного мозга // Российский физиологический журн. им. И.М. Сеченова. 2019. Т. 105. № 11. С. 1436–1451.
- Гомазков О.А. Астроциты как компоненты регуляции высших функций мозга // Нейрохимия. 2019. Т. 36. № 4. С. 267–274.
- Дьяконова В.Е. Происхождение и эволюция нервной системы: новые данные сравнительных полногеномных исследований многоклеточных животных // Онтогенез. 2022. Т. 53. № 1. С. 63–74.
- Ишутина Т.А., Боголепова И.Н., Свааб Д.Ф. Морфофункциональные изменения и компенсаторные механизмы в головном мозге человека при старении и болезни Альцгеймера // Журн. анатомии и гистопатологии. 2020. Т. 9. № 1. С. 77–85.
- Колосов Н.С. Роль астроцитов в нарушениях глутаматергической нейромедиации при шизофрении // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. Т. 115. № 1. С. 110–117.
- Носова О.И., Суфиева Д.А., Коржевский Д.Э. Использование конфокальной микроскопии и программных

- методов 2d и 3d анализа для изучения структурной организации астроцитов // Цитология. 2021. Т. 63. № 1. С. 80–87.
- Швалев В.Н., Сосунов А.А., Челышев Ю.А. Астроциты и пластичность синапсов. Часть 1. Синаптогенные молекулы // Неврологический вестник. 2018. Т. 50. № 2. С. 55–60.
- Шушарина Н.Н., Патрушев М.В., Силина Е.В. и др. Экспрессия генов транспортеров нейромедиаторов в астроцитах разных отделов головного мозга в эксперименте // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2018. Т. 118. № 6. С. 58–64.
- Цыба Д.Л., Кирик О.В., Колпакова М.Э. и др. Особенности экспрессии нестина и глияльного фибриллярного кислого белка на границе очага ишемического повреждения головного мозга у крыс shr // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2020. № 2. С. 118–124.
- Adamsky A., Kol A., Kreisel T. et al. Astrocytic activation generates *de novo* neuronal potentiation and memory enhancement // Cell. 2018. V. 174. № 1. P. 59–71.
- Akdemir E.S., Huang A.Y., Deneen B. Astrocytogenesis: where, when, and how // F1000Res. 2020. V. 9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22405.1>
- Allen N.J., Eroglu C. Cell biology of astrocyte-synapse interactions // Neuron. 2017. V. 96. № 3. P. 697–708.
- Allen N.J., Bennett M.L., Foo L.C. et al. Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors // Nature. 2012. V. 486. № 7403. P. 410–414.
- Alunni A., Bally-Cuif L. A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates // Development. 2016. V. 143. № 5. P. 741–753.
- Angulo M.C., Kozlov A.S., Charpak S. et al. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus // J. Neurosci. 2004. V. 24. P. 6920–6927.
- Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P. et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner // Trends Neurosci. 1999. V. 22. № 5. P. 208–215.
- Araque A., Carmignoto G., Haydon P.G. et al. Gliotransmitters travel in time and space // Neuron. 2014. V. 81. P. 728–739.
- Aravantinou-Fatorou K., Vejdani S., Thomaidou D. Cend1 and Neurog2 efficiently reprogram human cortical astrocytes to neural precursor cells and induced-neurons // Int. J. Dev. Biol. 2021. V. 5. № 3. P. 405–418.
- Arendt T. Cell cycle activation and aneuploid neurons in Alzheimer's disease // Mol. Neurobiol. 2012. V. 46. P. 125–135.
- Arellano J.I., Morozov Y.M., Micali N. et al. Radial glial cells: new views on old questions // Neurochem. Res. 2021. V. 46. № 10. P. 2512–2524.
- Bak L.K., Schousboe A., Waagepetersen H.S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer // J. Neurochem. 2006. V. 98. № 3. P. 641–653.
- Bandeira F., Lent R., Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 33. P. 14108–14113.
- Bantle C.M., Hirst W.D., Weihofen A. et al. Mitochondrial dysfunction in astrocytes: a role in parkinson's disease? // Front. Cell. Dev. Biol. 2021. V. 8. № 608026. eCollection 2020.
- Barbar L., Jain T., Zimmer M. et al. CD49f is a novel marker of functional and reactive human iPSC-derived astrocytes // Neuron. 2020. V. 107. № 3. P. 436–453.
- Barker R.A., Götz M., Parmar M. New approaches for brain repair—from rescue to reprogramming // Nature. 2018. V. 557. № 7705. P. 329–334.
- Barnabé-Heider F., Wasylnka J.A., Fernandes K.J.L. et al. Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via Cardiotrophin-1 // Neuron. 2005. V. 48. № 2. P. 253–265.
- Bayraktar O.A., Fuentealba L.C., Alvarez-Buylla A. et al. Astrocyte development and heterogeneity // Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol. 2014. V. 7. № 1. P. a020362.
- Bayraktar O.A., Bartels T., Holmqvist S. et al. Astrocyte layers in the mammalian cerebral cortex revealed by a single-cell in situ transcriptomic map // Nat. Neurosci. 2020. V. 23. № 4. P. 500–509.
- Becerra-Calixto A., Cardona-Gómez G.P. The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: potential in cell therapy // Front. Mol. Neurosci. 2017. V. 10. P. 88.
- Bernardinelli Y., Randall J., Janett E. et al. Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability // Curr. Biol. 2014. V. 24. № 15. P. 1679–1688.
- Berninger B., Costa M.R., Koch U. et al. Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia // J. Neurosci. 2007. V. 27. № 32. P. 8654–8664.
- Bindocci E., Savtchouk I., Liaudet N. et al. Three-dimensional Ca^{2+} imaging advances understanding of astrocyte biology // Science. 2017. V. 356. № 6339. P. eaai8185.
- Blanchette M., Daneman R. Formation and maintenance of the BBB // Mech. Dev. 2015. V. 138. № 1. P. 8–16.
- Bonni A., Sun Y., Nadal-Vicens M. et al. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway // Science. 1997. V. 278. № 5337. P. 477–483.
- Buffo A., Rite I., Tripathi P. et al. Origin and progeny of reactive gliosis: a source of multipotent cells in the injured brain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 3581–3586.
- Bulstrode H., Johnstone E., Marques-Torrejon M.A. Elevated FOXG1 and SOX2 in glioblastoma enforces neural stem cell identity through transcriptional control of cell cycle and epigenetic regulators // Genes. Dev. 2017. V. 31. № 8. P. 757–773.
- Burns K.A., Murphy B., Danzer S.C. et al. Developmental and post-injury cortical gliogenesis: a genetic fate-mapping study with Nestin-CreER mice // Glia. 2009. V. 57. № 10. P. 1115–1129.
- Bushong E.A., Martone M.E., Jones Y.Z. et al. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains // J. Neurosci. 2002. V. 22. № 1. P. 183–192.
- Bushong E.A., Martone M.E., Ellisman M.H. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development // Int. J. Dev. Neurosci. 2004. V. 22. № 2. P. 73–86.

- Calvo-Rodriguez M., Kharitonova E.K., Bacskai B.J. Therapeutic strategies to target calcium dysregulation in Alzheimer's disease // *Cells*. 2020. V. 9. № 11. P. 2513.
- Chen G. *In vivo* confusion over *in vivo* conversion // *Mol. Ther.* 2021. V. 29. № 11. P. 3097–3098.
- Chen Y.C., Ma N.X., Pei Z.F. *et al.* A NeuroD1 AAV-based gene therapy for functional brain repair after ischemic injury through *in vivo* astrocyte-to-neuron conversion // *Mol. Ther.* 2019. V. 28. P. 217–234.
- Chiarelli R.A., Carvalho G.A., Marques B.L. *et al.* The role of astrocytes in the neurorepair process // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 665795.
- Corti S., Nizzardo M., Simone C. *et al.* Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons // *Exp. Cell. Res.* 2012. V. 318. № 13. P. 1528–1541.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.040>
- De Azevedo L.C., Fallet C., Moura-Neto V. *et al.* Cortical radial glial cells in human fetuses: depth-correlated transformation into astrocytes // *J. Neurobiol.* 2003. V. 55. № 3. P. 288–298.
- Das G., Gupta V., Ghosh S. Glial-neuron transformation by “Chemical Cocktail” // *ACS. Chem. Neurosci.* 2019. V. 10. № 1. P. 42–43.
- Deneen B., Ho R., Lukaszewicz A. *et al.* The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord // *Neuron*. 2006. V. 52. № 6. P. 953–968.
- Doetsch F., Caillé I., Lim D.A. *et al.* Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain // *Cell*. 1999. V. 97. P. 703–716.
- Doetsch F. The glial identity of neural stem cells // *Nat. Neurosci.* 2003. V. 6. № 11. P. 1127–1134.
- Dimou L., Götz M. Glial cells as progenitors and stem cells: new roles in the healthy and diseased brain // *Physiol. Rev.* 2014. V. 94. № 3. P. 709–737.
- Duong T.A.D., Hoshiba Y., Saito K. *et al.* FGF signaling directs the cell fate switch from neurons to astrocytes in the developing mouse cerebral cortex // *Neurosci.* 2019. V. 39. № 31. P. 6081–6094.
- Eilam R., Aharoni R., Arnon R. *et al.* Astrocyte morphology is confined by cortical functional boundaries in mammals ranging from mice to human // *Elife*. 2016. V. 5. P. e15915.
- Falcone C., Wolf-Ochoa M., Amina S. *et al.* Cortical interlaminar astrocytes across the therian mammal radiation // *J. Comp. Neurol.* 2019. V. 527. № 10. P. 1654–1674.
- Farhy-Tselnicker I., Allen N.J. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development // *Neural. Dev.* 2018. V. 13. № 1. P. 7.
- Flitsch L.J., Brüstle O. Evolving principles underlying neural lineage conversion and their relevance for biomedical translation // *F1000Research*. 2019. V. 8. P. F1000 Faculty Rev-1548.
- Forsberg D., Herlenius E. Astrocyte networks modulate respiration-sniffing glue // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2019. V. 265. P. 3–8.
- Freeman M.R. Specification and morphogenesis of astrocytes // *Science*. 2010. V. 330. № 6005. P. 774–778.
<https://doi.org/10.1126/science.1190928>
- Furness D.N., Dehnes Y., Akhtar A.Q. *et al.* A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2) // *Neuroscience*. 2008. V. 157. № 1. P. 80–94.
- Garcia-Marques J., Lopez-Mascaraque L. Clonal identity determines astrocyte cortical heterogeneity // *Cereb. Cortex*. 2013. V. 23. P. 1463–1472.
- Garcia A.D.R., Doan N.B., Imura T. *et al.* GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain // *Nat. Neurosci.* 2004. V. 7. № 11. P. 1233–1241.
- Gao H., A.L., Huang X. *et al.* Müller glia-mediated retinal regeneration // *Mol. Neurobiol.* 2021. V. 58. № 5. P. 2342–2361.
- Gao V., Suzuki A., Magistretti P.J. *et al.* Astrocytic β 2-adrenergic receptors mediate hippocampal long-term memory consolidation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. P. 8526–8531.
- Gascon S., Masserdotti G., Russo G.L. *et al.* Direct neuronal reprogramming: achievements, hurdles, and new roads to success // *Cell. Stem. Cell*. 2017. V. 21. P. 18–34.
- Ge W.P., Jia J.M. Local production of astrocytes in the cerebral cortex // *Neuroscience*. 2016. V. 323. P. 3–9.
- Ge L.J., Yang F.H., Li W. *et al.* *In vivo* neuroregeneration to treat ischemic stroke through neuroD1 AAV-based gene therapy in adult non-human primates // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2020. V. 8. P. 590008.
- Goldman S.A. Glial evolution as a determinant of human behavior and its disorders // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2020. V. 1471. № 1. P. 72–85.
- Goss J.R., O'Malley M.E., Zou L. *et al.* Astrocytes are the major source of nerve growth factor upregulation following traumatic brain injury in the rat // *Exp. Neurol.* 1998. V. 149. № 2. P. 301–309.
- Götz M., Bocchi R. Neuronal replacement: concepts, achievements, and call for caution // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2021. V. 69. P. 185–192.
- Griffiths B.B., Bhutani A., Stary C.M. Adult neurogenesis from reprogrammed astrocytes // *Neural. Regen. Res.* 2020. V. 15. № 6. P. 973–979.
- Guo Z., Zhang L., Wu Z. *et al.* *In vivo* direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model // *Cell. Stem. Cell*. 2014. V. 14. № 2. P. 188–202.
- Halassa M.M., Fellin T., Takano H. *et al.* Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 24. P. 6473–6477.
- Han X., Chen M., Wang F. *et al.* Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice // *Cell. Stem. Cell*. 2013. V. 12. № 3. P. 342–353.
- He F., Ge W., Martinowich K. *et al.* A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. № 5. P. 616–625.
- Heins N., Malatesta P., Cecconi F. *et al.* Glial cells generate neurons: The role of the transcription factor Pax6 // *Nat. Neurosci.* 2002. V. 5. P. 308–315.
- Hirabayashi Y., Suzuki N., Tsuboi M. *et al.* Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to

- promote astrogenic fate transition // *Neuron*. 2009. V. 63. № 5. P. 600–613.
- Hochstim C., Deneen B., Lukaszewicz A. et al. Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code // *Cell*. 2008. V. 133. P. 510–522.
- Hodge R.D., Bakken T.E., Miller J.A. et al. Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex // *Nature*. 2019. V. 573. № 7772. P. 61–68.
- Holst C.B., Bröchner C.B., Vitting-Seerup K. et al. Astroglioneogenesis in human fetal brain: complex spatiotemporal immunoreactivity patterns of GFAP, S100, AQP4 and YKL-40 // *J. Anat.* 2019. V. 235. № 3. P. 590–615.
- Houades V., Koulakoff A., Ezan P. et al. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 20. P. 5207–5217.
- Hu H., Miao Y.R., Jia L.H. et al. Animal TFDB 3.0: a comprehensive resource for annotation and prediction of animal transcription factors // *Nucleic. Acids. Research*. 2019. V. 47. P. D33–D38.
- Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease // *Neuron*. 2017. V. 96. № 1. P. 17–42.
- John G.R., Lee S.C., Brosnan C.F. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation // *Neuroscientist*. 2003. V. 9. P. 10–22.
- Kang P., Lee H.K., Glasgow S.M. et al. Sox9 and NFIA coordinate a transcriptional regulatory cascade during the initiation of gliogenesis // *Neuron*. 2012. V. 74. № 1. P. 79–94.
- Kanski R., van Strien M.E., van Tijn P. et al. A star is born: new insights into the mechanism of astrogenesis // *Cell. Mol. Life. Sci.* 2014. V. 71. № 3. P. 433–447.
- Kempf J., Knelles K., Hersbach B.A. et al. Heterogeneity of neurons reprogrammed from spinal cord astrocytes by the proneural factors Ascl1 and Neurogenin2 // *Cell. Rep.* 2021. V. 36. № 3. P. 109409.
- Khakh B.S., Deneen B. The emerging nature of astrocyte diversity // *Annu. Rev. Neurosci.* 2019. V. 42. P. 187–207.
- Khakh B.S., Sofroniew M.V. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 18. № 7. P. 942–952.
- Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells // *Annu. Rev. Neurosci.* 2009. V. 32. P. 149–184.
- Kugler E.C., Greenwood J., MacDonald R.B. The “neuroglial-vascular” unit: the role of glia in neurovascular unit formation and dysfunction // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 732820.
- Lee J.H., Kim J.Y., Noh S. et al. Astrocytes phagocytose adult hippocampal synapses for circuit homeostasis // *Nature*. 2021. V. 590. № 7847. P. 612–617.
- Li H., Chen G. In vivo reprogramming for CNS repair: regenerating neurons from endogenous glial cells // *Neuron*. 2016. V. 91. P. 728–738.
- Li L., Lundkvist A., Andersson D. et al. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 2008. V. 28. № 3. P. 468–481.
- Li J., Pan L., Pembroke W.G. et al. Conservation and divergence of vulnerability and responses to stressors between human and mouse astrocytes // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 3958.
- Limbad C., Oron T.R., Alimirah F. et al. Astrocyte senescence promotes glutamate toxicity in cortical neurons // *PLoS One*. 2020. V. 15. № 1. P. e0227887.
- Liu M.H., Li W., Zheng J.J. et al. Differential neuronal reprogramming induced by NeuroD1 from astrocytes in grey matter versus white matter // *Neural. Regen. Res.* 2020. V. 15. № 2. P. 342–351.
- Liu Y., Miao Q., Yuan J. et al. Ascl1 converts dorsal mid-brain astrocytes into functional neurons *in vivo* // *J. Neurosci.* 2015. V. 35. № 25. P. 9336–9355.
- 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. P. 329–340.
- Loprinzi P.D. The role of astrocytes on the effects of exercise on episodic memory function // *Physiol. Int.* 2019. V. 106. № 1. P. 21–28.
- Lozzi B., Huang T.W., Sardar D. et al. Regionally distinct astrocytes display unique transcription factor profiles in the adult brain // *Front. Neurosci.* 2020. V. 14. № 61.
- Ma N.X., Yin J.C., Chen G. Transcriptome analysis of small molecule-mediated astrocyte-to-neuron reprogramming // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2019. V. 7. P. 82.
- Ma Y., Xie H., Du X. et al. In vivo chemical reprogramming of astrocytes into neurons // *Cell. Discov.* 2021. V. 7. № 1. P. 12.
- Magavi S., Friedmann D., Banks G. et al. Coincident generation of pyramidal neurons and protoplasmic astrocytes in neocortical columns // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 14. P. 4762–4772.
- Magnusson J.P., Frisén J. Stars from the darkest night: unlocking the neurogenic potential of astrocytes in different brain regions // *Development*. 2016. V. 143. № 7. P. 1075–1086.
- Magnusson J.P., Göritz C., Tatarishvili J. et al. A latent neurogenic program in astrocytes regulated by notch signaling in the mouse // *Science*. 2014. V. 346. P. 237–241.
- 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.
- McConnell S.K. The control of neuronal identity in the developing cerebral cortex // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1992. V. 2. P. 23–27.
- Merkle F.T., Tramontin A.D., Garcia-Verdugo J.M. et al. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. V. 101. P. 17528–17532.
- Miller F.D., Gauthier A.S. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex // *Neuron*. 2007. V. 54. № 3. P. 357–369.
- Miller S.J., Philips T., Kim N. et al. Molecularly defined cortical astroglia subpopulation modulates neurons via secretion of Norrin // *Nat. Neurosci.* 2019. V. 22. № 5. P. 741–752.
- Minge D., Domingos C., Unichenko P. et al. Heterogeneity and development of fine astrocyte morphology captured by diffraction-limited microscopy // *Front. Cell. Neurosci.* 2021. V. 15. P. 669280.

- Molofsky A.V., Deneen B. Astrocyte development: a guide for the perplexed // *Glia*. 2015. V. 63. № 8. P. 1320–1329.
- Molofsky A.V., Glasgow S.M., Chaboub L.S. et al. Expression profiling of Aldh1l1-precursors in the developing spinal cord reveals glial lineage-specific genes and direct Sox9-Nfe2l1 interactions // *Glia*. 2013. V. 61. P. 1518–1532.
- Morel L., Men Y., Chiang M.S.R. et al. Intracortical astrocyte subpopulations defined by astrocyte reporter mice in the adult brain // *Glia*. 2019. V. 67. № 1. P. 171–181.
- Mori T., Buffo A., Götz M. The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2005. V. 69. P. 67–99.
- Muroyama Y., Fujiwara Y., Orkin S.H. et al. Specification of astrocytes by bHLH protein SCL in a restricted region of the neural tube // *Nature*. 2005. V. 438. P. 360–363.
- Namihira M., Kohyama J., Semi K. et al. Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells // *Dev. Cell*. 2009. V. 16. № 2. P. 245–255.
- Hatada I., Namihira M., Morita S. et al. Astrocyte-specific genes are generally demethylated in neural precursor cells prior to astrocytic differentiation // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 9. P. e3189.
- Niu W., Zang T., Zou Y. et al. *In vivo* reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain // *Nature Cell Biology*. 2013. V. 15. P. 1164–1175.
- Noctor S.C., Martínez-Cerdeño V., Ivic L. et al. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases // *Nat. Neurosci.* 2004. V. 7. № 2. P. 136–144.
- Oberheim N.A., Wang X., Goldman S. et al. Astrocytic complexity distinguishes the human brain // *Trends Neurosci.* 2006. V. 29. P. 547–553.
- Oberheim N.A., Takano T., Han X. et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 10. P. 3276–3287.
- Ofenbauer A., Tursun B. Strategies for *in vivo* reprogramming // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2019. V. 61. P. 9–15.
- Ohab J.J., Fleming S., Armin Blesch A. et al. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 50. P. 13007–13016.
- Parnavelas J.G. Glial cell lineages in the rat cerebral cortex // *Exp. Neurol.* 1999. V. 156. P. 418–429.
- Papouin T., Dunphy J., Tolman M. et al. Astrocytic control of synaptic function // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* 2017. № 1715. V. 372. P. 20160154.
- Pavlou M.A.S., Grandbarbe L., Buckley N.J. et al. Transcriptional and epigenetic mechanisms underlying astrocyte identity // *Prog. Neurobiol.* 2019. V. 174. P. 36–52.
- Pelvig D.P., Pakkenberg H., Stark A.K. et al. Neocortical glial cell numbers in human brains // *Neurobiol. Aging*. 2008. № 11. P. 1754–1762.
- Perea G., Navarrete M., Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information // *Trends Neurosci.* 2009. V. 32. № 8. P. 421–431.
- Pérez-Catalán N.A., Doe C.Q., Ackerman S.D. The role of astrocyte-mediated plasticity in neural circuit development and function // *Neural Dev.* 2021. V. 16. № 1. P. 1.
- Qian X., Shen Q., Goderie S.K. et al. Timing of CNS cell generation: A programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells // *Neuron*. 2000. V. 28. P. 69–80.
- 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. P. 550–556.
- Rahman A.A., Amruta N., Pinteaux E. et al. Neurogenesis after stroke: a therapeutic perspective // *Transl. Stroke Res.* 2021. V. 12. № 1. P. 1–14.
- Rakic P.J. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex // *Comp. Neurol.* 1972. V. 145. № 1. P. 61–83.
- Raponi E., Agenes F., Delphin C. et al. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage // *Glia*. 2007. V. 55. № 2. P. 165–177.
- Raposo A.A.S.F., Vasconcelos F.F., Drechsel D. Ascl1 coordinately regulates gene expression and the chromatin landscape during neurogenesis // *Cell. Rep.* 2015. V. 10. № 9. P. 1544–1556.
- Rivetti di Val Cervo P., Romanov R.A., Spigolon G. et al. Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes *in vitro* and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model // *Nat. Biotechnol.* 2017. V. 35. P. 444–452.
- Robel S., Buckingham S.C., Boni J.L. et al. Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures // *J. Neurosci.* 2015. V. 35. № 8. P. 3330–3345.
- Russo G.L., Sonsalla G., Natarajan P. et al. CRISPR-mediated induction of neuron-enriched mitochondrial proteins boosts direct glia-to-neuron conversion // *Cell. Stem. Cell*. 2021. V. 28 № 3. P. 524–534.
- Santello M., Toni N., Volterra A. Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment // *Nat. Neurosci.* 2019. V. 22. № 2. P. 154–166.
- Schmechel D.E., Rakic P. A golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: Morphogenesis and transformation into astrocytes // *Anat. Embryol.* 1979. V. 156. № 2. P. 115–152.
- Sharif N., Calzolari F., Berninger B. Direct *in vitro* reprogramming of astrocytes into induced neurons // *Methods. Mol. Biol.* 2021. V. 2352. P. 13–29.
- Shan L., Zhang T., Fan K. et al. Astrocyte-neuron signaling in synaptogenesis // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 680301.
- Shen Q., Wang Y., Dimos J.T. et al. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells // *Nat. Neurosci.* 2006. V. 9. P. 743–751.
- 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.
- Shoneye T., Orrego A.T., Jarvis R. et al. Differential proliferation and maturation of subcortical astrocytes during postnatal development // *Front. Neurosci.* 2020. V. 14. P. 435.
- Shimada I.S., LeComte M.D., Granger J.C. et al. Self-renewal and differentiation of reactive astrocyte-derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 23. P. 7926–7940.

- Sim F.J., Windrem M.S., Goldman S.A.* Fate determination of adult human glial progenitor cells // *Neuron. Glia. Biol.* 2009. V. 5. № 3–4. P. 45–55.
- Sirko S., Behrendt G., Johansson P.A. et al.* Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog // *Cell. Stem. Cell.* 2013. V. 12. P. 426–439.
- Sloan S.A., Barres B.A.* Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2014. V. 27. P. 75–81.
- Sofroniew M.V.* Astrocyte reactivity: subtypes, states, and functions in CNS innate immunity // *Trends. Immunol.* 2020. V. 41. № 9. P. 758–770.
- Sofroniew M.V., Vinters H.V.* Astrocytes: biology and pathology // *Acta. Neuropathol.* 2010. V. 119. № 1. P. 7–35.
- Sosunov A.A., Wu X., Tsankov N.M. et al.* Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. № 6. P. 2285–2298.
- Stackhouse T.L., Mishra A.* Neurovascular coupling in development and disease: focus on astrocytes // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 702832.
- Stogsdill J.A., Ramirez J., Liu D. et al.* Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis // *Nature.* 2017. V. 551. № 7679. P. 192–197.
- Sun W., Cornwell A., Li J. et al.* SOX9 is an astrocyte-specific nuclear marker in the adult brain outside the neurogenic regions // *J. Neurosci.* 2017. V. 37. № 17. P. 4493–4507.
- Sun X., Hu X., Wang D. et al.* Establishment and characterization of primary astrocyte culture from adult mouse brain // *Brain Res. Bull.* 2017. V. 132. P. 10–19.
- Susarla B.T., Villapol S., Yi J.H. et al.* Temporal patterns of cortical proliferation of glial cell populations after traumatic brain injury in mice // *ASN. Neuro.* 2014. V. 6. № 3. P. 159–170.
- Tabata H.* Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis // *Front. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 114.
- Tang F., Lane S., Korsak A. et al.* Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3284.
- Tavazoe 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. 288–379.
- Torres A.* Extracellular Ca^{2+} acts as a mediator of communication from neurons to glia // *Science Signaling.* 2012. V. 5. № 208. P. 208.
- Torper O., Pfisterer U., Wolf D.A. et al.* Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 7038–7043.
- Verkhratsky A., Nedergaard M.* Physiology of astroglia // *Physiol. Rev.* 2018. V. 98. P. 239–389.
- Verkhratsky A.* Astroglial calcium signaling in aging and Alzheimer's disease // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019. V. 11. № 7. P. a035188.
- Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P. et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors // *Nature.* 2010. V. 463. P. 1035–1041.
- Vignoli B., Sansevero G., Sasi M. et al.* Astrocytic microdomains from mouse cortex gain molecular control over long-term information storage and memory retention // *Communications Biology.* 2021. V. 4. № 1. P. 1152.
- Voigt T.* Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: Direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes // *J. Comp. Neurol.* 1989. V. 289. № 1. P. 74–88.
- von Bartheld C.S., Bahney J., Herculano-Houzel S.* The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: a review of 150 years of cell counting // *J. Comp. Neurol.* 2016. V. 524. № 18. P. 3865–3895.
- Wade J.J., Mcdaid L.J., Harkin J. et al.* Bidirectional coupling between astrocytes and neurons mediates learning and dynamic coordination in the brain: a multiple modeling approach // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e29445.
- Walrave L., Vinken M., Leybaert L. et al.* Astrocytic connexin43 channels as candidate targets in epilepsy treatment // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 11. P. 1578.
- Xiang Z., Xu L., Liu M. et al.* Lineage tracing of direct astrocyte-to-neuron conversion in the mouse cortex // *Neural Regen. Res.* 2021. V. 16. P. 750–756.
- Yang H., Liu C., Fan H. et al.* Sonic hedgehog effectively improves Oct4 mediated reprogramming of astrocytes into neural stem cells // *Mol. Ther.* 2019. V. 27. № 8. P. 1467–1482.
- Yin J.C., Zhang L., Ma N.X. et al.* Chemical conversion of human fetal astrocytes into neurons through modulation of multiple signaling pathways // *Stem. Cell. Reports.* 2019. V. 12. № 3. P. 488–501.
- Zamboni M., Llorens-Bobadilla E., Magnusson J.P. et al.* Widespread neurogenic potential of neocortical astrocytes is induced by injury // *Cell. Stem. Cell.* 2020. V. 27. № 4. P. 605–617.
- Zamanian J.L., Xu L., Foo L.C. et al.* Genomic analysis of reactive astrogliosis // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 18. P. 6391–6410.
- Zhang Y., Sloan S.A., Clarke L.A. et al.* Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse // *Neuron.* 2016. V. 89. № 1. P. 37–53.
- Zhang K., Förster R., He W. et al.* Fear learning induces $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor-mediated astrocytic responsiveness that is required for memory persistence // *Nat. Neurosci.* 2021. V. 24. № 12. P. 1686–1698.
- Zhou B., Zuo Y.X., Jiang R.T.* Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases // *CNS. Neurosci. Ther.* 2019. V. 25. № 6. P. 665–673.
- Zhou H., Su J., Hu X. et al.* Glia-to-neuron conversion by CRISPR-CasRx alleviates symptoms of neurological disease in mice // *Cell.* 2020. V. 181. P. 590–603.
- Zhuo L., Theis M., Alvarez-Maya I. et al.* hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function *in vivo* // *Genesis.* 2001. V. 31. № 2. P. 85–94.
- Zorec R., Araque A., Carmignoto G. et al.* Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca^{2+} as a signalling route // *ASN. Neuro.* 2012. V. 4. P. 103–119.

Astrocytes of the Brain—Retinue Plays the King

M. A. Aleksandrova^{1,*} and K. K. Sukhinich^{1,**}

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

**e-mail: mariaaleks@inbox.ru*

***e-mail: transpl@hotmail.com*

In beside neurons, there are many other cells in the brain tissue, grouped under the name glia. According to our current knowledge, there are approximately the same number of neurons and glial cells in humans. Among glia cells, astrocytes occupy a special place because of their fantastic multifunctionality, which is continuing to be uncovered from new angles. The history of the study of astrocytes goes back over a hundred years. During that time, they have been firmly considered as supportive and service cells, and therefore have always been in the shadow of neurons. New tools of molecular genetics that allow cell labeling, cell manipulations in vitro and in vivo, experimental deletion of genes and regulation of their expression, coupled with new methods of cell imaging, have opened wide possibilities for solving problems of fundamental biology. They have led to two important discoveries: (1) astrocytes are close in function to neurons and (2) they play an important role in brain repair and regeneration. There has been intensive research in the areas associated with each of these discoveries since the 1990s. However, research in each of them has followed separate paths, and there has been little overlap. This is not surprising, as modern research is often highly specialised and delves so deeply that a sense of the integrity of the object and the problem is lost. In the case of astrocytes, this is roughly what has happened. First line of research, extremely important for understanding brain function, has focused on the physiology of astrocytes and their involvement in the regulation of synaptic activity of neurons. Research in the other direction has involved the study of neural stem cells. They have revealed the properties of stem cells in astrocytes, as well as their ability to reprogram into neurons. The amount of data generated by studying astrocytes is huge. Therefore, each of the reviews devoted to them usually covers only one narrow topic. Therefore, the aim of our review is to combine the information from two areas of research mentioned above. This will provide the most complete picture of the current state of knowledge in astrocyte biology, and will outline new ways of studying normal brain functioning and reconstruction.

Keywords: astrocytes development, molecular mechanisms of cell differentiation, tripartite synapse, astrocyte plasticity, reprogramming into neurons, human astrocytes

УДК 608.1

CRISPR/Cas: ИСТОРИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2022 г. А. А. Шмакова^{a, b, *}, О. П. Шмакова^c, А. А. Карпухина^a, Е. С. Васецкий^{a, **}

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

^bЛаборатория молекулярной эндокринологии, ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, ул. Зя Черепковская, 15а, Москва, 121552 Россия

^cОтдел по изучению проблем подростковой психиатрии, ФГБНУ “Научный центр психического здоровья”, Каширское шоссе, 34, Москва, 115522 Россия

*e-mail: anyashm@gmail.com

**e-mail: vassetzky@gmail.com

Поступила в редакцию 07.03.2022 г.

После доработки 16.04.2022 г.

Принята к публикации 18.04.2022 г.

В настоящем обзоре обсуждаются ключевые этапы развития технологии редактирования геномов CRISPR/Cas от истории открытия до современных разработок в различных областях, включая применение данной технологии в медицине. Рассматриваются также технические и этические проблемы, связанные с использованием CRISPR/Cas для редактирования геномов эмбрионов человека.

Ключевые слова: CRISPR, Cas, редактирование геномов, история науки

DOI: 10.31857/S0475145022040073

ВВЕДЕНИЕ

Описание в геномах прокариот системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR, от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats), и ассоциированных с ними белков Cas (от англ. CRISPR associated protein) является одним из самых революционных и важных открытий в современной биологии.

CRISPR — это участки ДНК (локусы) в геноме прокариот, состоящие из одинаковых коротких повторов (30–40 пар нуклеотидов, далее — п.н.), разделенных уникальными последовательностями спейсеров такой же длины; вблизи этих участков находятся гены, кодирующие CRISPR-ассоциированные белки Cas (Hille, Charpentier, 2016). Короткие палиндромные повторы чрезвычайно распространены: регионы CRISPR найдены в геномах у 50% всех известных бактерий и 90% архей (Grissa et al., 2007; Hille et al., 2018), что может свидетельствовать об их чрезвычайной важности для жизнедеятельности прокариот. В 2020 г. за работы по практическому использованию CRISPR/Cas системы для редактирования генома была присуждена Нобелевская премия по химии Эммануэль Шарпантье и Дженнифер Даудне.

Изучение системы CRISPR/Cas к настоящему моменту прошло путь от открытия необычных и

непонятно для чего предназначенных повторов, обнаруженных исследователями в геномах разных бактерий и архей, до описания участия системы CRISPR/Cas в функционировании приобретенного иммунитета прокариот и использования этих знаний для прицельного редактирования геномов эукариот, а также многих иных целей. Применяя инструменты на основе системы CRISPR/Cas, исследователи совершили прорыв в фундаментальных клинических испытаниях, биотехнологических компаниях запустили испытания генной терапии для целого ряда заболеваний. Технология продолжает стремительно развиваться, ее потенциал многообещающ для дальнейших работ в области биологии, медицины, биоинженерии, биохимии и иных наук.

В настоящем обзоре описана история открытия CRISPR/Cas системы, использования методики CRISPR/Cas для научно-практических изысканий.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И РАЗРАБОТКИ МЕТОДА CRISPR/Cas ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ

Впервые необычные повторяющиеся последовательности были описаны в 1987 г. в геноме бактерии *Escherichia coli* (кишечной палочки) группой японских ученых во главе с Есидзуми Исино (Y. Ishino), которые выявили, что на 3' конце гена

Iap, продукты которого ответственны за изоферментную конверсию щелочной фосфатазы, находились “пять высоко гомологичных последовательностей из 29 нуклеотидов, расположенные как повторы с интервалом в 32 нуклеотида” (Ishino et al., 1987). Е. Исино с соавт. не нашли биологического объяснения наличия и функции этих повторяющихся последовательностей и не придали большого значения своему наблюдению. Среди коллег работа также не вызвала большого отклика — до 2007 г. публикация Е. Исино цитировалась 1–2 раза за год.

Необычные повторяющиеся последовательности в геномах прокариот заинтересовали испанского исследователя Франсиско Мохику (F.J. Mojica), который обнаружил их в геноме археи *Haloferax mediterranei* в 1993 г. (Mojica et al., 1993), на тот момент ученому было всего 30 лет. В 1995 г. Ф. Мохику с соавт. (Mojica et al., 1995) подробно описали эти “тандемные повторы”, как они их называли, в геномах *Haloferax mediterranei* и *H. volcanii*: последовательность из 30 п.н. с диадной симметрией повторялась в тандеме с вкраплениями уникальных последовательностей из 33–39 п.н. и простиралась на большие участки — 1.4 тыс. п.н. в хромосоме *H. mediterranei* и около 3 тыс. п.н. в хромосоме *H. volcanii*. Чтобы понять роль этого участка ДНК, группа Ф. Мохики решила внести его дополнительную копию в клетку археи *H. volcanii* путем трансформации рекомбинантной плазмидой, содержащей фрагмент тандемных повторов длиной 1.1 тыс. п.н. Это привело к значительному снижению жизнеспособности клеток и нарушило распределение генома среди дочерних клеток (Mojica et al., 1995). Так возникла первая гипотеза, что биологическая роль тандемных повторов в геномах прокариот заключается в их участии в разделении (сегрегации) удвоенной хромосомы между дочерними клетками в процессе деления. Примерно в это же время похожие повторы были описаны в геномах *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al., 1993), стрептококка (Hoe et al., 1999), цианобактерии *Anabaena* sp. (Masepohl et al., 1996), *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium* (Nakata et al., 1989) и других видов бактерий. Высказывались предположения, что данные повторы могут участвовать в хромосомных перестройках, рекомбинации или являются местами посадки белков, регулирующих соседствующие с повторами гены (Nakata et al., 1989; Groenen et al., 1993), однако экспериментально эти предположения не проверялись.

Закончив аспирантуру в 1995 г., Франсиско Мохику некоторое время работал постдокторантом в Оксфордском университете, а затем, движимый интересом к загадочным повторам, вер-

нулся в Испанию, где попытался основать свою исследовательскую группу по изучению “тандемных повторов”. Сам ученый отмечал, что в то время его заявки на исследования не получили грантов, и он был существенно ограничен в финансировании своих работ и в создании инфраструктуры собственной лаборатории (Mojica, Rodriguez-Valera, 2016). Несмотря на затруднения, ученый продолжил исследования. В качестве модельного организма Ф. Мохику переориентировался на *E. coli*, но воспроизведение экспериментов, проведенных им ранее на *H. volcanii*, не дало ожидаемых результатов: четкого фенотипа нарушения сегрегации генома *E. coli* при внесении в ее геном дополнительной копии “тандемного повтора” не наблюдалось. Второй гипотезой ученого стало то, что тандемные повторы служат ориентирами для связывания ДНК с клеточными структурами (например, белками клеточной мембраны или растворимыми белками). Однако никаких повтор-связывающих белков в клеточных экстрактах *E. coli* им обнаружено не было. Третье предположение состояло в том, что повторы могут влиять на трехмерную структуру молекулы ДНК, в которой они находятся, но и это не подтвердилось: анализ плазмидной ДНК показал, что внесение участков повторов не влияло на ее топологию (Mojica, Rodriguez-Valera, 2016).

Но Франсиско Мохику не сдавался в своих намерениях найти функции таинственных повторов. Постепенное развитие технологий секвенирования облегчило поиск подобных структур в геномах других организмов, и коллега Мохику, Сесар Диес-Вильясенор (C. Díez-Villaseñor), создал программу для поиска повторяющихся регионов в геномах прокариот. К 2000 г. Ф. Мохику с соавт. (Mojica et al., 2000) систематизировали данные о геномных повторах у 9 видов архей и 10 видов бактерий, они дали им название: короткие регулярно расположенные повторы (SRSR, от англ. Short Regularly Spaced Repeats; аббревиатура, также указывает на чередование спейсеров и повторов, поскольку может быть расшифрована также как: Spacer-Repeat-Spacer-Repeat). Весьма важная для науки работа была опубликована в формате микро-письма на 2 страницы (пусть этот факт послужит утешением для современных ученых, чьи работы просят сократить редакторы журналов).

Группа голландского микробиолога Руда Янсена (R. Jansen) (Jansen et al., 2002a), описавшая тандемные повторы у *Mycobacterium tuberculosis* и других видов прокариот, дала тандемам название: прямые повторы, перемежающиеся спейсерами (SPIDR, от англ. SPacers Interspersed Direct Repeats). Чтобы избежать дальнейшей путаницы в быстрорастущей тематике, Ф. Мохику и Р. Янсен

Asunto: Re: Acronym
Fecha: Wed, 21 Nov 2001 16:39:06 +0100
De: "Ruud Jansen" <R.Jansen@vet.uu.nl>
Empresa: Diergeneeskunde
A: "Francisco J. Martínez Mojica" <fmojica@ua.es>

Dear Francis

What a great acronym is CRISPR.

I feel that every letter that was removed in the alternatives made it less crispy so I prefer the snappy CRISPR over SRSR and SPIDR. Also not unimportant is the fact that in MedLine CRISPR is a unique entry, which is not true for some of the other shorter acronyms.

Перевод:

Дорогой Фрэнсис

Какая замечательная аббревиатура CRISPR.

Я чувствую, что каждая буква, которая была удалена в альтернативах, делала их менее хрустящими (игра слов CRISPR – crispy), поэтому я предпочитаю энергичный CRISPR аббревиатурам SRSR или SPIDR. Также немаловажным является тот факт, что в Medline CRISPR является уникальной записью, чего нельзя сказать о некоторых других более коротких аббревиатурах.

Рис. 1. Текст электронного письма, отправленного Р. Янсенем Ф. Мохике, относительно именования регулярно расположенных повторов CRISPR. Источник (Mojica, Garrett, 2013).

совместно решили заменить названия: прямые повторы, тандемные повторы, SRSR, SPIDR и другие вариации названий, на простое, “хрустящее” (по меткому замечанию самого Р. Янсена) и известное нам сегодня – CRISPR (рис. 1). В 2002 г. Р. Янсен с соавт. (Jansen et al., 2002b) идентифицировали также, что рядом с локусами повторов находятся гены, кодирующие белки, которым они дали название CRISPR-ассоциированные (Cas) белки.

Хотя на тот момент роль геномных повторов оставалась загадкой для ученых, широкое распространение повторных последовательностей у разных видов прокариот указывало на их несомненную значимость и фундаментальную клеточную роль. Открыв Cas белки, Р. Янсен выдвинул предположение, что, имея структуру, схожую с ДНК-хеликазами или экзонуклеазами, данные белки участвуют в метаболизме ДНК или регуляции экспрессии генов в какой-то области генома, функционально связанной с локусом CRISPR (Jansen et al., 2002b).

Однако финальным ключом к разгадке функций системы CRISPR/Cas стало открытие происхождения уникальных промежуточных спейсеров. Роль этих последовательностей долгое время

оставалась загадкой. Франсиско Мохика поначалу не придавал им особого значения, он писал: “само название спейсер намекает на их несущественную роль в повторах, <как последовательностей>, просто разделяющих палиндромы” (Mojica, Rodriguez-Valera, 2016). В начале 2000-х гг. его исследовательская группа продолжала работать над повторами CRISPR в *E. coli*. Они рутинно амплифицировали локусы CRISPR с помощью ПЦР, секвенировали их и сравнивали с последовательностями в общедоступных базах данных нуклеотидов. И вот однажды ученых постигла удача: один из запросов выдал совпадающую последовательность, они обнаружили, что последовательность спейсера гомологична кусочку генома бактериофага *E. coli*. Постепенно, Франсиско Мохика с соавт. накопили данные и о других спейсерах, которые имели сходство с последовательностями в бактериофагах или в конъюгативных плазидах (Mojica et al., 2005). Оказалось, что бактериофаги, чьи последовательности находили в спейсерах CRISPR, были неспособны инфицировать клетку-носитель спейсера, но инфицировали близкородственные штаммы, лишённые данного спейсера (Mojica et al., 2005). Произошло озарение, и Ф. Мохика первым высказал верное предположение,

что роль системы CRISPR заключается в приобретении иммунитета против чужеродной ДНК, а сам локус является “отсеком для хранения фрагментов ДНК захватчиков” (Mojica et al., 2005). Стоит вновь упомянуть о трудностях признания, с которыми столкнулись авторы революционного открытия при попытке опубликовать свои находки. Приводим эти факты (Lander, 2016) не с целью вызвать в читателе разочарование в объективности современных научных издательств, хотя таковое было бы небезосновательным в обсуждаемом случае, а скорее для утешения тех ученых, которым эта история даст надежду на последующее признание их работ независимо от первоначально негативной реакции научного сообщества на совершенное открытие. Понимая важность своего научного вывода, Ф. Мохики отправил статью в журнал Nature. В ноябре 2003 г. редакция Nature отклонила статью, даже не отправив ее рецензентам: по непонятным причинам редактор заявил, что идея статьи уже известна. В январе 2004 г. в Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) также решили, что статье не хватает “новизны и важности”, чтобы отправить ее на рецензию. Следующими рукопись Ф. Мохики отклонили журналы Molecular Microbiology и Nucleic Acid Research. Отчаявшийся и переживающий, что его могут опередить, Ф. Мохики отправил статью в Journal of Molecular Evolution, где после 1 года (!) рецензий статью наконец опубликовали 1 февраля 2005 г. Ф. Мохики так вспоминал об этом периоде: “Представьте, что у вас на руках большое <открытие>, и есть вероятность, что будет опубликована еще одна статья, которая вас опередит. Я помню, как каждый месяц отправлял письмо редактору со словами: “Пожалуйста, скажите мне, собираетесь ли вы опубликовать или нет, чтобы мы могли подать заявку в другой журнал”. Я был в абсолютном отчаянии” (Fernández, 2019, перевод наш).

В марте и августе 2005 г. две независимые исследовательские группы из Франции описали схожие находки у *Yersinia pestis* и стрептококков (Bolotin et al., 2005; Pourcel et al., 2005). Изучение столь необычного модельного организма — *Y. pestis*, возбудителя бубонной чумы, объяснялось тем, что первая исследовательская группа, возглавляемая Жилем Верно (G. Vergnaud), работала по заказу Министерства обороны Франции и разрабатывала методы отслеживания источника патогенов на основе генетических данных с целью защиты от биологического оружия. Их уникальная коллекция *Y. pestis* была получена во время вспышки чумы во Вьетнаме в 1964–1966 гг. (Lander, 2016). Как и Ф. Мохики, Ж. Верно столкнулся с нежеланием журналов публиковать обна-

руженные закономерности: статья коллектива под руководством Ж. Верно была отвергнута PNAS, Journal of Bacteriology, Nucleic Acids Research и Genome Research, прежде чем была опубликована в Microbiology 1 марта 2005 г.

Во второй из французских исследовательских групп работали наши бывшие соотечественники, изучавшие в Париже стрептококков, — Александр Болотин и Алексей Сорокин. Как вспоминает профессор Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Сергей Киселев, к Александру Болотину в то время “обратилась крупная фирма по производству йогуртов с просьбой разобраться, почему им перестало удаваться уничтожение ненужных бактерий в закваске. Для подавления их жизнедеятельности производители всегда использовали специальные вирусы, но в какой-то момент бактериофаги перестали убивать бактерии” (Веденеева, 2020). Именно А. Болотин первым описал теперь всем специалистам известный и широко используемый в молекулярной биологии белок стрептококков нуклеазу Cas9¹ (Bolotin et al., 2005). В ходе работы, А. Болотин с сотрудниками заметили, что спейсеры имеют общую последовательность на конце — примыкающий к протоспейсеру мотив (protospacer adjacent motif — PAM), необходимый для распознавания мишени (Bolotin et al., 2005).

Столь разные исследования (изучение биологического оружия и йогуртов), тем не менее, привели к схожим научным выводам. Обе группы, подтверждая гипотезу Ф. Мохики, высказались о роли CRISPR в формировании приобретенного иммунитета бактерий. В 2006 г. группа ученых США (все являлись выходцами из бывшего СССР) К.С. Макарова, Н.В. Гришин, С.А. Шабалина, Ю.И. Вольф, Е.В. Кунин (K.S. Makarova, N.V. Grishin, S.A. Shabalina, Y.I. Wolf, E.V. Koonin) (Makarova et al., 2006) проанализировала все доступные на тот момент геномы прокариот и обнаружила несколько кластеров генов, соответствующих белкам Cas. Исследователи классифицировали Cas на белковые семейства, описали их вероятные функциональные и структурные особенности. Предполагая, что система иммунной защиты CRISPR/Cas работает по принципу РНК-интерференции, они проанализировали схожесть Cas-белков с белками системы РНК-интерференции, но сходства не нашли. Макарова с соавт. (Makarova et al., 2006), тем не менее, сделали ряд предположений о механизме работы CRISPR/Cas и о том, как могут приобретаться новые спейсеры.

Без прямого экспериментального подтверждения находки лишь подкрепляли гипотезу, но не

¹ В то время Cas9 называлась Cas5 или Csn1.

доказывали ее безоговорочно. Однако доказательства красивой гипотезы о приобретенном иммунитете прокариот не заставили себя ждать: в 2007 г. исследовательская группа французского ученого Филиппа Хорвата (P. Horvath) (Barrangou et al., 2007) продемонстрировала, что после заражения вирусом, бактерии интегрировали новые спейсеры, полученные из геномных последовательностей фага; а удаление или добавление определенных спейсеров модифицировало фаго-резистентность прокариотической клетки. Они показали, что Cas9 является ключевым белком, необходимым для процесса, посредством которого система CRISPR инактивирует вторгающийся фаг (Barrangou et al., 2007). В очередной раз находке поспособствовал запрос пищевой промышленности: авторы статьи – Родольф Баррангу (R. Barrangou), Сильвен Муано (S. Moineau), Филипп Хорват, работали в то время на датского производителя пищевых ингредиентов Danisco (теперь DuPont) и занимались секвенированием геномов бактерий, используемых в качестве заквасочных культур в молочной промышленности для производства йогуртов и сыров. Они также секвенировали бактериофаги, заражавшие и разрушавшие молочные культуры (Nair, 2017). Примечательно, что с 2011 г. йогуртовые и сырные культуры DuPont “вакцинируются” против бактериофагов естественным образом с использованием CRISPR (Nair, 2017). В 2008 г. группой Джона ван дер Ооста (J. van der Oost), совместно с К.С. Макаровой и Е.В. Куниным (Brouns et al., 2008) было показано, что именно небольшие РНК (CRISPR RNA, crRNA), транскрибируемые с локуса CRISPR, связываются с белками Cas и являются проводниками (гидами) к ДНК-мишени для иммунной защиты. В том же 2008 г. Лучано Марраффини и Эрик Сонтхаймер (Marraffini, Sontheimer, 2008) описали механизм защиты бактерий от плазмидной ДНК, именно эти исследователи изящно продемонстрировали, что молекулой-мишенью белков Cas является ДНК, а не РНК. Они же первыми высказали предположение, что систему CRISPR/Cas можно использовать вне бактерий в качестве молекулярного инструмента: “С практической точки зрения, возможность направлять специфическое адресное разрушение ДНК, содержащей любую заданную последовательность-мишень из 24–48 нуклеотидов, может иметь значительную функциональную пользу, особенно если система может функционировать вне своего нативного бактериального или архейного контекста. ... Основное различие между системой рестрикции-модификации и интерференцией CRISPR заключается в том, что последняя может быть запрограммирована подходящей

эффекторной crRNA” (Marraffini, Sontheimer, 2008, перевод наш).

Тематика CRISPR наконец получила внимание, достойное ее значению. Новые открытия появлялись со скоростью нарастания снежного кома: группой Сильвена Муано (S. Moineau) (Gagneau et al., 2010) установлено, что комплекс Cas-crRNA разрезает чужеродную ДНК на 3 нуклеотида выше PAM; К.С. Макаровой с коллегами разработана классификация CRISPR/Cas систем (Makarova et al., 2011); Франсиско Мохика в 2010 г. подробно описал, как включается и выключается CRISPR система *E. coli*, и высказал предположение о механизме работы системы (Mojica, Díez-Villaseñor, 2010). Окончательная разгадка головоломки о механизме естественного иммунитета, управляемого CRISPR/Cas9, была найдена группой Эммануэль Шарпантье (E. Charpentier). В 2011 г. они выяснили, что в дополнение к crРНК существует вторая малая РНК, которую авторы назвали трансактивирующей CRISPR РНК (tracrRNA). Обнаружена последняя была с помощью секвенирования нового поколения, благо tracrRNA находится на 3 месте по распространенности в транскриптомах после рРНК и тРНК. Исследователи показали, что tracrRNA образует дуплекс с crРНК, и именно этот дуплекс направляет Cas9 к его ДНК-мишеням (Deltcheva et al., 2011).

Когда механизм работы CRISPR/Cas оказался окончательно расшифрован, научные изыскания сразу же переключились на тематику практического применения добытых знаний (ученые осознавали, сколь огромный потенциал кроется в обнаруженном механизме), что можно считать второй вехой развития обсуждаемой тематики. Изучение CRISPR/Cas начало осуществляться в отрыве от бактерий-хозяев: механизм работы CRISPR/Cas начал использоваться как инструмент для разрезания ДНК. Литовский биохимик Виргиниус Шикшнис, выпускник аспирантуры химфака МГУ, в 2011 г. смог “перенести” функциональный CRISPR/Cas из *S. thermophilus* и экспрессировать его в *E. coli*. Это подтвердило, что система CRISPR/Cas способна работать автономно, а все ее необходимые элементы (Cas9, crRNA и tracrRNA) уже известны (Sapranaukas et al., 2011). В 2012 г. его группа подробно охарактеризовала структуру Cas9, выявила ее нуклеазные домены, показала, что crRNA может быть укорочена до 20 нуклеотидов, и что мишени Cas9 можно менять, заменяя crRNA (Gasiunas et al., 2012). Авторы показали, что комплекс Cas9/crRNA/tracrRNA может расщеплять ДНК-мишень *in vitro*. В. Шикшнис представил свою статью в журнале Cell 6 апреля 2012 г., а 6 дней спустя журнал отклонил статью без рецензирова-

ния, В. Шикшнис сократил рукопись и отправил ее 21 мая в PNAS, где она была опубликована 4 сентября (Lander, 2016).

Технологическим прорывом стала работа Эммануэль Шарпантье (E. Charpentier) в сотрудничестве с Дженнифер Даудна (J.A. Doudna), которые в 2012 г. (Jinek et al., 2012) сообщили, что crRNA и tracrRNA могут быть объединены вместе в одну синтетическую гидовую РНК (sgRNA), именно такой технологией пользуются сейчас исследователи, которым для программирования прицельного разрезания ДНК необходимо лишь два элемента: нуклеаза Cas9 и гидовая РНК, которая направляет нуклеазу (Jinek et al., 2012). Как и В. Шикшнис, Э. Шарпантье и Д. Даудна показали, что Cas9 может разрезать очищенную ДНК *in vitro*, и что последняя может быть запрограммирована специально сконструированными crRNA. Их работа была подана в Science 8 июня и опубликована 28 июня 2012 г. Примерно в то же время Д. Даудна подала заявку на патент системы редактирования генов CRISPR/Cas9.

Наконец, в 2013 г. Фэн Чжан (Feng Zhang), который ранее работал с программируемыми нуклеазами TALEN (transcription activator-like effectors), первым успешно адаптировал CRISPR/Cas9 для редактирования генома в эукариотических клетках (Cong et al., 2013). Он применил CRISPR/Cas9 для прицельного редактирования разных локусов генома в клетках человека и мыши (Cong et al., 2013). Примерно в это же время аналогичные результаты представил Джордж Черч (G.M. Church) (Mali et al., 2013). После публикации, Фэн Чжан также подал заявку на патент от своего имени и смог получить его раньше, чем Д. Даудна.

НОБЕЛЕВСКАЯ ПРЕМИЯ

На сегодняшний день CRISPR считают наиболее важным открытием в молекулярной биологии со времен ПЦР, повлекшим создание новейшей и успешной технологии генной инженерии. И, понимая важность данного открытия, исследователи и люди, заинтересованные наукой, гадали, когда же будет вручена Нобелевская премия за CRISPR/Cas. Многие опасались, что от технологии ждут каких-то практических достижений, чтобы, наконец, вручить премию.

В 2020 г. Нобелевскую премию по химии получили Эммануэль Шарпантье и Дженнифер Даудна за развитие метода редактирования генов с помощью CRISPR/Cas9. Во-первых, это, конечно, выбор в пользу прикладной, а не фундаментальной науки, т.к. если бы премию вручали за открытие CRISPR/Cas, то ей, несомненно, стоило бы отметить заслуги Ф. Мохики. Тем не менее фор-

мулировка Нобелевского комитета недвусмысленно говорит именно о “развитии метода”. Во-вторых, за одно открытие Нобелевскую премию могут вручить максимум трем людям, и ее вручение двум исследовательницам, Шарпантье и Даудне, можно рассматривать как своего рода заявление Нобелевского комитета. До вручения частью научного сообщества считалось, что ее получают Шарпантье, Даудна и Чжан (реже третьим называли Шикшниса), как те, кто вложил большой вклад в применение CRISPR/Cas для редактирования геномов *in vitro* и *in vivo*, в прокариотических и эукариотических клетках.

В целом, в эпоху коллективизма в науке оправданность вручения Нобелевских премий двум-трем людям все больше ставится под сомнение, ведь многие открытия — достижение не одного десятка ученых и их научных коллективов.

СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ CRISPR/Cas

Одним из наиболее заинтересованных в CRISPR/Cas промышленных секторов является сельское хозяйство. Прицельное редактирование геномов растений активно используют для повышения урожайности плодовых и зерновых культур, придания им устойчивости к заболеваниям и изменению погодных условий, а также других желаемых качеств. Например, редактирование генов, связанных с цитокиновым сигналингом, позволило значительно увеличить урожайность риса и пшеницы (Cong et al., 2013; Wang et al., 2014). Мутирование генов *CLV* (Rodríguez-Leal et al., 2017) and *ENO* (Yuste-Lisbona et al., 2020), ответственных за размер меристемы, позволило увеличить урожайность томатов. Людям, страдающим целиакией, важно контролировать потребление в пищу глютена, которым особенно богаты продукты из пшеницы. С помощью технологии CRISPR/Cas была создана разновидность пшеницы со сниженным содержанием глютена и на 85% меньшей иммунорегенностью. Такого результата было практически невозможно достичь классическими методами скрещивания, так как в геноме пшеницы белки группы глютенов разбросаны в около сотне локусов (Sánchez-León et al., 2018). Большинство генетически модифицированных растений все еще находятся на стадии разработки и не используются для массового культивирования, однако есть и немало исключений. К настоящему времени уже более сотни разновидностей растений, выведенных методом CRISPR/Cas, официально разрешены к выращиванию. Это, например, соя с повышенным содержанием олеиновой кислоты за счет мутации в гене десатуразы омега-6 жирных кис-

лот и пшеница, устойчивая к мучнистой росе за счет редактирования локуса генов *MLO*, подавляющих защитные механизмы растения против грибковых инфекций (Wang et al., 2014).

Еще одно перспективное направление для использования CRISPR/Cas в живых организмах — редактирование геномов переносчиков инфекционных и паразитарных заболеваний для снижения численности их популяций, либо снижения способности передавать те или иные болезни: например, ведутся исследования по индуцированию стерильности малярийных комаров (North et al., 2020), что способно привести к существенному сокращению популяций переносчиков малярии. Такая инженерия сможет помочь контролировать передачу болезней и защитить экосистемы от опасных для человека видов.

Генная инженерия с использованием CRISPR/Cas предоставляет также уникальные медицинские возможности: например, с помощью данной технологии возможно производство органов свиньи, совместимых с человеческим организмом с целью трансплантации. Использование технологии CRISPR/Cas решает трансплантационные проблемы совместимости и иные проблемы, связанные с использованием органов свиньи у человека. К ним относится проблема патологичности для человека свинных эндогенных ретровирусов. В лаборатории Джорджа Черча успешно применили CRISPR/Cas9 для инактивации всех 62 копий ретровирусов в клетках свиньи (Yang et al., 2015); что, кстати, стало рекордом по количеству модифицированных локусов в одиночном эксперименте. Ученый-хирург Мухаммад Мохиуддин, уроженец Пакистана, занимается проблемами иммуносовместимости между свинными органами и человеческим организмом при ксенотрансплантации сердца в Университете Мэриленда, США. Его группа создала свиней с нокаутом трех генов, ответственных за синтез углеводных антигенов и отторжение организмом человека свиного сердца (*GGTA1KO*, *β4GalNT2KO*, *СМАНКО*), нокаутом гена рецептора гормона роста (*GHR*) для торможения роста сердца свиньи в теле человека, а также с добавлением шести генов человека: двух противовоспалительных (*hCD47*, *hHO-1*), двух генов, которые способствуют нормальному свертыванию крови (*hTBM*, *hEPCR*), и двух генов регуляторов системы комплемента (*hCD46*, *hDAF*) (Goerlich et al., 2021). Пересадка сердца от генномодифицированных свиней была испытана на бабуинах и показала хорошие результаты (Goerlich et al., 2021). Благодаря работе команды Мохиуддина, громким достижением нынешнего года стала первая в мире пересадка сердца генномодифицированной сви-

ньи человеку 7 января 2022 г. группой М. Мохиуддина (Reardon, 2022; Jee, 2022).

В 2021 г. были опубликованы результаты клинических испытаний применения CRISPR/Cas9 в человеческих клетках *ex vivo*. Группа доктора Хайдара Франгула (Haydar Frangoul) осуществила редактирование гематopoэтических стволовых клеток с целью нокаута энхансера *BCL11A* у двух пациентов с серповидно-клеточной анемией и β-талассемией (моногенные заболевания, вызванные мутациями гена *HBB*, кодирующего β-субъединицу гемоглобина) (Frangoul et al., 2021). *BCL11A* — репрессор экспрессии γ-субъединицы гемоглобина, и его нокаут приводит к росту экспрессии фетального гемоглобина HbF, что увеличивает выживаемость у пациентов с серповидно-клеточной анемией и β-талассемией. *Ex vivo* скорректированные клетки были возвращены пациентам (аутологичная трансплантация гематopoэтических стволовых клеток), что привело к росту концентрации в крови HbF и облегчению симптомов заболевания (Kaiser, 2020; Frangoul et al., 2021).

В настоящее время исследования самой технологии CRISPR/Cas активно развиваются по нескольким направлениям, включая разработку эффективных способов доставки компонентов CRISPR/Cas в клетки (в виде ДНК, РНК или рибонуклеопротеинов) с использованием биологических (вирусы, вирусоподобные частицы, пептиды клеточной пенетрации), химических (липосомы, наночастицы) и физических методов (электропорация, сонопорация, микроинъекция) (Taha et al., 2022); а также разработку подходов, нацеленных на улучшение целевой (on-target) и снижение нецелевой мутагенной (off-target) активности Cas белков (Nidhi et al., 2021). Для минимизации нецелевого редактирования разрабатываются различные программные обеспечения, нацеленные на *in silico* предсказание off-target активности и подбор оптимальных и специфичных гидовых РНК; используются химически-модифицированные гидовые РНК, обладающие большей специфичностью; отбираются и конструируются улучшенные варианты нуклеаз Cas (Naeem et al., 2020).

Стоит отметить, что в России также есть ряд научных групп, которые занимаются исследованием системы CRISPR/Cas и разработкой технологий на ее основе. Научная группа Константина Викторовича Северинова из Сколковского института науки и технологий (SkolTech) занимается предсказанием и функциональной характеристикой новых систем CRISPR/Cas. Сергей Шмаков из команды Северинова создал полуавтоматическую поисковую систему, которая обнаруживает новые системы CRISPR/Cas (Shmakov et al., 2019). С

применением этой программы участниками исследовательской группы К.В. Северинова был найден, описан и охарактеризован белок C2c2 (ныне Cas13a), уникальный тем, что он разрезает не ДНК, а РНК (Abudayyeh et al., 2016). Яна Федорова, также из команды К.В. Северинова, с соавт. (Fedorova et al., 2020) описала компактный ортолог Cas9, обладающий все теми же функциональными особенностями, но уменьшенный в размере, что облегчает его доставку в клетки. Научная группа Сурена Минасовича Закияна (лаборатория эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН) успешно работает над созданием клеточных моделей различных нейродегенеративных заболеваний человека (Medvedev et al., 2021), в том числе с использованием системы CRISPR/Cas9 – болезни Хантингтона (Morozova et al., 2018; Malankhanova et al., 2020), бокового амиотрофического склероза (Ustyantseva et al., 2019), спинальной мышечной атрофии (Валетдинова и др., 2017). В лаборатории биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ научная группа Максима Николаевича Карагяура активно занимается исследованием применения технологии CRISPR/Cas для нокаутирования генов интереса, для регуляции экспрессии генов на эпигенетическом уровне, для моделирования однонуклеотидных полиморфизмов с целью создания клеточных и тканевых моделей изучения процессов развития и регенерации тканей (Karagyaour et al., 2018; Rysenkova et al., 2018; Tyurin-Kuzmin et al., 2018; Dyikanov et al., 2019; Слободкина и др., 2020; Rusanov et al., 2020). Среди других интересных работ российских ученых – разработка метода быстрой сортировки клеток с генетическими модификациями после действия CRISPR/Cas9 на основе короткого пептида в Институте биологии гена (Zotova et al., 2019) и применение технологии CRISPR/Cas9 для одновременного создания двух–трех двухцепочечных разрывов в разных хромосомах для изучения механизмов хромосомных транслокаций в Институте биологии развития (Shmakova et al., 2019; Canoy, Vassetzky, 2021).

Таким образом, использование технологии редактирования генома CRISPR/Cas в различных сферах и в различных организмах, предоставляет уникальные производственные и медицинские возможности для улучшения качества жизни.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ CRISPR/Cas ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ НАСЛЕДУЕМОЙ ДНК

Поскольку система CRISPR/Cas – это удобный инструмент редактирования генома, почти

сразу после описания ее использования в эукариотических клетках начались исследования возможности ее применения в человеческих эмбрионах как для корректировки патологических мутаций, так и для фундаментальных исследований раннего эмбрионального развития человека. Изучению подвергались эффективность данного подхода, нецелевая мутагенность, частота редактирования (мозаицизм эмбрионов), возможность последующего развития эмбрионов (Ormond et al., 2017; Lea, Niakan, 2019). Источниками эмбрионов в таких работах являются невоплощенные эмбрионы от процедуры экстракорпорального оплодотворения (Fogarty et al., 2017). Оказалось, что нокаутные модели на мышах не всегда точно отражают роль изучаемых генов в эмбриональном развитии человека (Fogarty et al., 2017). Несмотря на разные подходы, точное прицельное редактирование эмбрионов (за счет репарации ДНК по механизму гомологичной рекомбинации) остается низкоэффективным, в большинстве случаев после двухцепочечных разрывов возникают делеции или инсерции, а механизмы ранней эмбриональной репарации ДНК мало изучены (Ma et al., 2017). По этой причине использование CRISPR/Cas для корректировки патологических мутаций в эмбрионах затруднено. Вместе с этим, использование CRISPR/Cas для прицельного мутагенеза и нокаута генов также представляет определенные риски: по-видимому, двухцепочечные разрывы, вносимые Cas9 в одном локусе, приводят к делециям, которые могут простираются на несколько тысяч оснований, в том числе в эмбриональных и прогениторных клетках (Kosicki et al., 2018).

Несмотря на значительный прогресс в данной области, существует ряд опасений по поводу клинического использования CRISPR/Cas у людей: все настойчивее ставятся вопросы как безопасности метода, так и этичности его применения. Прецедентом стало дело Хэ Цзянькуя – исследователя из Южного научно-технологического университета в Шэньчжэне (Китай), применившего CRISPR/Cas для модификации генома человеческих эмбрионов. Предоставляя услуги по экстракорпоральному оплодотворению, группа Хэ Цзянькуя предложила паре, в которой мужчина был инфицирован ВИЧ, произвести генетическую модификацию гена CCR5 в эмбрионах, которая привела бы к устойчивости клеток к заражению ВИЧ (Regalado, 2019). Естественная мутация CCR5Δ32 встречается в Европе и Западной Азии, где ее средняя частота составляет примерно 10%, и гомозиготы по мутантной аллели действительно имеют резистентность к ВИЧ (Novembre et al., 2005; Lopalco, 2010). По утверждению Хэ Цзянькуя, который заявил о своем экспери-

менте в ноябре 2018 г., редактирование генома прошло успешно и привело к рождению здоровых девочек-близнецов Лулу и Наны (Cyranski, Ledford, 2018). Стоит отметить, что ни план, ни результаты данной работы не были полностью опубликованы или подвергнуты рецензированию научным сообществом. 29 ноября 2018 г. власти Китая приостановили научную деятельность Хэ Цзянькуя, в его отношении было заведено уголовное дело за нарушение китайского законодательства в области экспериментов с людьми и за оказание нелегальной медицинской помощи, в декабре 2019 г. ученый был приговорен к 3 г. лишения свободы и штрафу в 3 млн юаней.

Хэ Цзянькуй, пытаясь опубликовать результаты своего громкого эксперимента, подал статью под названием “Рождение близнецов после редактирования генома для устойчивости к ВИЧ” в *Nature* и *JAMA*, обоими журналами статья была отвергнута (Regalado, 2019). Что интересно, в соавторах Хэ Цзянькуя был указан Майкл Дим, ученый из Университета Райса (Хьюстон, Техас, США). Несмотря на утверждения о том, что он не давал согласия на публикацию данных, в отношении М. Дима началась служебная проверка, результаты которой засекречены, но по состоянию на 2021 он больше не работает в Университете Райса.

Исследование Хэ Цзянькуя подверглось жесткой критике со стороны ученых по нескольким причинам:

1. Утверждения, заявленные в статье, не подтверждаются предоставленными данными. Несмотря на то, что в статье указано, что они пытались воспроизвести частый вариант мутации CCR5Δ32, фактически, это не так: в ген CCR5 были внесены другие мутации, роль которых в обеспечении резистентности к вирусу не изучена даже *in vitro*. В так и неопубликованной статье не приводилось доказательств, что генетическая манипуляция действительно привела к резистентности в отношении ВИЧ, хотя это можно было проверить до имплантации эмбрионов. Более того, анализируя данные секвенирования, приведенные в статье, можно заметить “частокот”, протяженный регион множественных неинтерпретируемых пиков в данных секвенса в гене CCR5 (Regalado, 2019), что говорит о мозаичности эмбрионов, т.е. разные клетки имеют разные мутации в этом регионе, роль которых также не изучена.

2. Родители близнецов могли быть мало информированы о природе эксперимента или согласиться на проведение эксперимента под давлением. В настоящий момент существуют устоявшиеся эффективные протоколы для экстракорпорального оплодотворения у ВИЧ+ родителей, которые сво-

дят риски заражения эмбриона или плода к нулю. В связи с этим, процедура модификации генома не давала никакого медицинского преимущества, но приносила неоправданные риски, о чем пара могла быть не осведомлена. Более того, в Китае ВИЧ-положительные люди не имеют доступа к лечению бесплодия и экстракорпоральному оплодотворению, что указывает на то, что пара могла пойти на эксперимент вынужденно, так как это давало им единственный шанс иметь ребенка.

3. Заявленное медицинское преимущество декации CCR5 вызывает сомнение. Даже если метод CRISPR эффективен для создания людей, устойчивых к ВИЧ, он вряд ли будет широко использоваться, особенно в местах, где разворачивается эпидемия ВИЧ, например, в южной Африке, ввиду его сложности, дороговизны, необходимости постоянного контроля и целого ряда других причин. Вероятно, потребуется много десятилетий широкого использования генетического редактирования с использованием CRISPR (при условии его эффективности), чтобы остановить эпидемию ВИЧ. Инициативы в области общественного здравоохранения, образования и широкого доступа к антиретровирусным препаратам являются более логичными и эффективными решениями для контроля над эпидемией ВИЧ.

4. Побочные эффекты применения редактирования генома людей мало изучены, и исследователи под руководством Хэ Цзянькуя приступили к созданию генетически модифицированных живых людей до того, как полностью осознали последствия внесенных ими правок. Технология CRISPR/Cas не обладает 100% специфичностью в отношении выбранного гена и внесение нуклеазы с гидовой РНК может приводить к непреднамеренным мутациям в других местах генома (т.н. off-target). Команда Хэ Цзянькуя тестировала отобранные 3–5 клеток из эмбрионов на ранней стадии до имплантации на off-target мутации и нашла однонуклеотидную вставку в некодирующем участке генома у одного эмбриона. Однако ключевой проблемой здесь является то, что секвенирование на предмет мутаций подразумевает лизирование клеток и выделение ДНК, т.е. протестированные клетки не могут быть в дальнейшем использованы для оплодотворения и могут отличаться от эмбриона, из которого они взяты. И напротив, эмбрионы, которые дали начало близнецам, не могли быть полностью проверены на наличие off-target мутаций в каждой из клеток. К примеру, использование CRISPR/Cas9 на эмбрионах овцы совместно с предимплантационным скринингом и отбором эмбрионов с желаемой мутацией приводит тем не менее к мозаицизму у половин плодов (Vilarino et al., 2018). В недавнем

исследовании применения CRISPR/Cas9 на человеческих эмбрионах для коррекции гена *EYS* обнаружено, что on-target и off-target разрезание Cas9 может приводить к полным или частичным хромосомальным потерям (Zuccaro et al., 2020).

В заключение необходимо еще раз подчеркнуть, что генетическая модификация людей на эмбриональной стадии продолжает считаться процедурой с недоказанной степенью риска и массовое внедрение технологии CRISPR/Cas потребует введения законов, гарантирующих, что технология не будет использоваться с нарушением этических правил.

Помимо редактирования генома эмбриона человека, к наследуемым изменениям относится редактирование половых клеток человека (сперматозоидов, яйцеклеток). Введение в яйцеклетки компонентов CRISPR/Cas9 совместно со сперматозоидами (в рамках экстракорпорального оплодотворения) предлагалось для повышения эффективности редактирования и снижения риска мозаицизма эмбрионов (Ma et al., 2017). Генетическая модификация сперматогонияльных стволовых клеток была испытана на мышах (Wu et al., 2015), свиньях (Webster et al., 2021). Однако, в целом, экспериментальные разработки по редактированию половых клеток человека довольно немногочисленные.

Руководящие этические и социальные принципы касательно клинического редактирования генома эмбриона человека были изложены американскими Национальными академиями наук, инженерии и медицины и английским советом Наффилда по биоэтике (National Academies of Sciences, 2017; Nuffield Council on Bioethics, 2018). В 2019 г. было опубликовано призыв ряда ведущих ученых, среди которых Эммануэль Шарпантье, Эрик Ландер, Фэн Чжан, к глобальному мораторию на любое клиническое использование редактирования наследуемой ДНК (в сперматозоидах, яйцеклетках или эмбрионах) для создания генетически модифицированных детей по технологическим, научным, медицинским и этическим соображениям (Lander et al., 2019). В 2020 г. было выпущено Женевское заявление о необходимости корректировки курса в редактировании наследуемого генома человека (Andorno et al., 2020). Его авторы настаивают, что перед началом любых шагов в сторону репродуктивного редактирования генома человека, требуется достигнуть глобального общественного консенсуса. В программу корректировки курса авторы включили разъяснение широкой общественности сложившихся недопониманий, связанных с редактированием генома, выдвижение на первый план социальных вопросов, в т.ч. вопросов равенства, и разработку критериев расширения прав и возможностей об-

щественности влиять на принятие решений в данной области.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Еще 20 лет назад система CRISPR/Cas была известна лишь узкому кругу ученых, занимавшихся этой проблемой. Загадочная система повторов и спейсеров интересовала лишь некоторых микробиологов, работавших с бактериями или археями и не надевавшихся на грандиозные научные прорывы. Сегодня методика стала предметом пристального внимания всего научного сообщества, включая как узких специалистов, так и историков науки, философов, обсуждающих возникшие этические проблемы, а также общества в целом. По тематике CRISPR/Cas активно получают гранты, по ней охотно публикуются статьи. Следует помнить, что только неугасающий интерес первооткрывателей (в особенности, Франсиско Мохики), позволил нам оказаться на том уровне знаний, на котором мы сейчас находимся.

В настоящее время исследователи почти каждой биохимической, молекулярно-биологической или цитологической лаборатории используют CRISPR/Cas для редактирования генома. Бурное развитие методики привело общество к поворотному пункту: перед нами открылась возможность редактировать геномы людей. Тем не менее осознаны и существующие риски. Является ли технология полностью безопасной для человека ввиду возможных off-target эффектов? Как исключить возможное преступное и античеловечное использование методики? Невозможность протестировать побочные эффекты CRISPR/Cas на ранних стадиях развития эмбриона (вплоть до рождения) приводит к важной морально-этической проблеме: кто будет нести ответственность в случае рождения ребенка с генетическими аномалиями?

Появляются и иные насущные вопросы: можно ли применять CRISPR/Cas для бессмертных, купируемых заболеваний? Можно ли применять CRISPR/Cas на популяционном уровне? Не вызовет ли внедрение в практику этой современной и дорогой технологии еще большего разделения между бедными и богатыми, давая последним больше преимуществ? Наконец, можно ли массово применять CRISPR/Cas для «улучшения» генетики людей?

Казалось бы, совсем недавно в фантастической литературе описывалось, как можно по заказу менять фенотипические признаки людей вплоть до выбора цвета глаз или волос. Сейчас же представляется, что эта возможность не так фантастична. Но если цвет глаз и волос — это поли-

генные признаки, изменение которых с помощью CRISPR/Cas сложно или даже невозможно, то редактирование единичных генов выглядит разрешимой научной задачей. Прецедент с редактированием гена CCR5 заставил глубоко задуматься всю информированную общественность, ведь помимо описанной резистентности к ВИЧ, мутация CCR5 ассоциирована с улучшением памяти и способности к обучению (Zhou et al., 2016). Захотят ли будущие родители улучшать когнитивные способности своих еще нерожденных детей за счет редактирования генома?

На все подобные вопросы предстоит ответить в недалеком будущем, лучше сделать это прежде, чем приступать к редактированию генома людей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (075-15-2020-773) и программы фундаментальных исследований ИБР РАН (0088-2021-0007).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Валетдинова К.Р., Овечкина В.С., Григорьева Е.В. и др. Использование системы CRISPR/CAS9 для изучения клеточной модели спинальной мышечной атрофии // *Гены и клетки*. 2017. Т. 12. № 3.
- Веденеева Н. Нобель по химии 2020: кто изменил код жизни курицы-несушки URL: <https://www.mk.ru/science/2020/10/07/nobel-po-khimii-2020-kto-izmenil-kod-zhizni-kuricynesushki.html> (дата обращения: 23.01.2022).
- Слободкина Е.А., Карагяур М.Н., Балабаньян В.Ю. и др. Генная терапия в регенеративной медицине: последние достижения и актуальные направления развития // *Гены и клетки*. 2020. Т. 15. № 1. С. 6–16.
- Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector // *Science*. 2016. V. 353. № 6299. P. aaf5573.
- Andorno R., Baylis F., Darnovsky M. et al. Geneva statement on heritable human genome editing: the need for course correction // *Trends in Biotechnology*. 2020. V. 38. № 4. P. 351–354.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // *Science*. 2007. V. 315. № 5819. P. 1709–1712.
- Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A. et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin // *Microbiology*. 2005. V. 151. № 8. P. 2551–2561.
- Brouns S.J.J., Jore M.M., Lundgren M. et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes // *Science*. 2008. V. 321. № 5891. P. 960–964.
- Canoy R.J., Vassetzky Y.S. Factors that affect chromosomal translocations in cells: Doctoral dissertation. Paris: Université Paris-Saclay, 2021. 176 p.
- Cong L., Ran F.A., Cox D. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science*. 2013. V. 339. № 6121. P. 819–823.
- Cyranoski D., Ledford H. How the genome-edited babies revelation will affect research URL: <https://www.nature.com/articles/d41586-018-07559-8> (дата обращения: 23.01.2022).
- Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III // *Nature*. 2011. V. 471. № 7340. P. 602–607.
- Dyikanov D.T., Vasiliev P.A., Rysenkova K.D. et al. Optimization of CRISPR/Cas9 technology to knock out genes of interest in aneuploid cell lines // *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2019. V. 25. № 3. P. 168–175.
- Fedorova I., Vasileva A., Selkova P. et al. PpCas9 from *Pasteurella pneumotropica* – a compact Type II-C Cas9 ortholog active in human cells // *Nucleic Acids Research*. 2020. V. 48. № 21. P. 12297–12309.
- Fernández C.R. Francis Mojica, the spanish scientist who discovered CRISPR URL: <https://www.labiotech.eu/interview/francis-mojica-crispr-interview/> (дата обращения: 05.02.2022).
- Fogarty N.M.E., McCarthy A., Snijders K.E. et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis // *Nature*. 2017. V. 550. № 7674. P. 67–73.
- Frangoul H., Altshuler D., Cappellini M.D. et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia // *N. Engl. J. Med.* 2021. V. 384. № 3. P. 252–260.
- Garneau J.E., Dupuis M.-È., Villion M. et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA // *Nature*. 2010. V. 468. № 7320. P. 67–71.
- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P. et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 39. P. E2579–E2586.
- Goerlich C.E., Griffith B., Hanna P. et al. The growth of xenotransplanted hearts can be reduced with growth hormone receptor knockout pig donors // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2021. P. S0022-5223(21)01261–7.
- Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats // *BMC Bioinformatics*. 2007. V. 8. № 1. P. 172.

- Groenen P.M., Bunschoten A.E., Soolingen D. van et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method // Mol. Microbiol. 1993. V. 10. № 5. P. 1057–1065.
- Hille F., Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2016. V. 371. № 1707. P. 20150496.
- Hille F., Richter H., Wong S.P. et al. The biology of CRISPR-Cas: Backward and forward // Cell. 2018. V. 172. № 6. P. 1239–1259.
- Hoe N.P., Nakashima K., Lukomski S. et al. Rapid selection of complement-inhibiting protein variants in group A *Streptococcus epidemic* waves // Nat. Med. 1999. V. 5. № 8. P. 924–929.
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K. et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product // J. Bacteriol. 1987. V. 169. № 12. P. 5429–5433.
- Jansen R., Embden J.D.A. van, Gaastra W. et al. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes // OMICS. 2002a. V. 6. № 1. P. 23–33.
- Jansen R., Embden J.D.A. van, Gaastra W. et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes // Mol. Microbiol. 2002b. V. 43. № 6. P. 1565–1575.
- Jee C. A gene-edited pig's heart has been transplanted into a human for the first time URL: <https://www.technologyreview.com/2022/01/11/1043374/gene-edited-pigs-heart-transplant/> (дата обращения: 31.01.2022).
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // Science. 2012. V. 337. № 6096. P. 816–821.
- Kaiser J. CRISPR and another genetic strategy fix cell defects in two common blood disorders URL: <https://www.science.org/content/article/crispr-and-another-genetic-strategy-fix-cell-defects-two-common-blood-disorders> (дата обращения: 18.02.2022).
- Karagyaour M.N., Rubtsov Y.P., Vasiliev P.A. et al. Practical recommendations for improving efficiency and accuracy of the CRISPR/Cas9 genome editing system // Biochemistry (Mosc). 2018. V. 83. № 6. P. 629–642.
- Kosicki M., Tomberg K., Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. № 8. P. 765–771.
- Lander E.S. The heroes of CRISPR // Cell. 2016. V. 164. № 1. P. 18–28.
- Lander E.S., Baylis F., Zhang F. et al. Adopt a moratorium on heritable genome editing // Nature. 2019. V. 567. № 7747. P. 165–168.
- Lea R., Niakan K. Human germline genome editing // Nat. Cell. 2019. V. 21. № 12. P. 1479–1489.
- Lopalco L. CCR5: From natural resistance to a new anti-HIV strategy // Viruses. 2010. V. 2. № 2. P. 574–600.
- Ma H., Marti-Gutierrez N., Park S.-W. et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos // Nature. 2017. V. 548. № 7668. P. 413–419.
- Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A. et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action // Biol. Direct. 2006. V. 1. P. 7.
- Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R. et al. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems // Nat. Rev. Microbiol. 2011. V. 9. № 6. P. 467–477.
- Malankhanova T., Sorokin M., Medvedev S. et al. Introducing an expanded trinucleotide repeat tract into the human genome for Huntington's disease modeling *in vitro* // Curr. Protoc. Hum. Genet. 2020. V. 106. № 1. P. e100.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 // Science. 2013. V. 339. № 6121. P. 823–826.
- Marraffini L.A., Sontheimer E.J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA // Science. 2008. V. 322. № 5909. P. 1843–1845.
- Masepohl B., Görlitz K., Böhme H. Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1307. № 1. P. 26–30.
- Medvedev S.P., Malankhanova T.B., Valetdinova K.R. et al. Creation and research of cell models of hereditary neurodegenerative diseases using directed genome editing // Neurochem. J. 2021. V. 15. № 4. P. 353–358.
- Mojica F., Garrett R. Discovery and seminal developments in the CRISPR field // CRISPR-Cas Systems: RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea / Eds. Barrangou R., van der Oost J. Springer VS, 2013. P. 1–31.
- Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., Soria E. et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria // Mol. Microbiol. 2000. V. 36. № 1. P. 244–246.
- Mojica F.J., Ferrer C., Juez G. et al. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning // Mol. Microbiol. 1995. V. 17. № 1. P. 85–93.
- Mojica F.J., Juez G., Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites // Mol. Microbiol. 1993. V. 9. № 3. P. 613–621.
- Mojica F.J.M., Díez-Villaseñor C. The on-off switch of CRISPR immunity against phages in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 2010. V. 77. № 6. P. 1341–1345.
- Mojica F.J.M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J. et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // J. Mol. Evol. 2005. V. 60. № 2. P. 174–182.
- Mojica F.J.M., Rodríguez-Valera F. The discovery of CRISPR in Archaea and Bacteria // The FEBS J. 2016. V. 283. № 17. P. 3162–3169.
- Morozova K.N., Suldina L.A., Malankhanova T.B. et al. Introducing an expanded CAG tract into the *huntingtin* gene causes a wide spectrum of ultrastructural defects in cultured human cells // PLoS One. 2018. V. 13. № 10. P. e0204735.

- Naeem M., Majeed S., Hoque M.Z. et al. Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-mediated genome editing // *Cells*. 2020. V. 9. № 7. P. 1608.
- Nair P. QnAs with Rodolphe Barrangou // *PNAS*. 2017. V. 114. № 28. P. 7183–7184.
- Nakata A., Amemura M., Makino K. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome // *J. Bacteriology*. 1989. V. 171. № 6. P. 3553–3556.
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, National Academy of Medicine; National Academy of Sciences, Committee on Human Gene Editing: Scientific, Medical, and Ethical Considerations. Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance. Washington (DC): National Academies Press, 2017. PMID: 28796468.
- Nidhi S., Anand U., Oleksak P. et al. Novel CRISPR–Cas systems: an updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. V. 22. № 7. P. 3327.
- North A.R., Burt A., Godfray H.C.J. Modelling the suppression of a malaria vector using a CRISPR-Cas9 gene drive to reduce female fertility // *BMC Biology*. 2020. V. 18. № 1. P. 98.
- Novembre J., Galvani A.P., Slatkin M. The geographic spread of the CCR5 $\Delta 32$ HIV-resistance allele // *PLoS Biol*. 2005. V. 3. № 11. P. e339.
- Nuffield Council on Bioethics. Genome editing and human reproduction: social and ethical issues. London: Nuffield Council on Bioethics, 2018. 205 p.
- Ormond K.E., Mortlock D.P., Scholes D.T. et al. Human germline genome editing // *Am. J. Hum. Genet*. 2017. V. 101. № 2. P. 167–176.
- Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies // *Microbiology*. 2005. V. 151. Pt 3. P. 653–663.
- Reardon S. First pig-to-human heart transplant: what can scientists learn? // *Nature*. 2022. V. 601. № 7893. P. 305–306.
- Regalado A. China's CRISPR babies: Read exclusive excerpts from the unseen original research URL: <https://www.technologyreview.com/2019/12/03/131752/chinas-crispr-babies-read-exclusive-excerpts-he-jiankui-paper/> (дата обращения: 23.01.2022).
- Rodríguez-Leal D., Lemmon Z.H., Man J. et al. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing // *Cell*. 2017. V. 171. № 2. P. 470–480. e8.
- Rusanov A., Kozhin P., Romashin D. et al. Impact of p53 modulation on interactions between p53 family members during HaCaT keratinocytes differentiation // *Bulletin of Russian State Medical University*. 2020.
- Rysenkova K.D., Semina E.V., Karagyaour M.N. et al. CRISPR/Cas9 nickase mediated targeting of urokinase receptor gene inhibits neuroblastoma cell proliferation // *Oncotarget*. 2018. V. 9. № 50. P. 29414–29430.
- Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V. et al. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9 // *Plant Biotechnology J*. 2018. V. 16. № 4. P. 902–910.
- Sapranaukas R., Gasiunas G., Fremaux C. et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res*. 2011. V. 39. № 21. P. 9275–9282.
- Shmakov S.A., Faure G., Makarova K.S. et al. Systematic prediction of functionally linked genes in bacterial and archaeal genomes // *Nat. Protoc*. 2019. V. 14. № 10. P. 3013–3031.
- Shmakova A.A., Germini D., Vassetzky Y.S. Exploring the features of Burkitt's lymphoma-associated t(8;14) translocations generated via a CRISPR/Cas9-based system // *Biopolymers and Cell*. 2019. V. 35. № 3. P. 232–233.
- Taha E.A., Lee J., Hotta A. Delivery of CRISPR-Cas tools for *in vivo* genome editing therapy: Trends and challenges // *J. Controlled Release*. 2022. V. 342. P. 345–361.
- Tyurin-Kuzmin P.A., Karagyaour M.N., Rubtsov Y.P. et al. CRISPR/Cas9-mediated modification of the extreme C-terminus impairs PDGF-stimulated activity of Duox2 // *Biol. Chem*. 2018. V. 399. № 5. P. 437–446.
- Ustyantseva E.I., Medvedev S.P., Vetchinova A.S. et al. A platform for studying neurodegeneration mechanisms using genetically encoded biosensors // *Biochemistry (Moscow)*. 2019. V. 84. № 3. P. 299–309.
- Vilarino M., Suchy F.P., Rashid S.T. et al. Mosaicism diminishes the value of pre-implantation embryo biopsies for detecting CRISPR/Cas9 induced mutations in sheep // *Transgenic Res*. 2018. V. 27. № 6. P. 525–537.
- Wang Y., Cheng X., Shan Q. et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew // *Nat. Biotechnol*. 2014. V. 32. № 9. P. 947–951.
- Webster D., Bondareva A., Solin S. et al. Targeted gene editing in porcine spermatogonia // *Frontiers in Genetics*. 2021. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.627673>
- Wu Y., Zhou H., Fan X. et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells // *Cell Res*. 2015. V. 25. № 1. P. 67–79.
- Yang L., Güell M., Niu D. et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs) // *Science*. 2015. V. 350. № 6264. P. 1101–1104.
- Yuste-Lisbona F.J., Fernández-Lozano A., Pineda B. et al. ENO regulates tomato fruit size through the floral meristem development network // *PNAS*. 2020. V. 117. № 14. P. 8187–8195.
- Zhou M., Greenhill S., Huang S. et al. CCR5 is a suppressor for cortical plasticity and hippocampal learning and memory // *eLife*. 2016. V. 5. P. e20985.
- Zotova A., Pichugin A., Atemasova A. et al. Isolation of gene-edited cells via knock-in of short glycoposphatidylinositol-anchored epitope tags // *Sci. Rep*. 2019. V. 9. № 1. P. 3132.
- Zuccaro M.V., Xu J., Mitchell C. et al. Allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos // *Cell*. 2020. V. 183. № 6. P. 1650–1664. e15.

CRISPR/Cas: History and Perspectives

A. A. Shmakova^{1, 2, *}, O. P. Shmakova³, A. A. Karpukhina¹, and Y. S. Vassetzky^{1, **}

¹*Koltsov Institute of Developmental Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

²*Laboratory of Molecular Endocrinology, Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Cardiology named after academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 121552 Russia*

³*Adolescent Psychiatry Research Unit, Federal State Budgetary Scientific Institution Mental Health Research Center, Moscow, 115522 Russia*

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

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

Discovery of the CRISPR/Cas system revolutionized biology and biomedicine in the 21st century. Here we discuss the milestones in the development of CRISPR/Cas genome editing technology, from the history of discovery to current developments, including medical applications. Technical and ethical problems associated with the use of CRISPR/Cas for editing human embryonic genomes are also discussed.

Keywords: CRISPR, Cas, genome editing, history of science

**ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ МИКРОГЛИИ В УСТАНОВЛЕНИИ СВЯЗИ
МЕЖДУ ЦЕНТРАЛЬНОЙ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМОЙ**© 2022 г. Е. А. Колос^а, *, Д. Э. Коржевский^а^аФГБНУ Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: koloselena1984@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.12.2021 г.

После доработки 21.01.2022 г.

Принята к публикации 28.01.2022 г.

В настоящем исследовании изучены локализация и распределение микроглиоцитов в эмбриональном спинном мозге (СМ) крысы в период формирования связей между центральной и периферической нервной системой и становления сенсорных путей спинного мозга. Используя антитела к белку Iba-1 для идентификации клеток микроглии и антитела к периферину для выявления первичных афферентов нейронов спинномозгового ганглия (СМГ), показано, что плотность популяции микроглиоцитов в формирующейся зоне входа дорсального корешка возрастает почти в два раза в период с 14 по 15 сут эмбрионального развития. Показано, что в этот срок сенсорные афференты крысы еще не проникают в формирующееся серое вещество СМ, а остаются в пределах маргинального слоя до 16 суток развития (период ожидания). В более поздние сроки пренатального развития число микроглиоцитов в изучаемой области СМ постепенно уменьшается. К моменту рождения плотность клеток микроглии снижается в 4 раза по сравнению с 15 сут эмбриогенеза. Полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы об участии микроглии во временном блокировании врастания отростков нейронов спинномозгового ганглия в спинной мозг.

Ключевые слова: спинной мозг крысы, эмбриогенез, микроглиоциты, зона входа заднего корешка, дорсальный канатик, белок Iba-1, периферин, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S047514502204005X**ВВЕДЕНИЕ**

Нервная система позвоночных состоит из двух частей – центральной нервной системы, и периферической, к которой наряду с многочисленными нервными ганглиями, относятся нервные проводники, поддерживающие связь центрального отдела с различными периферическими структурами. В раннем эмбриональном периоде отсутствует связь между развивающимися элементами ЦНС и ПНС. Их клетки (как нейрональные, так и глиальные) имеют различное происхождение и отделены друг от друга сложной системой барьеров, в составе которых присутствуют базальные мембраны и глиоциты (Verkhatsky, Butt, 2013; Suter, Jaworski, 2019; Kameneva, Adameyko, 2019). Установление межнейронных связей между двумя частями нервной системы во время эмбрионального развития является важным этапом формирования функциональных соматосенсорных и двигательных цепей. Во взрослом организме связь между спинным мозгом (СМ) и периферической нервной системой осуществляют афферентные (сенсорные) и эфферентные (двигательные) нервные волокна, проходящие через специализированные переходные зоны спинного мозга, где происходит

контакт между клетками центральной и периферической нервной системы, которые обозначают как зона входа заднего корешка и зона выхода двигательного нерва. На ранних сроках эмбриогенеза первичные афференты чувствительных нейронов спинномозгового ганглия направляются к своим целевым нейронам спинного и головного мозга, достигая переходной зоны между ЦНС и ПНС, избирательно проницаемой для аксонов в строго определенной области – зоне входа заднего корешка. Механизмы, которые регулируют и облегчают миграцию предшественников глиальных клеток и рост аксонов в направлении переходной зоны, обеспечивают проникновение афферентов в спинной мозг и их ориентацию, не вполне понятны. К настоящему времени показано участие нейральных клеток-предшественников, клеток радиальной глии и астроцитов, клеток пограничной “шапочки” (boundary cap cells) и предшественников шванновских клеток в обеспечении формирования связей между ПНС и ЦНС (Suter, Jaworski, 2019; Rigby et al., 2020). Роль эмбриональных микроглиоцитов, как первых глиальных клеток эмбрионального спинного мозга, в этом процессе не изучалась. Учитывая то, что при

формировании ЦНС микроглиоциты выполняют такие важные функции, как обеспечение трофической поддержки нейробластов, регуляция синаптогенеза и синаптическое ремоделирование, реорганизация нейронных сетей (Schafer et al., 2012, 2013; Tong, Vidyadaran, 2016) изучение их роли в становлении сенсорной системы и формировании связей между чувствительными нейронами спинномозгового ганглия и нейронами спинного мозга является высоко актуальным.

Цель настоящего исследования состояла в изучении изменений популяции микроглиальных клеток зоны входа заднего корешка и дорсального канатика спинного мозга крысы в период формирования связей между центральной и периферической нервной системой в эмбриогенезе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на эмбрионах крыс Вистар 11–20 сут развития (E11–E20) ($n = 40$) и новорожденных крысах (P1) ($n = 4$). Все манипуляции с животными осуществлялись с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.) и в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”. У эмбрионов крыс и новорожденных животных выделяли фрагменты шейного отдела спинного мозга на уровне 3–5 сегмента. Материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида в течение 24 ч (Korzhevskii et al., 2015), обезвоживали в спиртах, заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм. Для идентификации клеток микроглии использовали поликлональные козы антитела к кальций-связывающему белку Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) (разведение 1 : 500, AbCam, Великобритания). Применение антител к Iba-1 позволяет выявлять микроглиоциты и другие фагоцитирующие клетки ЦНС в период пренатального и постнатального развития (Rigato et al., 2011; Ueno et al., 2013; Streit et al., 2014; Marsters et al., 2020; Kolos, Korzhevskii, 2021). Перед проведением иммуногистохимической реакции проводили тепловое демаскирование антигена в течение 25 мин (99.5°C, в пароварке) в предварительно разогретом до 60°C демаскирующем растворе. В качестве вторичных антител применяли реагенты из набора Anti-Goat HRP-DAB Cell & Tissue Staining Kit (кат. № S008, R&D Systems, США). Продукт иммуногистохимической реакции выявляли с применением 3,3'-диаминобензидина (DAB+, K3468, Agilent, США). Часть препаратов окрашивали толуидиновым синим по Нисслию.

С целью идентификации области входа афферентов заднего корешка и динамики развития дорсального канатика применяли антитела к пе-

риферину — белку промежуточных филаментов, экспрессируемому главным образом в нейронах периферической нервной системы (в частности, в чувствительных нейронах спинномозгового ганглия). В ходе исследования использовали поликлональные кроличьи антитела к периферину (AB1530, Merck Millipore, США). В качестве вторичных реагентов применяли набор Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (SPD-015, Spring Bioscience, США). Продукт иммуногистохимической реакции выявляли с применением 3,3'-диаминобензидина (DAB+, K3468, Agilent, США).

Полученные препараты анализировали с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Германия), микрофотографии получали с применением камеры ICC50 (Leica, Германия). Обработку изображений производили с использованием программного обеспечения LAS EZ (Leica, Германия).

Для флуоресцентной микроскопии в качестве вторичного реагента для выявления периферин-содержащих волокон применяли антитела, конъюгированные с тетраметилродаминизотиоцианатом (TRITC) (Agilent, США). Полученные препараты исследовали с применением флуоресцентного микроскопа Leica DM 2500 (Leica, Германия), фотосъемку выполняли с помощью фотокамеры Leica DFC 420 (Leica, Германия).

При проведении количественной оценки изменений популяции микроглиоцитов в зоне входа заднего корешка и формирующегося дорсального канатика СМ производили подсчет общего числа Iba-1-содержащих клеток в исследуемой области. При подсчете учитывали иммунопозитивные клетки, содержащие ядро в плоскости среза. Иммунопозитивные отростки и фрагменты клеток, не содержащие ядро, не учитывались при количественном анализе. Измеряли площадь исследуемой зоны на разных сроках эмбрионального развития. Поскольку в период эмбриогенеза площадь этой области значительно возрастает, для оценки динамики изменения популяции микроглиоцитов был выбран метод оценки числа клеток на единицу площади изучаемой области спинного мозга эмбрионов и новорожденных крыс (0.01 мм²), то есть плотность клеток.

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

Для оценки специфичности иммуногистохимических реакций на периферин и Iba-1 были

проведены отрицательный и положительный контроли. При постановке отрицательного контроля была исключена инкубация с первичными антителами, на срезы СМ эмбрионов крыс наносили разбавитель для антител (S0809) (Dako, Дания). Для проведения положительного контроля были использованы архивные срезы спинного мозга взрослых животных, фиксированные и обработанные таким же образом, как и исследуемый эмбриональный материал.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При постановке отрицательного контроля для иммуногистохимической реакции на Iba-1 и периферин на срезах эмбрионального СМ не обнаружено иммунопозитивных клеток и других структур. При проведении иммуногистохимического выявления периферина в СМ взрослых животных избирательно окрашиваются отростки чувствительных нейронов в составе дорсального корешка спинного мозга, зоны входа заднего корешка, а также волокна, образующие тонкий и клиновидный пучки спинного мозга, что позволяет четко определить зону сенсорных афферентов в дорсальной части спинного мозга взрослых животных. Также в области дорсальных рогов спинного мозга идентифицируются тонкие иммунопозитивные отростки, проникающие в серое вещество. На рис. 1 приведена схема поперечного среза СМ взрослой крысы с указанием изучаемых в настоящем исследовании зон.

В ходе настоящего исследования при гистологическом анализе формирующегося спинного мозга крысы на разных этапах эмбриогенеза отмечено несколько зон концентрации Iba-1-иммунопозитивных клеток. В данной работе основное внимание уделено дорсальной части формирующегося СМ, в частности зоне входа заднего корешка и формирующегося дорсального канатика спинного мозга.

В первые сутки после замыкания нервной трубки (E11) Iba-1-иммунопозитивные (Iba1+) клетки отсутствуют в области эмбрионального СМ. На следующие сутки развития (E12) в дорсальной части формирующегося СМ выявляются единичные иммунопозитивные клетки округлой формы, некоторые из них обладают толстым коротким отростком.

На E13 в периферической области слоя нейроэпителия формирующегося спинного мозга идентифицируется тонкий слой округлых дифференцирующихся нейробластов. Периферин-содержащие отростки чувствительных нейронов на данном сроке развития не проникают в формирующийся СМ, зона входа заднего корешка не определяется. В этот срок в области алярных пластинок СМ присутствуют единичные иммунопо-

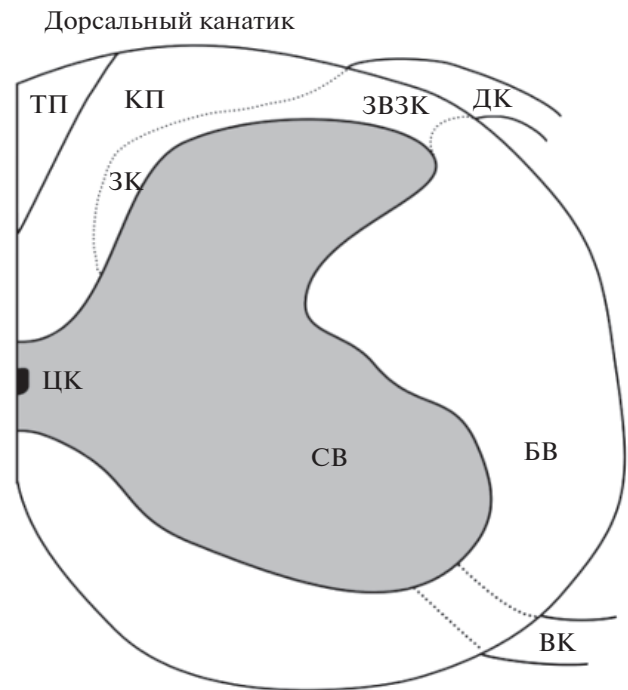


Рис. 1. Схема поперечного среза шейного отдела спинного мозга взрослой крысы. ЦК — центральный канал, СВ — серое вещество спинного мозга, БВ — белое вещество спинного мозга, ДК — дорсальный корешок спинного мозга, ВК — вентральный корешок спинного мозга, ТП — тонкий пучок, КП — клиновидный пучок, ЗВЗК — зона входа заднего корешка, ЗК — зона коллатералей первичных афферентов чувствительных нейронов. Модифицировано с (Altman, Bayer, 2001).

зитивные клетки, преимущественно амебоидного вида.

Начиная с 14-х сут развития, в СМ эмбрионов крыс выделяются три концентрических слоя: эпендимный, мантийный и маргинальный. На данном сроке развития в спинном мозге формируется зона входа заднего корешка. При проведении иммуногистохимической реакции на периферин отростки чувствительных нейронов, формирующие задний корешок, проявляют иммунореактивность. В дорсолатеральной части эмбрионального СМ идентифицируется большое количество поперечносрезанных иммунопозитивных первичных афферентов молодых нейронов СМГ, формирующих овальную структуру — зону бифуркации заднего корешка (овальный пучок Гиса). В этой области аксоны чувствительных нейронов, достигшие спинного мозга Т-образно разделяются на восходящую и нисходящую ветвь, простирающиеся по нескольким сегментам вдоль маргинального слоя. В этот срок Iba1+ клетки спинного мозга образуют небольшие скопления (2–3 клетки) в области овального пучка Гиса, преимущественно в медиальной ее части, на границе с формирую-

щимся серым веществом. Иммунопозитивные клетки этой зоны немногочисленны и имеют неправильную форму с одним, реже двумя толстыми короткими отростками.

На следующие сутки развития (E15) зона бифуркации заднего корешка расширяется дорсомедиально и четко идентифицируется на препаратах при иммуногистохимической окраске на периферин. Эта зона представлена поперечносрезанными периферин-содержащими чувствительными волокнами (рис. 2а, 2в). Начиная с 15 сут эмбрионального развития, число Iba1+ клеток в области входа заднего корешка возрастает и они начинают распределяться по всей зоне бифуркации. Клетки обладают неправильной формой, имеют один или два коротких толстых отростка (рис. 2б, 2г).

На E16 зона бифуркации заднего корешка продолжает увеличиваться в размерах, расширяется медиально, достигая потолочной пластинки. С применением антител к периферину отмечено, что начиная с 16 сут эмбрионального развития первые тонкие периферин-содержащие коллатерали восходящих и нисходящих волокон чувствительных нейронов начинают проникать внутрь формирующегося серого вещества развивающегося спинного мозга в области, прилежащей к зоне бифуркации (рис. 2д). В зоне бифуркации заднего корешка нами отмечено присутствие большого количества Iba-иммунопозитивных клеток округлой или неправильной формы с короткими толстыми отростками (рис. 2е).

Через сутки (E17) зона бифуркации продолжает расширяться, а количество коллатералей чувствительных аксонов, проникающих в серое вещество, увеличивается. В дорсомедиальной области дорсального белого вещества начинает формироваться зона коллатерализации сенсорных афферентов. В этот срок Iba-1-иммунопозитивные клетки данной области имеют неправильную форму с одним, реже двумя толстыми короткими отростками.

На более поздних сроках эмбриогенеза (E18–20) в дорсальной части формирующегося СМ отчетливо выявляется зона бифуркации заднего корешка, образованная периферин-содержащими первичными афферентами чувствительных нейронов. Медиально по отношению к зоне бифуркации располагается зона периферин-иммунопозитивных чувствительных коллатералей и зона афферентов, в дальнейшем формирующая тонкий пучок дорсального канатика спинного мозга (рис. 3в). Iba-1-содержащие клетки на данном этапе развития идентифицируются как в латеральной зоне

формирующегося белого вещества (зона бифуркации) (рис. 3б, 3г), так и в медиальной области (зона коллатералей и формирующихся клиновидного и тонкого пучка) (рис. 3а, 3г). Микроглиоциты этой зоны имеют неправильную или веретеновидную форму, часто ориентированы вдоль волокон формирующегося белого вещества и имеют один или два тонких разветвленных отростка.

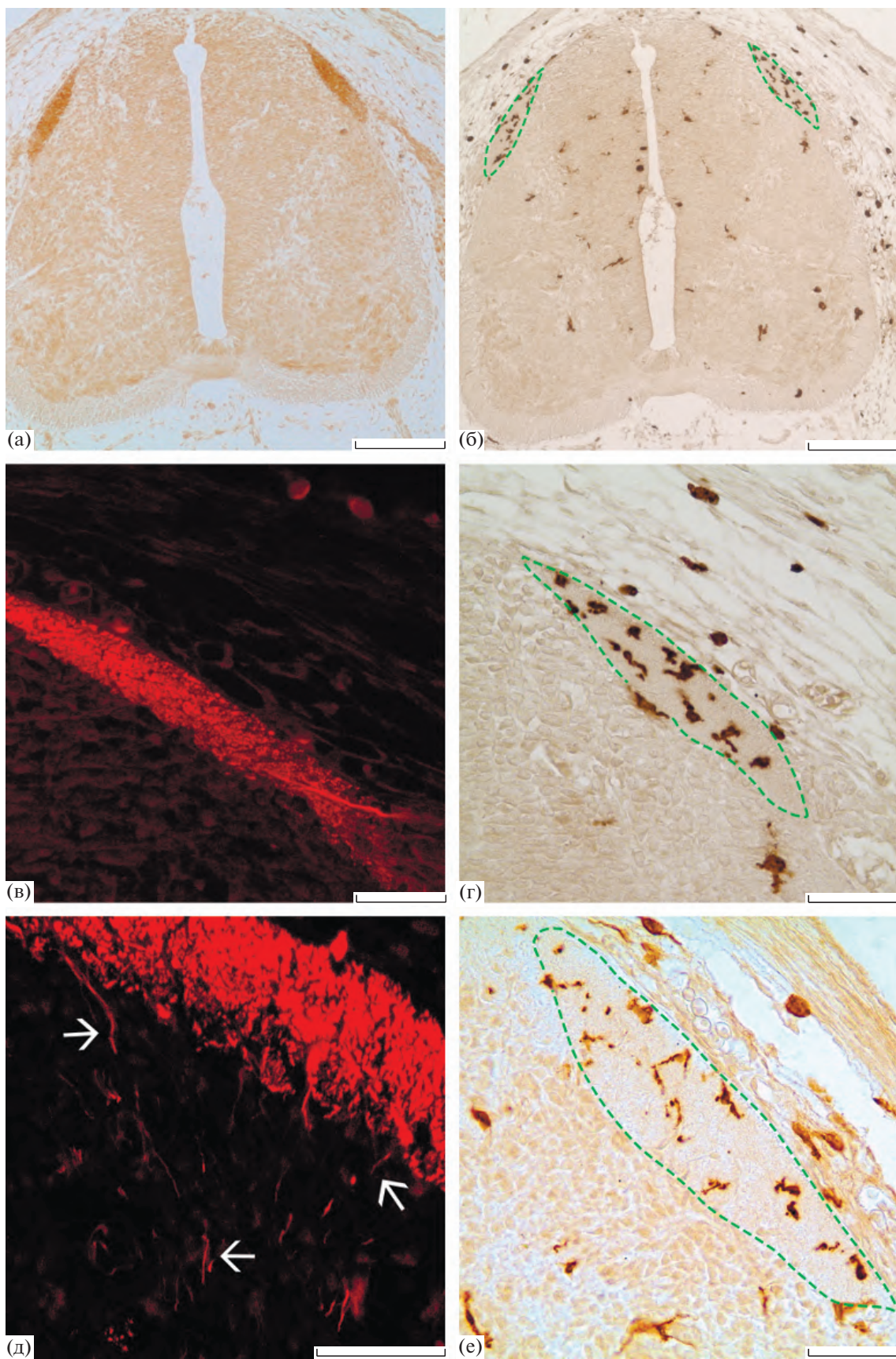
К моменту рождения дорсальное белое вещество спинного мозга крыс приобретает конфигурацию, характерную для взрослых животных. Формируется дорсальная продольная борозда, тонкий и клиновидный пучки (рис. 4а). В первые сутки после рождения многочисленные Iba-1-иммунопозитивные клетки идентифицируются как в зоне входа заднего корешка, так и в дорсальном канатике спинного мозга (рис. 4б). Также в дорсальном белом веществе присутствуют многочисленные иммунопозитивные отростки клеток, тела которых не попали в плоскость среза. Отмечено, что клетки обладают разветвленной структурой, однако имеют признаки реактивной микроглии. Присутствуют гипертрофированные и кустистые микроглиоциты с большим количеством толстых коротких отростков. Микроглиоциты дорсального канатика и зоны коллатералей преимущественно овальной и веретеновидной формы ориентированы вдоль волокон белого вещества (рис. 4в).

Количественный анализ распределения микроглиоцитов показал значительное увеличение плотности популяции клеток в формирующемся дорсальном канатике СМ крыс на E15. Установлено, что наибольшее изменение количества клеток наблюдается в ранний период эмбриогенеза — между E14 и E15. В течении суток с момента входа первых микроглиоцитов в овальный пучок Гиса (E14) плотность распределения клеток микроглии увеличивается почти в два раза ($p < 0.05$) (рис. 5). На более поздних сроках эмбрионального развития плотность популяции микроглиоцитов в формирующемся дорсальном белом веществе СМ снижается и к моменту рождения уменьшается более чем в 4 раза в сравнении с E15 ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное в настоящей работе исследование клеток микроглии в эмбриональном спинном мозге крысы показало, что они распределяются неоднородно. Было определено несколько зон концентрации микроглиоцитов. На ранних сроках пренатального развития клетки микроглии пре-

Рис. 2. Периферин-иммунопозитивные структуры и микроглиоциты в спинном мозге крыс на 15 (а, б, в, г) и 16 (д, е) сутки эмбрионального развития. На рисунке выделена зона бифуркации заднего корешка формирующегося спинного мозга; стрелки — периферин-иммунопозитивные коллатерали первичных афферентов чувствительных нейронов. Иммуногистохимические реакции на периферин (а) и белок Iba-1 (б, г, е), иммунофлуоресцентная реакция на периферин (TRITC — красное окрашивание) (в, д). Масштаб: (а, б) 200 мкм, (в, г, д, е) 50 мкм.



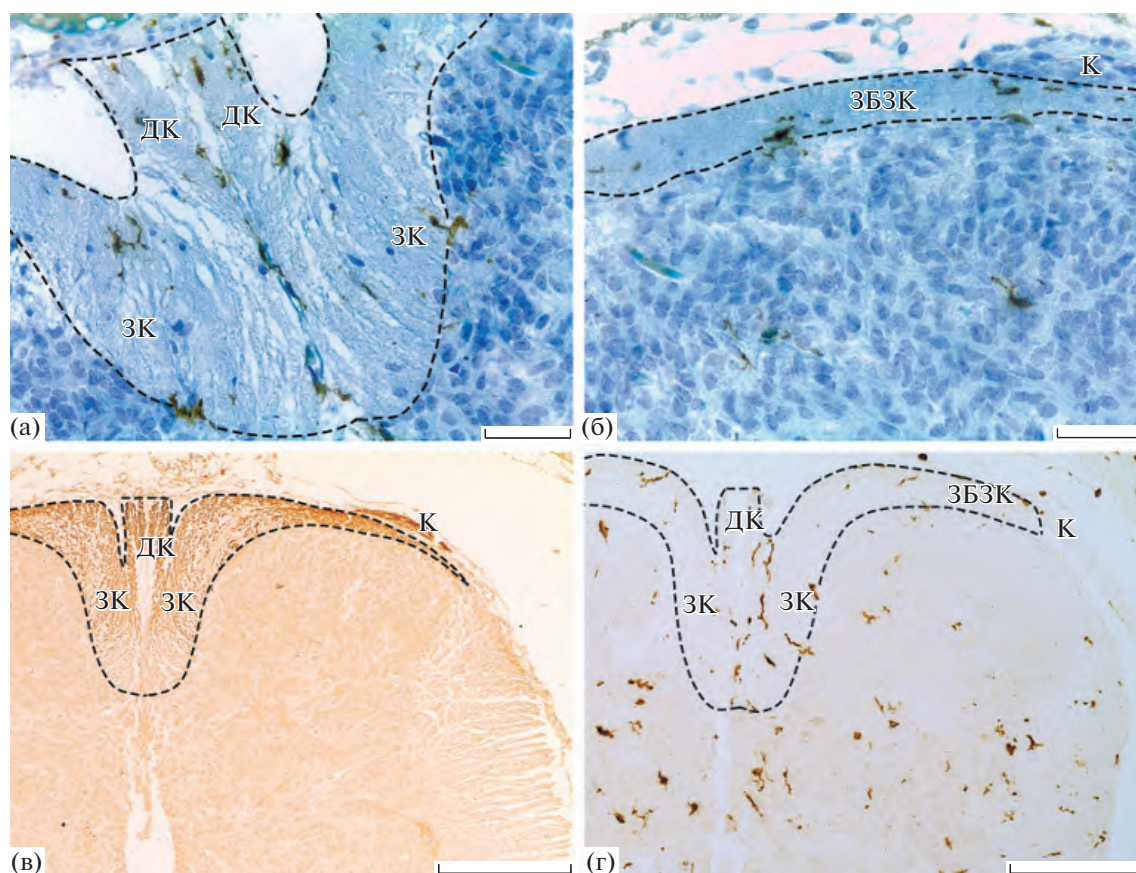


Рис. 3. Микроглиоциты в спинном мозге крыс на 18 (а, б) и 19 (г) сутки эмбрионального развития, а также периферин-иммунопозитивные отростки чувствительных нейронов, формирующие дорсальный канатик спинного мозга эмбриона крысы 19-х сут развития (в). К — дорсальный корешок спинного мозга; ЗБЗК — зона бифуркации заднего корешка; ЗК — зона коллатералей; ДК — формирующийся дорсальный канатик спинного мозга. Иммуногистохимические реакции на белок Iba-1 (а, б, г), докраска толуидиновым синим (а, б). Иммуногистохимические реакции на периферин (в). Масштаб: (а, б) 50 мкм; (в, г) 200 мкм.

имущественно концентрируются в области развивающихся мотонейронов, как было отмечено в нашей предыдущей работе (Kolos, Korzhevskii, 2021), и в области формирующегося белого вещества дорсальной части спинного мозга, чему и посвящено настоящее исследование.

Выявленное в настоящем исследовании увеличение плотности популяции клеток микроглии в дорсолатеральной области развивающегося спинного мозга было отмечено ранее в спинном мозге эмбрионов цыпленка и мыши (Caldero et al., 2009; Rigato et al., 2011). Вопрос о причинах концентрации микроглиоцитов в этой области дискуссионен. Ригато с соавт. (Rigato et al., 2011) связывают этот факт с фагоцитарной активностью микроглии. Авторы предполагают, что появление групп Iba-1+ клеток в зоне бифуркации заднего корешка может происходить в связи с устранением микроглиоцитами проекций чувствительных нейронов, подвергшихся программируемой клеточной гибели (ПКГ). Однако более позднее исследование демонстрирует, что лишь небольшая

часть микроглиоцитов, локализованных в зоне бифуркации заднего корешка имеет фагоцитарный фенотип (Angelim et al., 2018).

Мы предполагаем, что скопление микроглии в области зоны входа заднего корешка может быть связано с проникновением в развивающийся спинной мозг аксонов чувствительных нейронов в процессе установления связей между ЦНС и ПНС. В настоящем исследовании с применением антител к периферину было установлено, что на 13 сут эмбрионального развития первичные афференты СМГ крыс достигают формирующегося спинного мозга, а на E14 прорастают в маргинальный слой. Однако отростки сенсорных нейронов не проникают в формирующееся серое вещество, а остаются в маргинальном слое в течение нескольких дней (период ожидания), образуя зачаток дорсального канатика спинного мозга. В период ожидания рост аксонов остается ограниченным овальным пучком Гиса, и большая часть сенсорных афферентов делится на каудальную и ростральную ветви (Chédotal, 2019). Нами показано,

что первые периферин-иммунопозитивные коллатерали проникают в серое вещество СМ лишь на E16. Таким образом, установлено, что период ожидания у крыс составляет двое суток. Предполагается, что в этот период функционируют репеллентные молекулы (например, нетрин-1, Slit-белки, семафорин 3А (Sema3A)) синтезируемые клетками-предшественниками в алярной и базальной пластинках СМ (Masuda et al., 2009; Chédotal, 2019).

Выявленное в настоящем исследовании значительное увеличение плотности популяции микроглиоцитов в области бифуркации заднего корешка на 15 сут развития, то есть до проникновения коллатералей в мантийный слой, может свидетельствовать об участии микроглии в процессе разветвления афферентов и в поддержании периода ожидания. В пользу этого заключения говорят некоторые функциональные особенности микроглиоцитов, описанные в разных работах. Во-первых, микроглия способна экспрессировать молекулы отталкивания, такие как Slit-белки, нетрин-1, RGMa (Wehrle et al., 2005; Hata et al., 2006), которые играют важную роль в регулировке направления растущих аксонов. Во-вторых, эмбриональная микроглия способна отсекают растущие аксоны и их коллатерали и участвовать в определении направления роста аксонов (Lim, Ruthazer, 2021; Fujita, Yamashita, 2021). В-третьих, она может обеспечивать поддержку растущих аксонов путем синтеза трофических и ростовых факторов (например, инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1), фактора роста нервов (NGF), нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), нейротрофина-3 (NT-3), фактора роста фибробластов (FGF)) (Kitayama et al., 2011; Ueno et al., 2013; Reemst et al., 2016; Fujita, Yamashita, 2021).

При исследовании популяции микроглиальных клеток спинного мозга крысы на более поздних сроках эмбриогенеза было отмечено изменение ее морфологических особенностей. Установлено, что после 18-х сут эмбрионального развития многие микроглиоциты, связанные с чувствительными афферентами формирующегося дорсального канатика, приобретают форму отличную от микроглии, расположенной в сером веществе. Iba-1-иммунопозитивные клетки выстраиваются вдоль аксонов сенсорных нейронов, начиная с 18-х суток развития, и сохраняют такое расположение до раннего постнатального периода. Первые микроглиоциты, обладающие признаками рамифицированных клеток идентифицированы нами в формирующемся белом веществе дорсальных рогов СМ крыс также на 18-е сут пренатального развития. По мере формирования дорсального канатика такие клетки, вероятно, переходят от подвижного состояния в стационарное, необходимое для осуществления постоянного контроля окружающей среды. Учитывая, что дорсальный канатик СМ

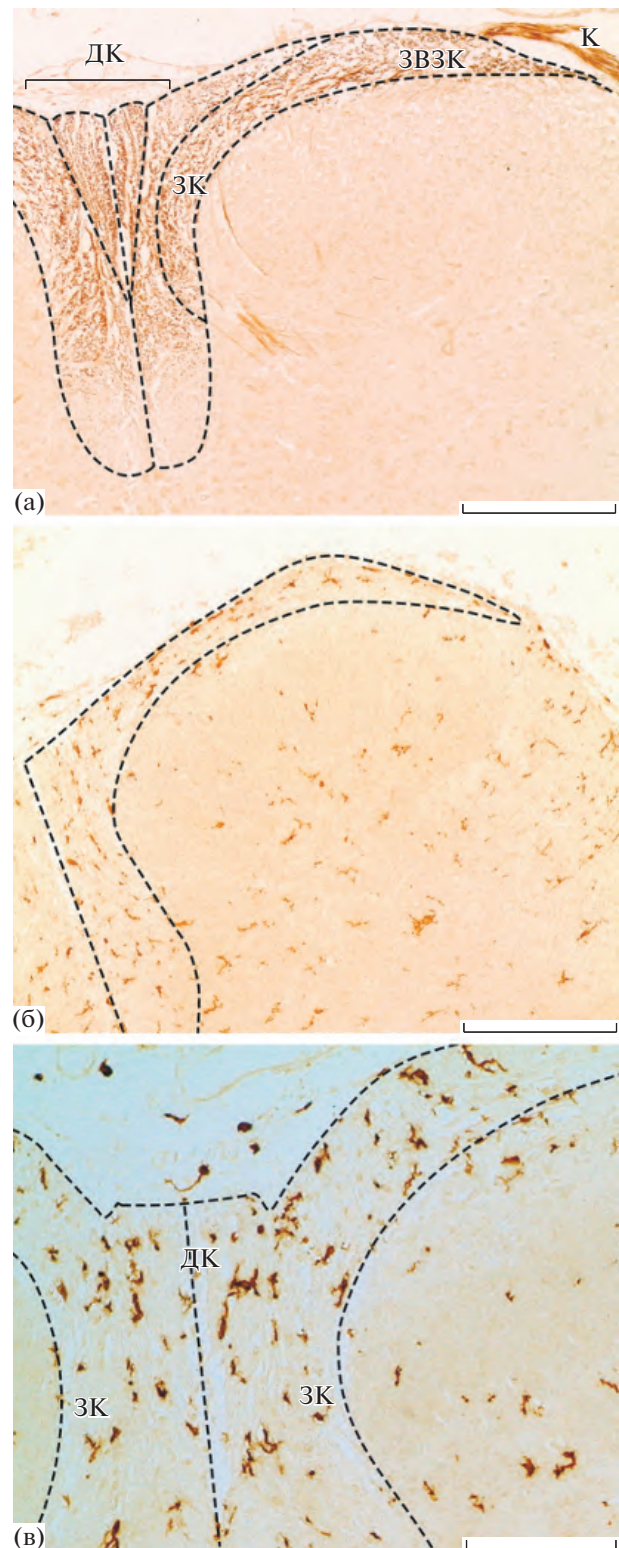


Рис. 4. Периферин-иммунопозитивные структуры (а) и микроглиоциты (б, в) в спинном мозге новорожденных крыс. К — дорсальный корешок спинного мозга; 3В3К — зона входа заднего корешка; 3К — зона коллатералей; ДК — дорсальный канатик спинного мозга, образованный тонким и клиновидным пучком. Иммуногистохимические реакции на периферин (а) и белок Iba-1 (б, в). Масштаб: (а, б) 200 мкм, (в) 50 мкм.

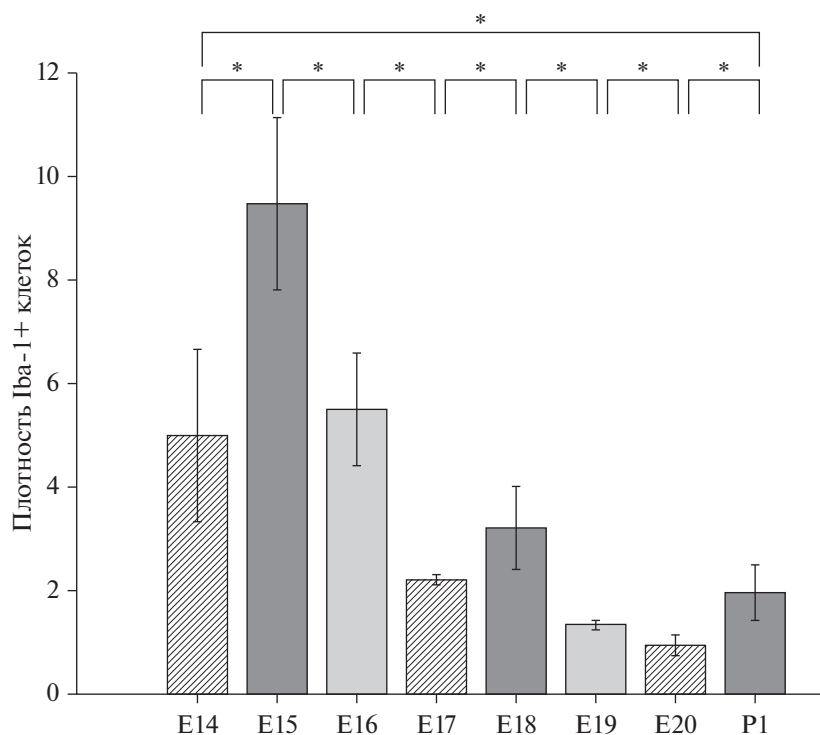


Рис. 5. Динамика изменения плотности распределения Iba1-иммунопозитивных клеток в формирующейся зоне входа заднего корешка и дорсальном канатике спинного мозга крыс на разных сроках развития (клеток/ед. площади). * — $p < 0.05$.

(клиновидный и тонкий пучки) образованы главным образом восходящими толстыми миелинизированными волокнами сенсорных нейронов СМГ, можно предположить, что скопление микроглии в этой области СМ на поздних сроках эмбриогенеза (E18–P1) связано с ее участием в процессах миелинизации. Хьюз и Аппел (Hughes, Appel, 2020) на эмбрионах рыб *Danio rerio* показали, что микроглиоциты могут фагоцитировать миелиновые оболочки, оставляя нетронутыми тела олигодендроцитов и, удаляя избыток миелина, предотвращают эктопическую миелинизацию тел клеток. Возможность протекания подобных процессов в эмбриональном периоде у млекопитающих не изучалась. Однако рост числа реактивных микроглиоцитов в области трактов толстых миелинизированных волокон спинного мозга после рождения, отмеченный в настоящем исследовании, может косвенно свидетельствовать об участии микроглии в реорганизации миелиновых оболочек.

Еще одна возможная роль клеток микроглии исследуемой области в формирующемся спинном мозге связана с участием в поддержании барьеров ЦНС. Известно, что во взрослом организме глияльные клетки (астроциты спинного мозга и шванновские клетки нерва) образуют плотный барьер на границе раздела ЦНС и ПНС. На определенных этапах эмбрионального развития переходные зоны избирательно проницаемы для клеток и

аксонов (Suter, Jaworski, 2019). Считается, что способствуя входу афферентов в СМ, клетки пограничной шапочки разрушают базальную мембрану презумптивной пограничной глияльной мембраны и предотвращают преждевременное вторжение астроцитов в зону входа заднего корешка (Carlstedt et al., 2004). Очевидно, что в исследуемом нами раннем пренатальном периоде (до формирования полноценного глияльного барьера) дорсальная переходная зона является уязвимой частью ЦНС. По-видимому, эмбриональные микроглиальные клетки принимают участие в контроле данной зоны и обеспечивают защиту ЦНС в случае аксонального транспорта различных нежелательных веществ и проникающих в организм инфекционных агентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты вносят существенные дополнения в имеющиеся представления о морфофункциональных особенностях микроглиоцитов эмбрионального спинного мозга. В работе описаны морфологические особенности микроглиоцитов зоны входа заднего корешка и области дорсального канатика спинного мозга крысы в период с 14 сут пренатального развития до рождения. Показано, что на ранних сроках эмбриогенеза клетки микроглии имеют вид округлых амебоид-

ных клеток. В последующие сроки они претерпевают изменения. Первые микроглиоциты, обладающие морфологическими признаками рамифицированной микроглии идентифицируются в исследуемой области на 18 сут пренатального развития.

Проведенное в настоящей работе исследование зоны входа заднего корешка и области дорсального канатика спинного мозга крысы на ранних этапах эмбриогенеза с применением иммуногистохимического выявления периферина показало, что при формировании связей между спинным мозгом и ПНС сенсорные афференты остаются в маргинальном слое в течение двух суток (E14–E16, период ожидания) и лишь затем проникают в формирующееся серое вещество. Изучение распределения микроглиоцитов в области формирующегося белого вещества дорсальной части спинного мозга крысы в эти сроки показало, что с момента выявления первых микроглиоцитов в зоне входа заднего корешка, плотность их распределения в исследуемой области достоверно возрастает почти в два раза к 15 сут пренатального развития. Полученные данные могут свидетельствовать в пользу гипотезы об участии микроглии во временном блокировании врастания отростков нейронов спинномозгового ганглия в спинной мозг.

На основании полученных данных можно предположить, что в период формирования связей между СМ и спинномозговым ганглием, микроглия оказывает как отталкивающее влияние на сенсорные аксоны в период ожидания, так и нейропротекторное воздействие на афференты и чувствительные нейроны в более позднем периоде эмбрионального развития. Дальнейшие углубленные исследования в этом направлении могут прояснить вопрос о роли эмбриональных микроглиоцитов в развитии периферической нервной системы и становлении связей между ЦНС и ПНС.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Altman J., Bayer S.A.* An overview of spinal cord organization, 1st edn. N.Y.: Oxford University Press, 2001. 542 p.
- Angelim M., Maia L., Mouffle C. et al.* Embryonic macrophages and microglia ablation alter the development of dorsal root ganglion sensory neurons in mouse embryo // *Glia*. 2018. V. 66. P. 2470–2486. <https://doi.org/10.1002/glia.23499>
- Caldero J., Brunet N., Ciutat D. et al.* Development of microglia in the chick embryo spinal cord: implications in the regulation of motoneuronal survival and death // *J. Neurosci. Res.* 2009. V. 87. P. 2447–2466. <https://doi.org/10.1002/jnr.22084>
- Carlstedt T., Cullheim S., Risling M.* Spinal cord in relation to the peripheral nervous system // In: *The Human Nervous System*, 2nd edition / Eds. Paxinos G., Mai J.K. London: Elsevier Academic Press, 2004. P. 250–263.
- Chedotal A.* Roles of axon guidance molecules in neuronal wiring in the developing spinal cord // *Nat. Rev. Neurosci.* 2019. V. 20. № 7. P. 380–396. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0168-7>
- Fujita Y., Yamashita T.* Mechanisms and significance of microglia–axon interactions in physiological and pathological conditions // *Cell. Mol. Life Sci.* 2021. V. 78. P. 3907–3919. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03758-1>
- Hata K., Fujitani M., Yasuda Y. et al.* RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury // *J. Cell Biol.* 2006. V. 173. № 1. P. 47–58. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508143>
- Hughes A.N., Appel B.* Microglia phagocytose myelin sheaths to modify developmental myelination // *Nat. Neurosci.* 2020. V. 23. P. 1055–1066. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0654-2>
- Kameneva P., Adameyko I.* Recent advances in our understanding of central and peripheral nervous system progenitors // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2019. V. 61. P. 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.07.003>
- Kitayama M., Ueno M., Itakura T., Yamashita T.* Activated microglia inhibit axonal growth through RGMa // *PLoS One*. 2011. V. 6. P. e25234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025234>
- Kolos E.A., Korzhevskii D.E.* Changes in the microglial population during spinal cord formation indicate an involvement of microglia in the regulation of neurogenesis and synaptogenesis // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2021. V. 52. № 3. P. 176–186. <https://doi.org/10.1134/s1062360421030048>

- Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde // *Eur. J. Histochem.* 2015. V. 59. № 3. P. 233–237.
<https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2530>
- Lim T.K., Ruthazer E.S. Microglial trophocytosis and the complement system regulate axonal pruning *in vivo* // *Elife.* 2021. V. 10. P. e62167.
<https://doi.org/10.7554/eLife.62167>
- Masuda T., Yaginuma H., Sakuma C., Ono K. Netrin-1 signaling for sensory axons: involvement in sensory axonal development and regeneration // *Cell Adh. Migr.* 2009. V. 3. P. 171–173.
<https://doi.org/10.4161/cam.3.2.7837>
- Marsters C.M., Nesan D., Far R. *et al.* Embryonic microglia influence developing hypothalamic glial populations // *J. Neuroinflamm.* 2020. V. 17. № 1. P. 146.
<https://doi.org/10.1186/s12974-020-01811-7>
- Reemst K., Noctor S.C., Lucassen P.J., Hol E.M. The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development // *Front. Hum. Neurosci.* 2016. V. 10. P. 566.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566>
- Rigato C., Buckinx R., Le-Corronc H. *et al.* Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks // *Glia.* 2011. V. 59. № 4. P. 675–695.
<https://doi.org/10.1002/glia.21140>
- Rigby M.J., Gomez T.M., Puglielli L. Glial cell-axonal growth cone interactions in neurodevelopment and regeneration // *Front. Neurosci.* 2020. V. 14. P. 203.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00203>
- Schafer D.P., Lehrman E.K., Kautzman A.G. *et al.* Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner // *Neuron.* 2012. V. 74. № 4. P. 691–705.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Schafer D.P., Lehrman E.K., Stevens B. The “quad-partite” synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS // *Glia.* 2013. V. 61. № 1. P. 24–36.
<https://doi.org/10.1002/glia.22389>
- Streit W.J., Xue Q.S., Tischer J., Bechmann I. Microglial pathology // *Acta Neuropathol. Commun.* 2014. V. 26. № 2. P. 142.
<https://doi.org/10.1186/s40478-014-0142-6>
- Suter T.A.C.S., Jaworski A. Cell migration and axon guidance at the border between central and peripheral nervous system // *Science.* 2019. V. 365. № 6456. P. e8231.
<https://doi.org/10.1126/science.aaw8231>
- Tong C.K., Vidyadaran S. Role of microglia in embryonic neurogenesis // *Exp. Biol. Med.* 2016. V. 241. № 15. P. 1669–1675.
<https://doi.org/10.1177/1535370216664430>
- Ueno M., Fujita Y., Tanaka T. *et al.* Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development // *Nat. Neurosci.* 2013. V. 16. № 5. P. 543–551.
<https://doi.org/10.1038/nn.3358>
- Verkhratsky A., Butt A.M. Glial physiology and pathophysiology. Oxford: Wiley-Blackwell-John Wiley & Sons, 2013. 527 p.
- Wehrle R., Camand E., Chedotal A. *et al.* Expression of netrin-1, slit-1 and slit-3 but not of slit-2 after cerebellar and spinal cord lesions // *Eur. J. Neurosci.* 2005. V. 22. P. 2134–2144.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04419.x>

Connection between the Central and Peripheral Nervous System. The Role of Microglia

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

¹*Institute of Experimental Medicine, ul. Acad. Pavlova 12, St. Petersburg, 197367 Russia*

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

In the present study, we studied the localization and distribution of microgliaocytes in the embryonic rat spinal cord (SC) during the establishment of connections between the central and peripheral nervous systems, during the formation of the sensory pathways of the spinal cord. Using anti-Iba-1 antibodies to identify microglial cells and anti-peripherin antibodies to detect primary afferents of neurons of the dorsal root ganglion (DRG), it was shown that in the dorsal root entry zone the microglial cell density nearly doubled in the period from E14 to E15. It was shown that during this period rat sensory afferents do not yet penetrate into the developing gray matter of the SC, but remain within the marginal layer up to 16 days of development (waiting period). At the later stages of prenatal development, the density of microglial cells in the studied area of the SC gradually decreases. By the time of birth, the density of microglial cells decreases by 4 times compared with the 15th day of embryogenesis. Our data support the hypothesis of the participation of microglia in the temporary blocking of the DRG neurons processes ingrowth into the spinal cord.

Keywords: rat spinal cord, embryogenesis, microglia, dorsal root entry zone, dorsal funiculus, Iba-1, peripherin, immunohistochemistry

АРЧИЛ КАРПЕЗОВИЧ ДОНДУА (1929–2021)

© 2022 г. Р. П. Костюченко^а, *, Е. Р. Гагинская^а, Д. Ю. Власов^а, В. И. Ефремов^а

^аСанкт-Петербургский государственный университет,
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: r.kostyuchenko@spbu.ru

Поступила в редакцию 02.02.2022 г.

После доработки 20.02.2022 г.

Принята к публикации 23.02.2022 г.

Профессор СПбГУ Арчил Карпезович Дондуа (1929–2021) известен своими пионерскими работами в области биологии развития аннелид и позвоночных, кинетики клеточных популяций в онтогенезе, сравнительно-эмбриологических аспектов эволюции животных. Профессор А.К. Дондуа создал и возглавил научную школу, уделял особое внимание фундаментальным проблемам биологии развития и поддерживая современные тенденции науки. Профессор Дондуа создал новые курсы в Санкт-Петербургском государственном университете и написал монографии и учебники в области биологии развития, эволюционной биологии и истории науки. Он также был президентом Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей, занимался популяризацией науки, поддерживал молодых талантливых ученых и участвовал в воссоздании медали Александра Ковалевского.

Ключевые слова: история науки, сравнительная эмбриология, биология развития, пролиферация клеток, дифференциация клеток, зародышевые листки, Нох гены, медаль А.О. Ковалевского

DOI: 10.31857/S0475145022040061

4 ноября 2021 г. ушел из жизни Арчил Карпезович Дондуа — доктор биологических наук, Заслуженный работник высшей школы РФ, почетный профессор СПбГУ, выдающийся ученый и общественный деятель. Много лет А.К. Дондуа занимал руководящие посты — от заведующего лабораторией до заведующего кафедрой и директора института. Известность Арчилу Карпезовичу принесли исследования кинетики клеточных популяций в онтогенезе, работы в области биологии развития аннелид, сравнительно-эмбриологических аспектов эволюции животных, его общественная деятельность на посту Президента Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей (СПБОЕ).

Арчил Карпезович Дондуа (рис. 1) родился 6 января 1929 г. в Ленинграде. Родители его — Анастасия Николаевна (девичья фамилия Петровых) и Карпез Дариспанович Дондуа, профессор и заведующий кафедрой кавказской филологии Санкт-Петербургского (бывшего Ленинградского) государственного университета. Арчил Карпезович и жил всегда вблизи университета — на Среднем проспекте Васильевского Острова. Он с радостью вспоминал свои детские довоенные годы, и с глубокой горечью блокаду Ленинграда, первые месяцы которой семья оставалась в городе. По возвращении из эвакуации, уже в первый послевоенный год А.К. Дондуа поступил на биолого-

почвенный факультет Ленинградского государственного университета. Сначала он выбрал кафедру зоологии беспозвоночных. Арчил Карпезович всегда вспоминал с особой теплотой свой первый год в Университете: ощущение общения “на равных” с выдающимся зоологом и великолепным педагогом, членом-корреспондентом АН СССР Валентином Александровичем Догелем; Большой практик по зоологии беспозвоночных; опыт первой самостоятельной научной, хотя и реферативной, работы под руководством замечательного педагога и крупного ученого Юрия Ивановича Полянского (член-корреспондент АН СССР (РАН) с 1979 г.). Но уже со второго курса начал специализироваться на кафедре эмбриологии, которой в то время руководил выдающийся эмбриолог, член-корреспондент АМН СССР Павел Григорьевич Светлов. Большое влияние на формирование научных интересов Арчила Карпезовича оказал профессор Лев Николаевич Жинкин. Под его руководством А.К. Дондуа выполнил первую исследовательскую работу, посвященную эмбриональному развитию одного из видов гидроидных медуз (*Rathkea octopunctata*). Дипломной работой, защищенной в 1951 г., стало описание эмбриогенеза перепончатокрылого насекомого *Scolia quadripunctata*. В аспирантуре кафедры эмбриологии ЛГУ, куда Арчил Карпезович поступил в том же 1951 г., научные интересы су-



Рис. 1. Арчил Карпезович Дондуа, автограф.

щественно изменились. Кандидатской диссертацией, тему которой предложил руководитель, профессор Борис Петрович Токин, и которую А.К. Дондуа защитил в срок, стало экспериментальное исследование, посвященное механизмам защитной воспалительной реакции в развитии птиц. Проблемой иммунитета у зародышей Арчил Карпезович предполагал заниматься и дальше, работая уже над докторской диссертацией, но пути молодого кандидата наук и его руководителя вскоре разошлись.

Арчил Карпезович переключается на изучение клеточной репродукции и дифференцировки в эмбриогенезе животных. В это время, в 60-е годы XX столетия, в сотрудничестве с Л.Н. Жинкиным и А.А. Заварзиным (Алексеем Алексеевичем-младшим) он начинает активно использовать метод автордиографии, позволяющий выявлять локализацию и интенсивность синтеза макромолекул с помощью радиоактивных предшественников. Работы этого периода позволили ему расширить аналитические возможности автордиографии применительно к динамическим эмбриональным системам (Dondua et al., 1966). В ходе сравнительно-эмбриологических исследований Арчил Карпезович показал реорганизацию клеточных циклов в онтогенезе ряда объектов и сформулировал некоторые общие положения о корреляции между временем этой реорганизации и началом морфогенетической функции ядра, существованием глубоких внутренних связей между клеточным размножением и дифференциацией. Чтобы вы-

явить эти предполагаемые связи, им (совместно с братом, Георгием Дондуа, талантливым математиком) была разработана модель кинетики клеточных популяций, учитывающая особенности циклов и кинетики на ранних этапах развития. Разработка темы клеточной репродукции в эмбриогенезе животных увенчалась докторской диссертацией А.К. Дондуа (1980) и коллективной монографией “Клеточное размножение и процессы дифференциации” (1983, в соавторстве с сотрудниками возглавляемой им лаборатории экспериментальной цитологии Биологического института ЛГУ — Л.Ф. Андреевой, А.Г. Десницким, Н.А. Лукиной).

Арчил Карпезович проявлял большой интерес к фундаментальным проблемам биологии развития в свете анализа сравнительно-эмбриологических и молекулярно-биологических данных. Так, рассматривая вопрос об эволюции механизмов морфогенеза, он приходит к заключению, что у предков современных губок и эуметазоа изначально возникли универсальные базовые механизмы морфогенеза, которые послужили основой диверсификации индивидуального развития в линии Parazoa и Eumetazoa. Если у первых морфогенез на ранних этапах эмбриогенеза приводил к формированию водоносной системы, то у вторых — к гаструляции, в ходе которой формировались зародышевые листки. Таким образом, морфогенетические движения клеток у Metazoa первичны сравнительно со становлением широкого спектра клеточной дифференциации, и именно сходство механизмов морфогенеза, а не наличие зародышевых листков, лежит в основе единства всех Metazoa (Ereskovsky, Dondua, 2006; Дондуа, Костюченко, 2013).

А.К. Дондуа был, без сомнения, талантливым организатором. С 1965 по 1971 гг. он возглавлял Биологический научно-исследовательский институт ЛГУ. Именно в это время зарождается идея создать учебную и научно-экспериментальную базу университета на Белом море. Вместе со своим коллегой и другом, заведующим кафедрой цитологии и гистологии А.А. Заварзиным, Арчил Карпезович в 70-х гг. принял самое активное участие в организации Морской биологической станции на Белом море — от разработки идеи и выбора локаций, до работы с различными административными структурами местного и федерального значения. На этой станции А.К. Дондуа провел многие свои исследования на аннелидах (Дондуа, 1975; Dondua et al., 1997; Костюченко, Дондуа, 2000, 2006).

Став в 1987 г. заведующим кафедрой эмбриологии биолого-почвенного факультета (руководил кафедрой до конца 1999 г.), Арчил Карпезович инициировал работы, посвященные анализу генетических механизмов эмбрионального развития и организовал сотрудничество с известными

зарубежными лабораториями (под руководством профессоров Майкла Эйкема (Университет Кембриджа, Великобритания), Альбрехта Фишера (Университет им. Гутенберга в Майнце, Германия), Йо ван ден Бигеллара (Университет Утрехта, Нидерланды), доктора Детлева Арендта (Европейская лаборатория молекулярной биологии в Гейдельберге, EMBL, Германия)). Одним из предметов исследования были выбраны Нох-гены. К тому времени было показано, что Нох-гены определяют судьбы участков развивающегося тела насекомых и млекопитающих, однако роль этих генов в развитии других животных была не изучена. Именно благодаря теоретическим обоснованиям, инициативам и организаторскому таланту Арчила Карпезовича сотрудники кафедры стали активно работать в области молекулярной биологии развития и публиковаться в ведущих международных журналах (в т.ч. и в *Nature*) (De Rosa et al., 1999; Kulakova et al., 2002, 2007).

Арчил Карпезович вел активную экспертную и редакторскую деятельность, в том числе связанную с журналом “Онтогенез”/“*Russian Journal of Developmental Biology*”, членом редакционной коллегии которого он был многие годы.

В 1991 г. А.К. Дондуа был избран президентом Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей — одного из старейших научных сообществ России, — которое он возглавлял многие годы. Во многом благодаря его творческому подходу и активной жизненной позиции СПбОЕ, несмотря на тяжелейшие девяностые годы прошлого века, активизировало свою деятельность. Особой заботой Арчила Карпезовича были талантливые ученые, как начинающие, так и уже состоявшиеся. Под его руководством СПбОЕ увеличило программы поддержки, проводя конкурсы научных работ членов Общества, конкурсы магистерских диссертаций и конкурсы на именные стипендии для студентов естественнонаучных факультетов, издавало “Труды СПбОЕ”. Вне всякого сомнения, талант организатора помог Арчилу Карпезовичу расширить международные связи Общества, в частности, по линии созданного Балтийского фонда природы. Особо хочется подчеркнуть роль Арчила Карпезовича в возрождении Международной премии-медали А.О. Ковалевского, которая стала одной из самых престижных наград для ученых в области эволюционной биологии развития. Медаль в память о выдающемся русском естествоиспытателе А.О. Ковалевском, которую предполагалось вручать исследователям за выдающийся вклад в развитие сравнительной анатомии и эмбриологии, была учреждена Обществом еще в 1910 г. Несмотря на то, что медаль была изготовлена в дореволюционное время, она никому не была присуждена из-за Первой мировой войны, революционных потрясений и Гражданской войны и, в конце концов, была забыта. Обнару-

жение в 2000 г. самой медали в нумизматической коллекции Эрмитажа и ее матрицы в музее Монетного двора, где она была изготовлена, подтолкнуло Арчила Карпезовича к активной переписке со многими мировыми лидерами в области эмбриологии и биологии развития. Именно благодаря энергичным усилиям со стороны Арчила Карпезовича, был организован международный комитет по награждению премией-медалью А.О. Ковалевского. С 2001 г. эта медаль ежегодно присуждается ученым разных стран мира за достижения в области сравнительной зоологии и эмбриологии, за разработку новых подходов к исследованию эволюции животных и за выявление филогенетических связей между различными группами животных (Mikhailov, Gilbert, 2002). Даже уйдя с поста президента СПбОЕ, Арчил Карпезович продолжал вносить новые идеи и предложения, оставаясь членом Ученого Совета, душой и сердцем Общества. В 2019 г. Арчилу Карпезовичу за выдающиеся научные достижения и огромную организаторскую работу было присвоено звание “Почетный член СПбОЕ”.

Арчил Карпезович вел активную педагогическую работу, читая общие курсы “Биология индивидуального развития”, “Сравнительная эмбриология” и курсы специализации “Детерминация пола”, “История эмбриологических концепций”, “Модели морфогенеза” на протяжении целого ряда лет. В 1994 г. он стал лауреатом Университетской премии за высокое педагогическое мастерство. Публикация в 2005 г. многолетнего труда А.К. Дондуа, учебника “Биология развития”, стала знаменательным событием в жизни высшей школы нашей страны. Этот труд, удостоенный в 2009 г. премии Санкт-Петербургского университета, является первой попыткой представить в отечественной учебной литературе развитие как интегральный процесс, объединяющий события всех уровней биологической организации. На основе анализа уже устоявшихся и самых современных данных и гипотез об эволюции молекулярных систем управления индивидуальным развитием А.К. Дондуа делает вывод о креативной роли онтогенеза в филогении животных, убедительно показывая, что эволюция животных является не столько следствием приспособления к условиям среды, сколько способом освоения этой среды. Второе, исправленное и дополненное издание этого учебника вышло в свет в конце 2018 г. (Дондуа, 2018).

В сентябре 2021 г. Арчил Карпезович начал 75-учебный год в Санкт-Петербургском государственном университете и до последних дней своей жизни оставался в строю. Он ушел полным планов, имея целый портфель начатых и близких к завершению рукописей, готовым отдавать свои знания и делиться своим опытом с молодым поколением. Именно таким, деятельным даже в от-

дыхе, щедрым на идеи, готовым оказать поддержку в трудную минуту, и очень обаятельным человеком запоем мы Арчила Карпезовича Дондуа.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева Л.Ф., Десницкий А.Г., Дондуа А.К., Лукина Н.А. Клеточное размножение и процессы дифференциации. Л.: Наука, 1983. 248 с.
- Дондуа А.К. Влияние актиномицина Д и сибиромидина на эмбриональное и личиночное развитие *Nereis virens* (Sars.) // Онтогенез. 1975. Т. 6. № 5. С. 475–484.
- Дондуа А.К. Биология развития. 2-е изд., испр. и доп. СПб.: Издательство СПбГУ, 2018. 812 с. ISBN: 978-5-288-05827-1.
- Дондуа А.К., Костюченко Р.П. Об одной устаревшей традиции: существует ли гастрюляция у губок? // Онтогенез. 2013. Т. 44. № 5. С. 357–363.
- Костюченко Р.П., Дондуа А.К. Ооплазматическая сегрегация и формирование морфологических осей зародыша полихеты *Nereis virens* // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 2. С. 120–131.
- Костюченко Р.П., Дондуа А.К. Закономерности формирования прототроха в эмбриональном развитии полихеты *Nereis virens* // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 2. С. 91–99.
- De Rosa R., Grenier J.K., Andreeva T., Cook C.E., Adoutte A., Akam M., Carroll S.B., Balavoine G. Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution // Nature. 1999. V. 399. P. 772–774.
- Dondua A.K., Efremov V.I., Krichinskaya E.B., Nikolaeva I.P. Mitotic index, duration of mitosis and proliferation activity in the early phases of the development of the chick embryo // Acta Biol. Acad. Scie. Hung. 1966. V. 17. P. 127–143.
- Dondua A.K., Kostyuchenko R.P., Fedorova Zh.E. Effects of some cytoskeleton inhibitors on ooplasmic segregation in the *Nereis virens* egg // Int. J. Dev. Biol. 1997. V. 41. P. 853–858.
- Ereskovsky A.V., Dondua A.K. The problem of germ layers in sponges (Porifera) and some issues concerning early metazoan evolution // Zool. Anz. 2006. V. 245. P. 65–76.
- Kulakova M.A., Kostyuchenko R.P., Andreeva T.F., Dondua A.K. The Abdominal-B-like gene expression during larval development of *Nereis virens* (Polychaeta) // Mech. Dev. 2002. V. 115. P. 177–179.
- Kulakova M., Bakalenko N., Novikova E., Cook C.E., Eliseva E., Steinmetz P.R.H., Kostyuchenko R.P., Dondua A., Arendt D., Akam M., Andreeva T. Hox gene expression in larval development of the polychaetes *Nereis virens* and *Platynereis dumerilii* (Annelida, Lophotrochozoa) // Dev. Genes Evol. 2007. V. 217. № 1. P. 39–54.
- Mikhailov A.T., Gilbert S.F. From development to evolution: the re-establishment of the “Alexander Kowalevsky Medal” // Int. J. Dev. Biol. 2002. V. 46. P. 693–698.

Archil K. Dondua (1929–2021)

R. P. Kostyuchenko^{1,*}, E. R. Gaginskaya¹, D. Y. Vlasov¹, and V. I. Efremov¹

¹St. Petersburg State University, St. Petersburg, 190034 Russia

*e-mail: r.kostyuchenko@spbu.ru

Professor of St. Petersburg State University Archil K. Dondua (1929–2021) is known for his pioneering work in the developmental biology of annelids and vertebrates, the kinetics of cell populations in ontogenesis, and comparative embryological aspects of animal evolution. Prof. Dondua created and led an academic school and paid a special attention to the fundamental problems of developmental biology and embraced modern scientific trends. Prof. Dondua established new courses at St. Petersburg State University and wrote monographs and textbooks in the field of developmental biology, evolutionary biology and the history of science. He also served as the President of the St. Petersburg Society of Naturalists, and was engaged in science popularization, supported young talented scientists and participated in re-establishment of the Alexander Kowalevsky Medal.

Keywords: history of science, comparative embryology, developmental biology, cell proliferation, cell differentiation, germ layers, Hox genes, Kowalevsky Medal