

УДК 619:636.2:636.5:636.4:612

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *in situ* В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ

© 2024 М. В. Бытов¹, В. Д. Зубарева¹, С. В. Вольская¹, С. Л. Хацко^{1, 2},
И. А. Шкуратова¹, О. В. Соколова^{1, *}

¹Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук,
Екатеринбург, 620142 Россия

²Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, 620026 Россия

*e-mail: nauka_sokolova@mail.ru

Поступила в редакцию 17.05.2023 г.

После доработки 12.07.2023 г.

Принята к публикации 08.08.2023 г.

Морфологические исследования сельскохозяйственных животных чаще всего проводятся с использованием простейших методик приготовления и окраски препаратов. Изучение процессов эмбриогенеза, постэмбриональных особенностей развития органов и тканей, эффекта влияния различных веществ с использованием гистохимических и иммуногистохимических методов окраски, а также с помощью гибридизации РНК *in situ* и секвенированием транскриптома *in situ* еще предстоит. Особенности протекания многих клеточных и тканевых процессов у крупного рогатого скота, свиней и кур в разрезе сравнительной физиологии еще не изучены. Высокая продуктивность сельскохозяйственных животных ассоциирована с интенсивным функционированием всех органов и систем организма. Влияние промышленного содержания сельскохозяйственных животных и его последствия на развитие организма в онтогенезе заслуживают отдельного направления исследований с точки зрения экспрессии генов *in situ*. Несмотря на стремительное развитие технологий секвенирования транскриптома, в результате использования которых открываются новые гены-кандидаты какого-либо процесса, гибридизация РНК *in situ* остается “золотым” стандартом для их валидации. В настоящем обзоре кратко представлены современные методики и их модификации для изучения экспрессии генов *in situ*. Методики изучения транскриптома, которые реализованы на крупном рогатом скоте, свиньях и курах в качестве модельных организмов, включают: гибридизацию РНК *in situ* с использованием ZZ-зондов, тирамид-сигнальную амплификацию, цепную реакцию гибридизации, диоксигенин-меченные зонды, ОТ-ПЦР, секвенирование транскриптома единичных клеток, секвенирование РНК *in situ*. В настоящем обзоре рассмотрены результаты исследований на крупном рогатом скоте, свиньях и курах. Результаты исследований в данной области представляются актуальными для понимания особенностей механизмов адаптации на транскриптомном уровне у высокопродуктивных животных в условиях промышленного содержания для поиска новых маркеров ценных сельскохозяйственных признаков. Стоит отметить, что в современной отечественной и зарубежной литературе крайне мало исследований с помощью гибридизации РНК *in situ*, несмотря на доступность и простоту метода.

Ключевые слова: гибридизация *in situ*, крупный рогатый скот, куры, свиньи, экспрессия генов, гистология, морфология, физиология.

DOI: 10.31857/S0016675824010011

Молекулярно-генетические методы исследований, в том числе такие как транскриптомные, нашли широкое применение не только в медицине, но и в ветеринарии, где полученные результаты послужили основой для понимания клеточных процессов у сельскохозяйственных животных [1–3]. Существует широкий спектр методов с разной степенью сложности выполнения, с разной производительностью и стоимостью анализа. В настоящее время RNA-seq обладает достаточной разрешающей способностью, благодаря которой можно исследовать транскриптомные различия и изменения на

уровне популяций клеток. Однако RNA-seq не позволяет изучить изменения транскриптома единичных клеток. Для данных целей используется группа методов под общим названием scRNA-seq (single-cell RNA sequencing) [4–8]. Эти методы являются дорогостоящими, требуют высокой квалификации сотрудников лабораторий в области молекулярных технологий и биоинформатики. Более того, они не позволяют изучить популяции клеток и единичные клетки в пространстве по отношению друг к другу, что ведет к потере морфологического контекста клеточного транскриптома [9].

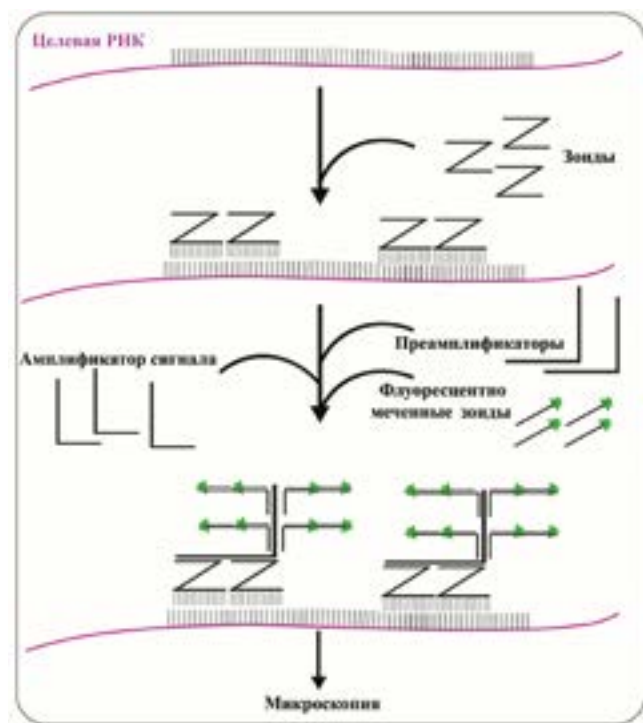


Рис. 1. Принцип работы технологии RNAScope, использующей ZZ-зонды.

Гибридизация *in situ* (ISH) — это группа близких по технологии методов для детекции и визуализации специфичных последовательностей нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) в срезах тканей, цитологических препаратах и целых организмах [10, 11]. Использование гибридизации *in situ* ДНК- и РНК-зондов с дальнейшей флуоресцентной микроскопией остается одним из наиболее востребованных и дешевых методов не только в рутинной клинической диагностике [12–15], но и в научных исследованиях [15, 16].

Изначально метод гибридизации РНК *in situ* (здесь и далее подразумевается изучение транскриптов *in situ*, а не использование конкретного типа зондов) проводился с использованием радиоактивно меченных зондов [17], однако в настоящее время для визуализации гибридизации чаще применяются флуоресцентно меченные зонды [10]. Доступны коммерческие наборы для FISH (fluorescent *in situ* hybridization) анализа РНК, разрабатываемые Advanced Cell Technology, Inc (США) по технологии RNAScope, и на сегодняшний день их используют в большинстве работ [18]. Среди лидеров по коммерческим наборам также можно выделить ViewRNA от Thermo Fisher Scientific (США) [19] и HuhuFISH от PixelBiotech (Германия) [20].

В основе разработанной в 2012 г. технологии RNAScope [18] лежат двойные Z-зонды, часть которых предназначена для гибридизации с РНК-мишенью, другая часть — для усиления сигнала, вызывая каскадную реакцию и сводя к минимуму нецелевые сигналы, что приводит к высокоспецифичному окрашиванию (Рис. 1). Стоит отметить, что сама структура ZZ-зондов и последовательности олигонуклеотидов, предоставляемых в наборе, остаются коммерческой тайной. Визуализация окрашивания проводится с помощью флуоресцентного микроскопа или лазерного конфокального микроскопа. В 2019 году максимальное количество одновременно обнаруживаемых РНК-мишеней было увеличено до 12 [21].

Существуют технологии амплификации сигнала с “открытым” принципом работы. Так, используются тирамид-сигнальная амплификация (Рис. 2, а) [22, 23], цепная реакция гибридизации *in situ* (Рис. 2, б) (hybridization chain reaction) [24], диоксигенин-меченные зонды [25, 26] с последующей визуализацией флуоресцентно меченных антител к диоксигенину (также и к другим гаптенам типа биотина) (Рис. 2, в) [27, 28]. Для каждого из этих методов проводятся постоянное усовершенствование и разработка новых протоколов, в том числе и мультиплексирования [29, 30]. Разработаны рекомендации по хранению биоматериала, подлежащего гибридизации РНК *in situ*, для получения достоверных результатов в ретроспективных исследованиях [31]. Несмотря на то что методы обладают отдельными модификациями, принцип работы — гибридизация нуклеиновых кислот — остается единым [11].

Стоит отметить, что несмотря на общий принцип связывания с таргетными последовательностями способов визуализации результатов гибридизации *in situ* большое множество. Так, если рассматривать технологии амплификации сигнала с “открытым” принципом работы, то тирамид-сигнальная амплификация требует использования модифицированных зондов, а также антител, связанных с компонентами протекания реакции. В большинстве случаев данная технология позволяет детектировать только один таргет за один анализ, а набор реагентов для протекания тирамидной реакции (без специфичного зонда) может быть использован в разных анализах. В свою очередь, цепная реакция гибридизации не требует никаких вспомогательных компонентов, кроме олигонуклеотидов: один из них таргет-специфичный с “хвостом”, а другие два мечены флюорофорами и амплифи-

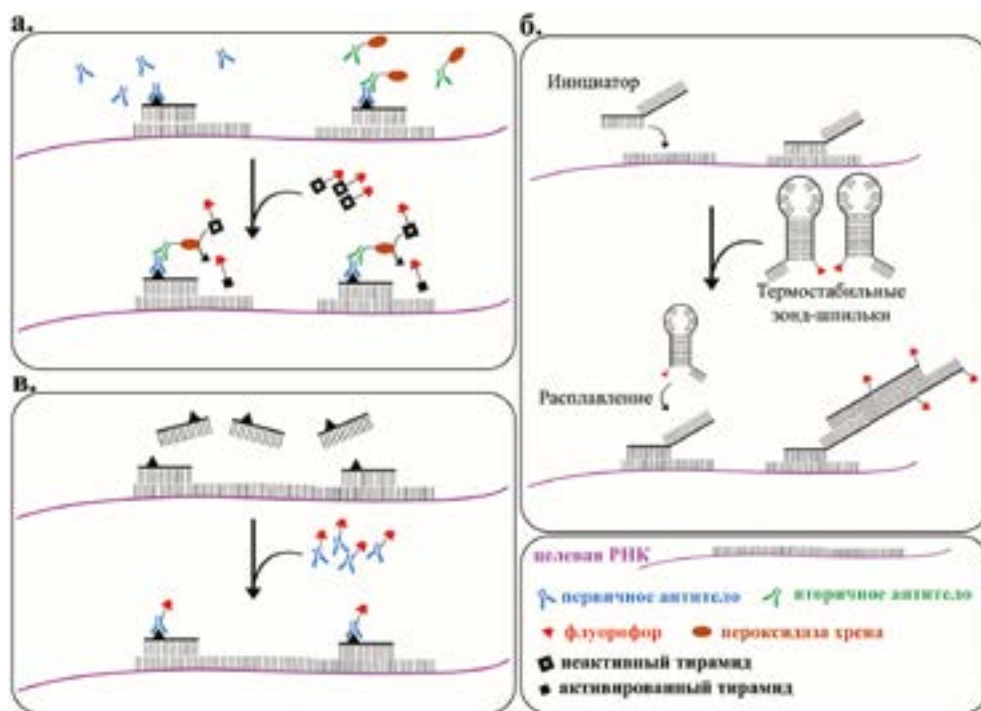


Рис. 2. Технологии с “открытым” принципом работы: *а* — тирамид-сигнальная амплификация; *б* — цепная реакция гибридизации *in situ*; *в* — диоксигенин-меченные зонды и флуоресцентно меченные антитела.

цируют сигнал. Это делает анализ более дешевым, позволяет его мультиплексировать, но при этом требует дизайна сложных олигонуклеотидов. Оценка транскриптов *in situ* при помощи зондов с диоксигенином и другими гаптенами схожа по использованию антител для визуализации (возможно применение как флуоресцентной визуализации, так и с помощью пероксидазы хрена). Данные методы позволяют проводить как качественную, так и количественную оценку транскриптов *in situ*, однако количественная оценка требует модификаций изначальных методов исследования [24, 32].

Стоит отметить метод секвенирования, который позволяет извлечь максимальное количество информации о транскриптоме образца без потери морфологического контекста ткани — секвенирование транскриптома *in situ* [33–35]. Несмотря на то, что технология является передовой, для нее существует ряд значительных ограничений. Поле зрения, т.е. общий размер ткани, которую можно проанализировать в одном эксперименте, в значительной степени определяет масштаб исследования. Это может стать “бутылочным горлышком”, если необходимо профилировать крупные срезы. В то время как существуют коммерчески разрабатываемые ПО, учеными предпринимаются усилия по созданию

унифицированных вычислительных open-source программ, однако лаборатория, использующая секвенирование *in situ*, скорее всего столкнется с необходимостью создания собственного программного обеспечения для выполнения своих задач [36, 37]. Тип фиксации ткани для исследования также требует особого внимания: в большинстве случаев для секвенирования *in situ* подходят только свежемороженые ткани [21, 38].

Сопоставление результатов иммуногистохимических (ИГХ) исследований и гибридизации РНК *in situ* интуитивно, и уже были проведены исследования по сравнению чувствительности и точности этих методик. На клеточных культурах макрофагов из облученных радиацией мышц свиней изучена эффективность связывания антител с CD208 для проведения ИГХ. Исследователями показано, что использование разных антител против одного и того же антигена может привести к невоспроизводимым результатам. Напротив, изучение экспрессии генов с помощью DIG-зондов или цепной реакции гибридизации позволяет получить точные и воспроизводимые результаты [39]. Однако ИГХ и гибридизация РНК *in situ* не являются взаимозаменяемыми [40], поскольку в анализах используются разные молекулярные мишени. РНК FISH пока не может считаться “золотым стандартом”

в гистологических исследованиях ввиду малого количества научно-исследовательских работ с ее использованием [41].

Таким образом, существует разнообразие методов исследований РНК *in situ*: начиная от простой гибридизации на срезе и заканчивая секвенированием транскрипта *in situ*. Однако в настоящее время не все из них реализованы в исследованиях сельскохозяйственных животных, особенно это касается передовых технологий оценки транскрипта.

В настоящей работе представлен обзор научных исследований в области транскриптомики *in situ* у крупного рогатого скота, свиней и кур. Цель данного обзора – показать современное состояние исследований фундаментальных механизмов клеточной регуляции физиологических и патологических процессов у сельскохозяйственных животных. На сегодняшний день существует всего несколько научных направлений в области биологии сельскохозяйственных животных, в рамках которых используется гибридизация РНК *in situ*. Условно их можно разделить на работы по изучению физиологических процессов и исследования особенностей протекания патологического процесса.

Одно из несвязанных с инфекционным процессом направлений, в котором работает ряд коллективов ученых разных стран, применяя гибридизацию РНК *in situ*, состоит в изучении кишечника кур во время онтогенеза. В 2020 г. исследовано влияние отсроченного первого кормления (*delayed access to feed*, DAF) цыплят после вылупления. DAF влияет на массу тела и морфологию кишечника с более выраженным эффектом по мере увеличения его продолжительности. На молекулярном и морфологическом уровнях у цыплят из группы DAF наблюдалось подавление экспрессии мРНК *Muc2* и снижение количества бокаловидных клеток в верхней части ворсинок кишечника, в то время как экспрессия мРНК *PepT1* повышалась (*PepT1* – также известный как *SLC15A1* – кодирует белок, ответственный за всасывание ди- и трипептидов). Авторы делают предположение о том, что всасывание кишечником питательных веществ имеет приоритет над защитой организма во время DAF, что может сделать цыпленка более восприимчивым к патогенам в ранний период после вылупления [42]. Другим коллективом авторов были также изучены особенности экспрессии *Muc2*, но уже в контексте возрастных

изменений разных участков тонкого кишечника [43, 44]. Результаты их исследований дают основание предполагать, что при вылуплении цыплят двенадцатиперстная кишка уже обладает устойчивой популяцией бокаловидных клеток, тогда как популяции этих клеток в тощей и подвздошной кишках еще претерпевают изменения в период раннего онтогенеза. Авторы объясняют это тем, что двенадцатиперстная кишка является первым участком кишечника, который сталкивается с патогенами; таким образом, наличие хорошо развитой слизистой является необходимым условием для реализации барьерной функции кишечника цыплят. В 2021 г. было впервые проведено исследование эффекта жирных кислот на иммунные аспекты кишечника с помощью технологий RNAscope и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), что позволило детально изучить вопросы, касающиеся роли кислот в иммунной модуляции на тканевом и клеточном уровнях. Проведенное исследование на основе морфологических и транскриптомных результатов позволяет аргументировать подбор оптимальных кормовых добавок для здорового развития бройлеров [45].

Израильскими учеными проведена серия работ [46–48] по изучению влияния разных режимов кормления и составов рационов на развитие тонкого кишечника цыплят. В работах были использованы наборы RNAscope для флуоресцентной гибридизации РНК *in situ* *Lgr5* (как маркер стволовых клеток) и *PepT1* (как маркер энтероцитов, способных к абсорбции). В ИГХ исследованиях использованы следующие мишени: *Sox9* – как маркер прогениторных клеток; PCNA – как маркер пролиферирующих клеток. Был доказан положительный эффект кормления сразу после вылупления цыплят на созревание эпителиальных клеток [46]. Этой же группой ученых исследован пролиферативный эффект инъекций *in-ovo* растворами аминокислот на клетки тонкого кишечника. Несмотря на то что положительный эффект нивелировался после вылупления цыплят, как утверждают авторы, данное исследование является информативным для понимания влияния разных аминокислот на дифференциацию и пролиферацию прогениторных клеток кишечника [47]. На основании этих данных учеными были проведены дальнейшие исследования влияний *in ovo* инъекций растворов L-глутамин на развитие тонкого кишечника эмбрионов кур [48], в том числе и на экспрессию гена *LGR5* (маркера стволовых клеток кишечника), для которого детекция с помощью

RNAscope ранее была продемонстрирована [49]. Стимуляция L-глутамином повышала экспрессию мРНК переносчиков питательных веществ *PerT-1* и *SGLT-1* и белков плотных контактов *TJP-1* и *TJP-2* до и после вылупления цыплят. Поскольку сигналинг глюкагоноподобного белка-2 от кишечных эндокринных L-клеток связан с развитием и функционированием энтероцитов, был исследован эффект стимуляции глутамина на экспрессию мРНК ключевых гормонов и рецепторов в рамках этого энтероэндокринного пути и было обнаружено значительное увеличение экспрессии *GLP-2R* (кодирует рецептор глюкагоноподобного белка-2), *IGF-1* и *IGF-1R* (кодируют инсулиноподобный фактор роста-1 и его рецептор соответственно) до и после вылупления цыплят [49].

Работ по другим направлениям исследований, несвязанных с инфекционным процессом и объединенных одной темой, крайне мало. В 2020 г. китайскими учеными проведено секвенирование РНК единичных клеток (scRNA-seq) с целью обнаружить новые гены-маркеры внутримышечных адипоцитов. Кластеризация единичных клеток по транскриптомам показала наличие обособленного кластера с высоким уровнем экспрессии гена *ADIPOQ*, на основании чего был сделан вывод о том, что это кластер *ADIPOQ*⁺-адипоцитов. В результате анализа исследователями обнаружены два новых гена-кандидата внутримышечных жировых клеток: *APOA1* и *COL1A1*. Для валидации маркеров использовали RNAscope, и таким образом была доказана специфичность двух новых биомаркеров для дальнейших исследований гетерогенной структуры мышц кур [50].

Методы гибридизации РНК *in situ* позволяют не только определять специфичный для конкретных популяций клеток профиль экспрессируемых генов, но и изучать сложные транскриптомные взаимодействия. Так, в 2019 г. китайскими исследователями доказано, что обнаруженная ими ранее *lncRNA* (длинная некодирующая РНК) *IMFNCR* является “губкой” для miR-128-3p и miR-27b-3p (miR — микроРНК), которые, в свою очередь, являются ингибиторами экспрессии *PPARG* (*PPARG* — гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, ключевой фактор транскрипции для регуляции липидного обмена и дифференциации преадипоцитов). Таким образом, с помощью набора детекции РНК *in situ* RiboBio (Guangzhou RiboBio Co., Китай) сделан вывод о том, что уровень экспрессии

lncRNA IMFNCR это маркер дифференциации преадипоцитов во внутримышечной жировой ткани [51], количество которой является показателем качества куриного мяса [52].

В производстве куриного мяса качество получаемой продукции является определяющий фактор эффективности производства. Например, существует такая проблема как синдром “деревянной грудки” — дефект качества мяса, наносящий экономический ущерб птицеводству [53, 54]. В 2019 г. была исследована взаимосвязь между изменениями в метаболизме липидов, появлением медленных изоформ миофибрилл в мышцах *Pectoralis major* у коммерческих цыплят-бройлеров с развитием “деревянной грудки”. С помощью гибридизации РНК *in situ* установлена повышенная экспрессия гена липопротеинлипазы в венозном русле пораженных цыплят. Повышенный уровень экспрессии данного фермента, в свою очередь, способствует повышенной проницаемости венозного эндотелия для свободных жирных кислот и остатков липопротеинов, что приводит к развитию очага лимфоцитарного флебита. Авторами тем же методом исследованы потенциальные гены-маркеры развития “деревянной грудки”, демонстрирующие повышенную экспрессию: *MYBPC1*, кодирующий миозин-связывающий белок С, участвующий в поддержании структуры саркомера, и *CSRP3*, белок которого играет роль в передаче механосенсорных сигналов. Однако более подробные исследования ассоциированных с этими маркерами процессов еще предстоит [55].

Проводимые исследования с использованием кур в качестве модельных объектов не ограничиваются работами по продуктивности [56, 57]. В 2016 г. европейскими учеными изучена зависимость пролиферации и дифференциации клеток головного мозга от экспрессии генов регуляторов обмена тиреоидных гормонов в развивающемся мозжечке эмбрионов кур [58]. В ряде работ показаны клеточные и тканевые паттерны экспрессии транспортеров и дейодиназ тиреоидных гормонов в мозжечке эмбрионов, а также общая картина зависимости развития от них у нескольких типов клеток (в том числе клеток Пуркинье) уже в раннем эмбриогенезе [58–60]. Изучены особенности развития ренин-ангиотензиновой системы во время эмбриогенеза и раннего постнатального онтогенеза цыплят. Показано, что ренин экспрессируется в ренальных и экстраренальных структурах, но с возрастом (30 дней после вылупления) обнаруживается только в юктагломерулярных

клеточных областях почек [26]. Эмбрионы кур являются удобным материалом для изучения процессов роста и развития разных тканей и органов, и протоколы для проведения более высокопроизводительных исследований продолжают разрабатываться. Так, была показана адаптация методики повышения оптической прозрачности тотальных препаратов эмбрионов кур с использованием мультиплексной иммуногистохимии и гибридизации РНК *in situ* [61].

К сожалению, на сегодняшний день проведено мало работ по изучению пространственных транскриптомных особенностей других сельскохозяйственных животных.

Особенности транскриптомики отдельных клеток кишечника представляют интерес не только на курах в качестве модельного объекта. Проведенный в 2022 г. транскриптомный анализ с высоким разрешением показал транскрипционную изолированность для иммунных и эпителиальных клеток тонкого кишечника человека и свиньи [62]. Это первое исследование с помощью scRNA-seq, в котором выявлены транскрипционные различия между интраэпителиальными и субэпителиальными лимфоцитами у свиней. С использованием секвенирования транскриптома единичных клеток таких различий обнаружено не было, поскольку необходимо изолирование лимфоцитов разных слоев кожи [63]. Исследования по транскрипционным различиям интраэпителиальных и субэпителиальных лимфоцитов у свиней *in situ* с помощью методов гибридизации РНК до сих пор не проведены.

В 2018 г. корейские ученые исследовали экспрессию генов, отвечающих за различные биологические процессы, специфичные для эндометрия, яичников и яйцеводов свиней. Были проведены секвенирование транскриптома и валидация результатов с помощью ОТ-ПЦР с последующей гибридизацией РНК *in situ* для потенциальных биомаркеров тканеспецифичных процессов. В качестве таких маркеров были идентифицированы следующие гены: *CYP7A1*, *CYP17A1* и *CYP19A1*, обеспечивающие биосинтез стероидов и локализующиеся в тканях яичников; *PTGS2* и *PTGER2* — ассоциированы с метаболизмом эйкозаноидов, специфичных для тканей эндометрия. Отмечен высокий уровень экспрессии мРНК *CYP7A1* и *CYP19A1* в фолликулах яичников в клетках гранулезы, в то время как мРНК *CYP17A* экспрессируется в основном в тека-клетках яичников. Экспрессия данных

маркеров указывает на то, что стероидогенная активность в яичниках опосредована действием тека-клеток и клеток гранулезы. Уровни экспрессии мРНК *CYP17A1* и *CYP19A1* во время фазы проэструса были высокими. Экспрессия генов *PTGS2* и *PTGER2* в эндометрии обнаружена в эпителиальных и стромальных клетках с выраженной интенсивностью сигнала в фазе позднего диэструса и проэструса. Можно предположить, что действие простагландинов на эндометрий может иметь решающее значение для функции эндометрия и эстральной цикличности. Авторы считают, что дальнейшие исследования должны быть направлены на выяснение молекулярных функций данных генов для их дальнейшего использования в качестве молекулярных маркеров клеток и тканей [64].

Комплекс методов, включающий гибридизацию РНК *in situ*, иммуногистохимию и радиоиммуноанализ, использован для изучения связи функций нейроэндокринной системы и фертильности молочных коров. Исследован уровень экспрессии мРНК гипоталамического нейропептида *Kiss1*, который стимулирует секрецию гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) и опосредует эффекты обратной связи половых стероидов на секрецию ГнРГ в дугообразном ядре гипоталамуса. Установлено, что снижение экспрессии *Kiss1* может являться фактором снижения фертильности коров [65].

В.Т. Mohammed и F.X. Donadeu с помощью гибридизации РНК *in situ* изучили экспрессию *miR-202* в клетках Сертоли и гоноцитах в семенниках быков. Результаты исследования показали изменения в экспрессии *miR-202* на разных стадиях развития гоноцитов во время сперматогенеза. Уровень экспрессии *miR-202* был выше в сперматогониях и первичных сперматоцитах, расположенных вблизи базального отдела семенных канальцев, по сравнению со вторичными сперматоцитами и сперматидами. Используя доступные базы данных о микроРНК, для *miR-202* идентифицировано в общей сложности 466 предполагаемых генов-мишеней (в том числе мишень рапамицина — *mTOR*), что дает основания предполагать ключевую роль *miR-202* в регуляции созревания и жизнеспособности гоноцитов в семенниках быков [66], а также ее роль в регуляции первого деления зиготы [67].

В 2020 г. китайскими учеными проведено комплексное исследование роли *lncRNA LncIMF4* во внутримышечном адипогенезе у преадипоци-

тов с использованием секвенирования транскриптома и гибридизации РНК *in situ*. Авторы утверждают, что нокдаун *LncIMF4* малой интерферирующей РНК стимулирует пролиферацию и дифференцировку внутримышечных адипоцитов свиней, поскольку происходит ослабление процессов аутофагии внутриклеточных липидов [68]. Сравнительные исследования энтеральной нервной системы человека и подсвинков с помощью секвенирования транскриптома позволили идентифицировать среди картированных клеток три основных нейрональные (холин-, NO- и глутаматергические) и две глиальные субпопуляции, их дискриминационные маркерные гены были валидизированы с помощью RNAscope [69].

В доступных источниках литературы не найдено комплексных работ с использованием методов гибридизации РНК *in situ*, посвященных изучению видовых транскриптомных различий сельскохозяйственных животных и птицы. Существуют работы, в которых изучены процессы, подробно описанные у других животных (например, крыс и мышей), а также атласы, посвященные изучению паттернов экспрессии эмбрионов мышей [70], все те же аспекты еще предстоит исследовать у продуктивных животных. Например, лептин и фактор некроза опухолей являются взаимосвязанными адипокинами, однако на основании полученных результатов по FISH-TSA картированию генов, ИГХ и ОТ-ПЦР в 2019 г. сделано предположение, что роль в качестве адипокина для фактора некроза опухолей может быть свойственна только млекопитающим [23]. Впервые в 2017 г. для кур были подробно изучены особенности экспрессии панкреатических полипептидов в зависимости от режима и рациона питания [71]. На сегодняшний день не существует исследований с использованием, например, одной группы генов в разрезе их пространственных особенностей расположения и клеточной принадлежности для разных видов животных. Известно только одно исследование различий в регуляции и организации внеклеточного матрикса (гиалуроновая кислота и коллаген) яичников крупного рогатого скота и свиней. Однако при проведении оценки уровня экспрессии генов, участвующих в синтезе коллагена (*Col3a1*, *Colla1*), генов гиалуронидаз (*Hyal1*, *Hyal2*, *Tmem2* и *Kiaa1199*) и синтаз гиалуронана (*Has1*, *Has2*, *Has3*), как утверждают сами авторы, экспериментальная выборка была слишком мала, чтобы сделать окончательные выводы об их свойствах, а РНК FISH для одной из гиалуронидаз был проведен только на мышах [72].

Только в 2019 г. изучены особенности пространственной экспрессии гена лептина и его рецепторов в коже крупного рогатого скота. Показано, что адипоциты отсутствуют около волосных фолликулов [73]. Напротив, в исследовании кожи собак обнаружена экспрессия молекул лептина около волосных фолликулов, а также рецепторов лептина на клетках сальных желез [74], что свидетельствует о морфологических различиях в структуре волосистой части кожи разных видов. Уже известно, что у человека белая жировая ткань кожи играет паракринную роль в росте и развитии волосных фолликулов, однако некоторые механизмы путей этого сигналинга не изучены. Например, как адипокины влияют на секретируемый кожей белой жировой тканью фактор роста гепатоцитов, который, в конечном счете, оказывает влияние на рост волосных фолликулов [75]. Учитывая транскриптомные различия в структуре тканей кожи разных видов, имеются основания предполагать отсутствие паракринного контроля адипозной тканью развития волосных фолликулов у крупного рогатого скота.

Одним из перспективных направлений использования гибридизации РНК *in situ* является изучение пространственной экспрессии генов для понимания процессов структурно-функциональной дегенерации тканей [76], испытывающих нагрузку при метаболических дисбалансах, связанных с промышленным содержанием продуктивных животных. В данной области использование методов пространственной транскриптомики и метаболомики еще предстоит для ряда маркеров и процессов (инсулин-инсулиноподобный сигналинг, мишень рапамицина, сигнальные пути MAPK, сиртуины, рецепторы PPAR, бета-галактозидаза и другие) [77–80]. Такие исследования позволяют по-новому взглянуть на физиологические и патологические процессы метаболического старения тканей.

Еще одним методом исследования пространственной экспрессии генов является секвенирование РНК *in situ* [81–83]. В сельскохозяйственной биологии количество таких работ крайне мало. Группой исследователей из КНР проведено транскриптомное исследование мышечной и жировой ткани свиней. Использованы секвенирование транскриптома единичных клеток и анализ пространственной экспрессии с помощью Visium (10× Genomics Inc, США). Определены особенности миофибрилльного состава мышц. В результате работы охарактеризована транскриптомная изменчивость и идентифи-

цированы молекулярные механизмы, лежащие в основе экономически ценных признаков у свиней. Помимо новых, ранее неизученных транскриптов (в том числе транскриптов с неопределенным кодирующим потенциалом, микроРНК, кольцевых РНК, длинных некодирующих РНК), исследователями обнаружено, что более глубокие слои скелетной мышечной ткани (участвуют в поддержании положения тела), характеризующиеся быстрым окислительным метаболизмом, имели больше мРНК миофибрилл I типа по сравнению с поверхностными слоями (участвуют в быстрых движениях), которые содержат больше мРНК миофибрилл IIВ типа [84]. В другом исследовании с помощью секвенирования транскриптома *in situ* (Visium, 10× Genomics Inc.), секвенирования единичных клеток и валидации генов-маркеров цепной реакцией гибридизации v3.0 [24] изучен эмбриогенез сердечной мышцы цыплят на нескольких сроках развития. Результаты комплексного подхода в секвенировании клеток были валидированы с помощью ИГХ и гибридизации РНК *in situ*, что позволило исследователям предположить участие клеток эпикардального происхождения в регуляции экспрессии ключевых генов белков внеклеточного матрикса, вовлеченных в миграции клеток [85].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время представлено ограниченное количество работ по исследованию экспрессии генов *in situ* не только в Российской Федерации, но и за рубежом. В отечественной ветеринарной медицине подобных работ не проводилось. В связи с этим большой объем фундаментальных знаний, полученный секвенированием транскриптома, остается невостребованным с помощью гистологических методик. Такое последовательное комплексное воспроизведение результатов секвенирования реализуется, но недостаточно распространено.

К сожалению, на сегодняшний день проведено мало исследований по изучению пространственных транскриптомных особенностей сельскохозяйственных животных. Несмотря на разнообразие доступных технологий и их постоянное совершенствование, у свиней и крупного рогатого скота более детальные исследования экспрессии генов еще предстоят.

Также актуальным является изучение течения инфекционного процесса с точки зрения экс-

прессии генов противо- и провоспалительных маркеров в различных тканях.

Таким образом, представляется перспективной разработка отечественной технологии для оценки уровня экспрессии *in situ* с использованием гибридизационных зондов по технологии, принцип работы которой находился бы в открытом доступе. На сегодняшний день подобные разработки с использованием новых доступных химических компонентов в России отсутствуют, как и коммерческие наборы для проведения данного анализа.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России по теме № 0532-2022-0004 “Разработка технологии для маркер-ориентированной селекции крупного рогатого скота по генам, ассоциированным с устойчивостью к заболеваниям”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Riollot C., Rainard P., Poutrel B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection // J. Dairy. Sci. 2001. V. 84. № 5. P. 1077–1084. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74568-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74568-7)
2. Kong R.S., Liang G., Chen Y. et al. Transcriptome profiling of the rumen epithelium of beef cattle differing in residual feed intake // BMC Genomics. 2016. V. 17. Article ID 592. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2935-4>
3. Resnyk C.W., Chen C., Huang H. et al. RNA-Seq analysis of abdominal fat in genetically fat and lean chickens highlights a divergence in expression of genes controlling adiposity, hemostasis, and lipid metabolism // PLoS One. 2015. V. 10. № 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139549>
4. Li X., Wang C.Y. From bulk, single-cell to spatial RNA sequencing // Int. J. Oral. Sci. 2021. V. 13. № 1. Article ID 36. <https://doi.org/10.1038/s41368-021-00146-0>
5. Jovic D., Liang X., Zeng H. et al. Single-cell RNA sequencing technologies and appli-

- cations: A brief overview // Clin. Transl. Med. 2022. V. 12. № 3. Article ID e694. <https://doi.org/10.1002/ctm2.694>
6. Hwang B., Lee J.H., Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines // Exp. Mol. Med. 2018. V. 50. № 8. P. 1–14. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0071-8>
 7. Wiarda J.E., Trachsel J.M., Sivasankaran S.K. et al. Intestinal single-cell atlas reveals novel lymphocytes in pigs with similarities to human cells // Life Sci. Alliance. 2022. V. 5. № 10. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201442>
 8. Junhong W., Mingyang C., Ming G. et al. Single-cell transcriptional analysis of lamina propria lymphocytes in the jejunum reveals ILC-like cells in pigs // bioRxiv. 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.01.01.522424>
 9. Eng C.L., Lawson M., Zhu Q. et al. Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH // Nature. 2019. V. 568. № 7751. P. 235–239. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1049-y>
 10. Cassidy A., Jones J. Developments in situ hybridisation // Methods. 2014. V. 70. № 1. P. 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.04.006>
 11. Young A.P., Jackson D.J., Wyeth R.C. A technical review and guide to RNA fluorescence in situ hybridization // PeerJ. 2020. V. 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.8806>
 12. Weise A., Liehr T. Rapid prenatal aneuploid screening by fluorescence in situ hybridization (FISH) // Methods Mol. Biol. 2019. V. 1885. P. 129–137. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8889-1_9
 13. Prudent E., Raoult D. Fluorescence in situ hybridization, a complementary molecular tool for the clinical diagnosis of infectious diseases by intracellular and fastidious bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 2019. V. 43. № 1. P. 88–107. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy040>
 14. O'Connor S.J.M., Turner K.R., Barrans S.L. Practical application of fluorescent in situ hybridization techniques in clinical diagnostic laboratories // Methods Mol. Biol. 2020. V. 2148. P. 35–70. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0623-0_3
 15. Chrzanowska N.M., Kowalewski J., Lewandowska M.A. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) in diagnosis and tailored therapies in solid tumors // Molecules. 2020. V. 25. № 8. <https://doi.org/10.3390/molecules25081864>
 16. Zirkel A., Papantonis A. Detecting circular RNAs by RNA fluorescence in situ hybridization // Methods Mol. Biol. 2018. V. 1724. P. 69–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7562-4_6
 17. Uhl G.R. In situ hybridization: quantitation using radiolabeled hybridization probes // Methods Enzymol. 1989. V. 168. P. 741–752. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(89\)68055-x](https://doi.org/10.1016/0076-6879(89)68055-x)
 18. Wang F., Flanagan J., Su N. et al. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues // J. Mol. Diagn. 2012. V. 14. № 1. P. 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>
 19. Itzkovitz S., van Oudenaarden A. Validating transcripts with probes and imaging technology // Nat. Methods. 2011. V. 8. № 4. P. S12–S19. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1573>
 20. Kang H., Sheng L., Yongsheng C. HuluFISH non-denaturing in situ detection of genomic DNA opened by CRISPR-Cas9 Nickase and Exonuclease // bioRxiv. 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.12.23.473974>
 21. Asp M., Bergenstr hle J., Lundeberg J. Spatially resolved transcriptomes – next generation tools for tissue exploration // BioEssays. 2020. V. 42. № 10. <https://doi.org/10.1002/bies.201900221>
 22. Speel E.J., Hopman A.H., Komminoth P. Tyramide signal amplification for DNA and mRNA in situ hybridization // Methods Mol. Biol. 2006. V. 326. P. 33–60. <https://doi.org/10.1385/1-59745-007-3:33>
 23. Seroussi E., Knytl M., Pitel F. et al. Avian expression patterns and genomic mapping implicate leptin in digestion and TNF in immunity, suggesting that their interacting adipokine role has been acquired only in mammals // Intern. J. Mol. Sciences. 2019. V. 20. № 18. <https://doi.org/10.3390/ijms20184489>
 24. Choi H.M.T., Schwarzkopf M., Fornace M.E. et al. Third-generation in situ hybridization chain reaction: multiplexed, quantitative, sensitive, versatile, robust // Development. 2018. V. 145. № 12. <https://doi.org/10.1242/dev.165753>
 25. Jeong W., Bae H., Lim W. et al. Dicer1, AGO3, and AGO4 microRNA machinery genes are differentially expressed in developing female reproductive organs and overexpressed in cancerous ovaries of chickens // J. Animal Science. 2017. V. 95. № 11. P. 4857–4868. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1846>
 26. Hoy J., Nishimura H., Mehlic T. et al. Ontogeny of renin gene expression in the chicken, Gallus gallus // General and Comparative Endocrinology. 2020. V. 296. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113533>
 27. Ogata M., Hayashi G., Ichii A. et al. 1-DNA-tagged fluorescence in situ hybridization for highly sensitive imaging of RNAs in single cells // Organic & Biomol. Chemistry. 2020. V. 18. № 40. P. 8084–8088. <https://doi.org/10.1039/d0ob01635g>
 28. Veselinyov  D., Mařlankov  J., Kalinov  K. et al. Selected in situ hybridization methods: principles

- and application // *Molecules*. 2021. V. 26. № 13. <https://doi.org/10.3390/molecules26133874>
29. *Schwarzkopf M., Choi H.M.T., Pierce N.A.* Multiplexed quantitative in situ hybridization for mammalian cells on a slide: qHCR and dHCR imaging (v3.0) // *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2148. P. 143–156. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0623-0_9
 30. *Tsuneoka Y., Funato H.* Modified in situ hybridization chain reaction using short hairpin DNAs // *Frontiers Mol. Neurosci.* 2020. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00075>
 31. *Baena-Del Valle J.A., Zheng Q., Hicks J.L. et al.* Rapid loss of RNA detection by in situ hybridization in stored tissue blocks and preservation by cold storage of unstained slides // *Am. J. Clin. Pathology*. 2017. V. 148. № 5. P. 398–415. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqx094>
 32. *Xiao L., Labaer J., Guo J.* Highly sensitive and multiplexed in situ RNA profiling with cleavable fluorescent tyramide // *Cells*. 2021. V. 10. № 6. <https://doi.org/10.3390/cells10061277>
 33. *Alon S., Goodwin D.R., Sinha A. et al.* Expansion sequencing: Spatially precise in situ transcriptomics in intact biological systems // *Science*. 2021. V. 371. № 6528. <https://doi.org/10.1126/science.aax2656>
 34. *Lee J.H., Daugharthy E.R., Scheiman J. et al.* Fluorescent in situ sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues // *Nat. Protocols*. 2015. V. 10. № 3. P. 442–458. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.191>
 35. *Payne A.C., Chiang Z.D., Reginato P.L. et al.* In situ genome sequencing resolves DNA sequence and structure in intact biological samples // *Science*. 2021. V. 371. № 6532. <https://doi.org/10.1126/science.aay3446>
 36. *Kishi J.Y., Liu N., West E.R. et al.* Light-Seq: Light-directed in situ barcoding of biomolecules in fixed cells and tissues for spatially indexed sequencing // *Nat. Methods*. 2022. V. 19. № 11. P. 1393–1402. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01604-1>
 37. *Pandit K., Petrescu J., Cuevas M. et al.* An open source toolkit for repurposing Illumina sequencing systems as versatile fluidics and imaging platforms // *Scientific Reports*. 2022. V. 12. № 1. Article ID 5081. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08740-w>
 38. *Williams C.G., Lee H.J., Asatsuma T. et al.* An introduction to spatial transcriptomics for biomedical research // *Genome Medicine*. 2022. V. 14. № 1. Article ID 68. <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01075-1>
 39. *Sicherre E., Favier A.L., Riccobono D., Nikovics K.* Non-specific binding, a limitation of the immunofluorescence method to study macrophages in situ // *Genes*. 2021. V. 12. № 5. <https://doi.org/10.3390/genes12050649>
 40. *Skaugen J.M., Seethala R.R., Chiosea S.I. et al.* Evaluation of NR4A3 immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization and comparison with DOG1 IHC for FNA diagnosis of acinic cell carcinoma // *Cancer Cytopathology*. 2021. V. 129. № 2. P. 104–113. <https://doi.org/10.1002/cncy.22338>
 41. *Atout S., Shurrah S., Loveridge C.* Evaluation of the suitability of RNAscope as a technique to measure gene expression in clinical diagnostics: a systematic review // *Mol. Diagn. Ther.* 2022. V. 26. № 1. P. 19–37. <https://doi.org/10.1007/s40291-021-00570-2>
 42. *Liu K., Jia M., Wong E.A.* Delayed access to feed affects broiler small intestinal morphology and goblet cell ontogeny // *Poult. Sci.* 2020. V. 99. № 11. P. 5275–5285. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.040>
 43. *Reynolds K.L., Cloft S.E., Wong E.A.* Changes with age in density of goblet cells in the small intestine of broiler chicks // *Poult. Sci.* 2020. V. 99. № 5. P. 2342–2348. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.052>
 44. *Cloft S.E., Uni Z., Wong E.A.* Profiling intestinal stem and proliferative cells in the small intestine of broiler chickens via in situ hybridization during the peri-hatch period // *Poult. Sci.* 2023. V. 102. № 4. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102495>
 45. *Fries-Craft K.A., Meyer M.M., Lindblom S.C. et al.* Lipid source and peroxidation status alter immune cell recruitment in broiler chicken ileum // *J. Nutr.* 2021. V. 151. № 1. P. 223–234. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa356>
 46. *Reicher N., Melkman-Zehavi T., Dayan J. et al.* It's all about timing: early feeding promotes intestinal maturation by shifting the ratios of specialized epithelial cells in chicks // *Front. Physiol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.596457>
 47. *Reicher N., Melkman-Zehavi T., Dayan J. et al.* Nutritional stimulation by in-ovo feeding modulates cellular proliferation and differentiation in the small intestinal epithelium of chicks // *Anim. Nutr.* 2022. V. 8. № 1. P. 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.06.010>
 48. *Reicher N., Melkman-Zehavi T., Dayan J. et al.* Intra-amniotic administration of l-glutamine promotes intestinal maturation and enteroendocrine stimulation in chick embryos // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. Article ID 2645. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06440-z>
 49. *Zhang H., Wong E.A.* Identification of cells ex-

- pressing OLFM4 and LGR5 mRNA by in situ hybridization in the yolk sac and small intestine of embryonic and early post-hatch chicks // *Poult. Sci.* 2018. V. 97. № 2. P. 628–633. <https://doi.org/10.3382/ps/pex328>
50. Li J., Xing S., Zhao G. *et al.* Identification of diverse cell populations in skeletal muscles and biomarkers for intramuscular fat of chicken by single-cell RNA sequencing // *BMC Genomics*. 2020. V. 21. № 1. Article ID 752. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07136-2>
 51. Zhang M., Li F., Sun J.W. *et al.* LncRNA IM-FNCR promotes intramuscular adipocyte differentiation by sponging miR-128-3p and miR-27b-3p // *Front. Genet.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00042>
 52. Luo N., Shu J., Yuan X. *et al.* Differential regulation of intramuscular fat and abdominal fat deposition in chickens // *BMC Genomics*. 2022. V. 23. № 1. Article ID 308. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08538-0>
 53. Liu J., Puolanne E., Schwartzkopf M. *et al.* Altered sarcomeric structure and function in Woody Breast myopathy of avian pectoralis major muscle // *Front. Physiol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00287>
 54. Bordignon F., Xiccato G., Boskovic Cabrol M. *et al.* Factors affecting breast myopathies in broiler chickens and quality of defective meat: a meta-analysis // *Front. Physiol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.933235>
 55. Papah M.B., Abasht B. Dysregulation of lipid metabolism and appearance of slow myofiber-specific isoforms accompany the development of Wooden Breast myopathy in modern broiler chickens // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53728-8>
 56. Darras V.M. Deiodinases: How nonmammalian research helped shape our present view // *Endocrinology*. 2021. V. 162. № 6. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqab039>
 57. Too H.C., Shibata M., Yayota M. *et al.* Expression of thyroid hormone regulator genes in the yolk sac membrane of the developing chicken embryo // *J. Reprod. Dev.* 2017. V. 63. № 5. P. 463–472. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-017>
 58. Delbaere J., Van Herck S.L., Bourgeois N.M. *et al.* Mosaic expression of thyroid hormone regulatory genes defines cell type-specific dependency in the developing chicken cerebellum // *Cerebellum*. 2016. V. 15. № 6. P. 710–725. <https://doi.org/10.1007/s12311-015-0744-y>
 59. Darras V.M. The role of maternal thyroid hormones in avian embryonic development // *Front. Endocrinol.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00066>
 60. Delbaere J., Vancamp P., Van Herck S.L. *et al.* MCT8 deficiency in Purkinje cells disrupts embryonic chicken cerebellar development // *J. Endocrinol.* 2017. V. 232. № 2. P. 259–272. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0323>
 61. Morrison J.A., McKinney M.C., Kulesa P.M. Resolving in vivo gene expression during collective cell migration using an integrated RNAscope, immunohistochemistry and tissue clearing method // *Mech. Dev.* 2017. V. 148. P. 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2017.06.004>
 62. Wiarda J.E., Loving C.L. Intraepithelial lymphocytes in the pig intestine: T cell and innate lymphoid cell contributions to intestinal barrier immunity // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1048708>
 63. Wiarda J.E., Becker S.R., Sivasankaran S.K. *et al.* Regional epithelial cell diversity in the small intestine of pigs // *J. Anim. Sci.* 2023. V. 101. <https://doi.org/10.1093/jas/skac318>
 64. Kim J.M., Park J.E., Yoo I. *et al.* Integrated transcriptomes throughout swine oestrous cycle reveal dynamic changes in reproductive tissues interacting networks // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23655-1>
 65. Clarke I.J., Reed C.B., Burke C.R. *et al.* Kiss1 expression in the hypothalamic arcuate nucleus is lower in dairy cows of reduced fertility // *Biol. Reprod.* 2022. V. 106. № 4. P. 802–813. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab240>
 66. Mohammed B.T., Donadeu F.X. Localization and in silico-based functional analysis of miR-202 in bull testis // *Reprod. Domest. Anim.* 2022. V. 57. № 9. P. 1082–1087. <https://doi.org/10.1111/rda.14159>
 67. Wang M., Du Y., Gao S. *et al.* Sperm-borne miR-202 targets SEPT7 and regulates first cleavage of bovine embryos via cytoskeletal remodeling // *Development*. 2021. V. 148. № 5. <https://doi.org/10.1242/dev.189670>
 68. Sun Y., Cai R., Wang Y. *et al.* A newly identified LncRNA LncIMF4 controls adipogenesis of porcine intramuscular preadipocyte through attenuating autophagy to inhibit lipolysis // *Animals*. 2020. V. 10. № 6. <https://doi.org/10.3390/ani10060926>
 69. Li T., Morselli M., Su T. *et al.* Comparative transcriptomics reveals highly conserved regional programs between porcine and human colonic enteric nervous system // *Commun. Biol.* 2023. V. 6. № 1. Article ID 98. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04478-x>
 70. Visel A., Thaller C., Eichele G. GenePaint.org: An atlas of gene expression patterns in the mouse em-

- bryo // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. D552–D556. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh029>
71. Reid A.M.A., Wilson P.W., Caughey S.D. et al. Pancreatic PYY but not PPY expression is responsive to short-term nutritional state and the pancreas constitutes the major site of PYY mRNA expression in chickens // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2017. V. 252. P. 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.002>
 72. Parkes W.S., Amargant F., Zhou L.T. et al. Hyaluronan and collagen are prominent extracellular matrix components in bovine and porcine ovaries // *Genes.* 2021. V. 12. № 8. <https://doi.org/10.3390/genes12081186>
 73. Mercati F., Dall'Aglio C., Timperi L. et al. Epithelial expression of the hormone leptin by bovine skin // *Eur. J. Histochem.* 2019. V. 63. № 1. <https://doi.org/10.4081/ejh.2019.2993>
 74. Brement T., Cossec C., Roux C. et al. Expression of three adipokines (adiponectin, leptin and resistin) in normal canine skin: a pilot study // *J. Comp. Pathol.* 2019. V. 167. P. 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.10.179>
 75. Nicu C., O'Sullivan J.D.B., Ramos R. et al. Dermal adipose tissue secretes hgf to promote human hair growth and pigmentation // *J. Invest. Dermatol.* 2021. V. 141. № 7. P. 1633–1645. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.12.019>
 76. Wasserfall C., Nick H.S., Campbell-Thompson M. et al. Persistence of pancreatic insulin mrna expression and proinsulin protein in type 1 diabetes pancreata // *Cell Metab.* 2017. V. 26. № 3. P. 568–575. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.013>
 77. Amorim J.A., Coppotelli G., Rolo A.P. et al. Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2022. V. 18. № 4. P. 243–258. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00626-7>
 78. Sandhu B., Perez Matos M.C., Tran S. et al. Quantitative digital pathology reveals association of cell-specific PNPLA3 transcription with NAFLD disease activity // *JHEP Rep.* 2019. V. 1. № 3. P. 199–202. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.05.007>
 79. Kim H.J., Cheng P., Travisano S. et al. Molecular mechanisms of coronary artery disease risk at the PDGFD locus // *Nat. Commun.* 2023. V. 14. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36518-9>
 80. Pedroza A.J., Tashima Y., Shad R. et al. Single-cell transcriptomic profiling of vascular smooth muscle cell phenotype modulation in marfan syndrome aortic aneurysm // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020. V. 40. № 9. P. 2195–2211. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314670>
 81. Choe K., Pak U., Pang Y. et al. Advances and challenges in spatial transcriptomics for developmental biology // *Biomolecules.* 2023. V. 13. № 1. <https://doi.org/10.3390/biom13010156>
 82. Zhang L., Chen D., Song D. et al. Clinical and translational values of spatial transcriptomics // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022. V. 7. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00960-w>
 83. Wirth J., Huber N., Yin K. et al. Spatial transcriptomics using multiplexed deterministic barcoding in tissue // *Nat. Commun.* 2023. V. 14. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37111-w>
 84. Jin L., Tang Q., Hu S. et al. A pig BodyMap transcriptome reveals diverse tissue physiologies and evolutionary dynamics of transcription // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23560-8>
 85. Mantri M., Scuderi G.J., Abedini-Nassab R. et al. Spatiotemporal single-cell RNA sequencing of developing chicken hearts identifies interplay between cellular differentiation and morphogenesis // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21892-z>

CURRENT STATE OF *in situ* GENE EXPRESSION STUDIES IN ANIMAL TISSUES

© 2024 M. V. Bytov¹, V. D. Zubareva¹, S. V. Volskaya¹, S. L. Khatsko^{1,2}, I. A. Shkuratova¹, O. V. Sokolova^{1,*}

¹Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, 112a, Belinsky str., Ekaterinburg, 620142 Russia

²Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, 620026 Russia

*e-mail: nauka_sokolova@mail.ru

Morphological studies of farm animals are most often conducted using simple preparation and staining techniques. The study of the processes of embryogenesis, postembryonic features of the development of organs and tissues, as well as the effect of various substances remains to be elucidated not only using histochemical and immunohistochemical staining methods, but also using RNA *in situ* hybridization and transcriptome *in situ* sequencing. Aspects of many cellular and tissue processes for cattle, pigs and chickens in the context of comparative physiology have not yet been studied. The high productivity of farm animals is associated with the intensive functioning of all organs and systems of the body. The influence of the agricultural management of farm animals and its consequences on the development of an organism in ontogeny deserve a separate area of research from the point of *in situ* gene expression. Despite rapid development of transcriptome sequencing technologies, which result in the discovery of new candidate genes for many processes, RNA *in situ* hybridization remains the gold standard for their validation. This review briefly presents modern techniques and their modifications for studying *in situ* gene expression. Transcriptome studies that have been implemented in cattle, pigs and chickens as model organisms include: *in situ* RNA hybridization using ZZ-probes, tyramide signal amplification, hybridization chain reaction, digoxigenin-labeled probes, RT-PCR, single cell transcriptome sequencing, *in situ* transcriptome sequencing. This paper is a review of the results of studies on cattle, pigs and chickens. The results of research in this area are relevant for understanding the features of adaptation mechanisms at the transcriptomic level in highly productive animals under industrial conditions in order to search for new markers of valuable agricultural traits. It should be noted that in literature there are very few studies using RNA *in situ* hybridization, despite the availability and simplicity of the method.

Keywords: *in situ* hybridization, cattle, chicken, pigs, gene expression, histology, morphology, physiology