

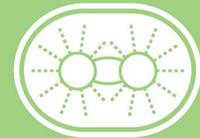
ISSN 0475-1450

Том 55, Номер 2

Март - Апрель 2024



ОНТОГЕНЕЗ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 55, номер 2, 2024

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Участие повторяющегося элемента генома GGAAA в дифференцировке пола у курицы

А. Ф. Сайфитдинова, А. А. Жукова

47

ТОЧКА ЗРЕНИЯ

Соматические стволовые клетки животных: изменение парадигмы (точка зрения спонгиолога)

А. В. Ересковский

53

CRISPR-технология редактирования генома помогает манипулировать полом потомства у мышей

А. Ю. Кулибин

68

Генеалогия нейронов: 50 лет реконструкции эволюции нервных систем

Л. Л. Мороз, В. Е. Дьяконова

75

CONTENTS

Vol. 55, No. 2, 2024

RESEARCH PAPERS

Participation of Chicken GGAAA Repeat in Sex Differentiation

A. F. Saifitdinova, A. A. Zhukova

47

POINT OF VIEW

Adult Stem Cells in Animals: a Paradigm Shift from a Spongiologist Perspective

A. V. Ereskovsky

53

CRISPR Technology of Genome Editing Helps to Manipulate the Offspring Sex Ratio in Mice

A. Yu. Kulibin

68

Genealogy of Neurons: 50 Years of Reconstructing the Evolution of Nervous Systems

L. L. Moroz, V. E. Dyakonova

75

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 575.181, 577.218

Статья посвящена 120-летию
со дня рождения выдающегося российского генетика,
академика Бориса Львовича Астаурова

**УЧАСТИЕ ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ЭЛЕМЕНТА ГЕНОМА GGAAA
В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ПОЛА У КУРИЦЫ**

© 2024 г. А. Ф. Сайфитдинова^{a, b, *}, А. А. Жукова^{a, c}

^aРоссийский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена,
Санкт-Петербург, 191186 Россия

^bСанкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, 199034 Россия

^cСанкт-Петербургский филиал ФГБНУ ВНИРО “ГосНИОРХ” им. Л. С. Берга,
Санкт-Петербург, 199053 Россия

*e-mail: saifitdinova@mail.ru

Поступила в редакцию 05.12.2024 г.

Окончательная версия 23.12.2024 г.

Принято к публикации 24.12.2024 г.

Тандемные повторяющиеся элементы, образующие протяженные полипуриновые/полипиримидиновые непрерывные последовательности обнаружены в геномах различных видов животных. Особенности их структуры способствуют изгибанию спирали ДНК и переходу к неканоническим формам вторичной структуры ДНК. В современной научной литературе можно встретить множество примеров участия таких элементов в регуляции экспрессии генов и образовании альтернативных транскриптов в клетках разных типов (Matos-Rodrigues et al., 2023). Ранее нами описан повторяющийся элемент (GGAAA)_n курицы (*Gallus gallus domesticus*), который преимущественно локализован на половой хромосоме W и составляет около 1% генома самок (Komissarov et al., 2018). В данной работе мы выявили особенности локализации этого тандемного повтора в геноме курицы в составе аутосом и половой хромосомы Z. Был выявлен ряд генов, содержащих тандемно повторенные элементы (GGAAA)_n в составе некодирующих транскрибируемых регуляторных районов, которые могут влиять на интенсивность экспрессии и образование альтернативных транскриптов. Функциональная характеристика генов, несущих блоки (GGAAA)_n, позволила выдвинуть предположение об участии этих тандемных повторов в регулировании дифференциальной активности генов, важной для развития признаков полового диморфизма у курицы.

Ключевые слова: курица, тандемные повторы, полипуриновые/полипиримидиновые непрерывные последовательности, анализ геномных данных, дифференцировка пола

DOI: 10.31857/S0475145024020015, **EDN:** MDPCTC

ВВЕДЕНИЕ

Для птиц характерно наличие генетического механизма определения пола с системой половых хромосом ZW, при которой самки гетерогаметны, а самцы гомогаметны. В ходе эволюции некодирующие участки W-хромосомы птиц подверглись значительной деградаци и накоплению повторяющихся элементов (Komissarov et al., 2018), однако, в отличие от млекопитающих, гетероморфная половая хромосома у птиц сохранила небольшое число генов, причем все они имеют биаллельную экспрессию в широком спектре взрослых и эмбриональных тканей

и чувствительны к сокращению дозы гена (Bellott et al., 2017). Пол у всех изученных видов птиц определяется генетически, но в составе половых хромосом не найдено конкретных генов — инвариантных переключателей типа половой дифференцировки, подобно *SRY* у млекопитающих (Bellott et al., 2017).

Ранее нами описан повторяющийся элемент (GGAAA)_n, который у курицы локализуется преимущественно в виде двух протяженных блоков на обоих плечах половой хромосомы W и составляет около 1% генома (Komissarov et al., 2018). В эукариотических геномах гомо-

пуриновые последовательности составляют значительную часть простых повторяющихся последовательностей ДНК, они часто встречаются в регуляторных областях генов. Помимо этого, протяженные полипуриновые/полипиримидиновые непрерывные последовательности обнаружены в местах рекомбинации, в точках начала репликации и внутри различных типов мобильных элементов, включая временно встраивающихся в геном последовательности вирусов (Matos-Rodrigues et al., 2023). Особенность организации таких элементов способствует увеличению их копияности в составе нерекombинирующей половой хромосомы. Транскрипция повторяющихся элементов, в состав которых входят комплементарные регуляторным районам последовательности, создает предпосылки для вовлечения их в регуляцию экспрессии генов. Механизм регуляции может быть основан как на связывании белков с неканоническими структурами ДНК и РНК, так и быть опосредован некодирующими РНК, оказывающими влияние на конформационные изменения нуклеиновых кислот (Matos-Rodrigues et al., 2023).

Получены свидетельства того, что локализованный на половой хромосоме W повтор (GGAAA)_n транскрибируется в соматических клетках, однако значение этой транскрипции пока не установлено (Komissarov et al., 2018). Ранее повторяющийся элемент (GGAAA)_n был описан в регулируемом промоторе гена овотрансферрина у фазана (Maroteaux et al. 1983). У курицы наличие тандемного повтора (GGAAA)_n было описано в промоторе гена промежуточных нейрофиламентов, транскрипция которого может изменяться под влиянием стимуляции, причем было показано, что изменение числа повторов в составе промотора влияет на его активацию (Zopf et al., 1990). Мы выдвинули предположение, что повторы (GGAAA)_n, транскрибирующиеся с протяженных блоков на хромосоме W, могут участвовать в половой дифференцировке у курицы посредством взаимодействия с комплементарными короткими блоками тандемных повторов в составе регуляторных областей генов. Мы выявили последовательности тандемных повторов (GGAAA)_n в актуальной версии сборки генома курицы и проанализировали их потенциальное влияние на дифференцировку признаков, специфичных для представителей разного пола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования были использованы данные сборки генома курицы (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) GRCgba (GenBank accession: GCF_000002315.6). Эта сборка содержит информацию о последовательностях половых хромосом Z и W, а также 33 аутосом из 38 имеющихся в геноме курицы. Для определения локализации повторов на хромосомах мы использовали программное обеспечение Unipro UGENE (Version 35, Unipro, Новосибирск, Россия). Для функциональной характеристики генов использовали данные из базы данных GeneCards (Version 5.22.0, Weizmann Institute of Science, Реховот, Израиль), дополнительно информация об их белковых продуктах была проанализирована с помощью аннотированной базы данных белков UNIPROT (The UniProt Consortium: EMBL-EBI, SIB, PIR). Для поиска молекулярного взаимодействия и биологических путей использовали плагин StringApp (Version 1.6.0) для платформы Cytoscape (Version: 3.8.1, Cytoscape Consortium).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В геноме курицы (сборка GRCgba (GCF_000002315.6)) тандемные блоки (GGAAA)_n в количестве 7 и более копий были найдены в составе транскрибируемых некодирующих последовательностей 67 генов (Табл. 1). Из них 55 генов входят в состав аутосом (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 15, 20, 22, 27, 28, 31) и 12 — в состав половой хромосомы Z. Среди них гены *Robo2*, *Sh3gl2*, *Slit2*, *Zmiz1*, экспрессия которых чувствительна к уровню половых гормонов. Активность генов *Lrrc4c* и *Nrxn1* критична для роста фолликулов в яичниках, а продукты генов *Csmd3*, *Csmd1* и *Rorb* участвуют в формировании яйца. Продукт гена *Grik1* регулирует на уровне центральной нервной системы откладку яиц. Подавляющее большинство интерстициальных коротких блоков повтора (GGAAA)_n были выявлены в составе первых интронов генов, кодирующих трансмембранные белки, которые участвуют в синаптической передаче и вовлечены в процессы обучения, пения и реализации агрессивного поведения. Присутствие протяженных участков полипуриновых/полипиримидиновых непрерывных последовательностей, состоящих из тандемно повторенного мономера (GGAAA)_n, может модулировать активность промоторов или переключать транскрипцию на альтернативные промоторы, приводя к об-

Таблица 1. Локализация тандемного повтора (GGAAA)_n в геноме курицы GRCgba

Хромосома	Ген	Район	Число копий	Характеристика белка
1	<i>Aff3</i>	3 интрон	27	транскрипционный фактор
1	<i>Atp7b</i>	1 интрон	36	медь-транспортирующая АТФаза
1	<i>Bmx</i>	8 интрон	26, 21, 18, 16	тирозиновая протеинкиназа
1	<i>Cd101</i>	10 интрон	11	сигнальный белок мембраны
1	<i>Clybl</i>	7 интрон	44	цитрамалил-КоА-лиаза
1	<i>Dram1</i>	3' область	14	модулятор аутофагии
1	<i>Gja8</i>	2 интрон	40	коннексин
1	<i>Gpc5</i>	6 интрон	34, 15, 14, 13	сигнальный белок мембраны
1	<i>Grik1</i>	1 интрон	30	глутаматергический белок
1	<i>Grm5</i>	2 интрон	31	глутаматергический белок
1	<i>Imp2l</i>	5 интрон	46	пептидаза внутренней мембраны митохондрий
1	<i>Magi2</i>	16 интрон	34, 31, 17	мембранная гуанилат-киназа
1	<i>Mpz1l</i>	4 интрон	11	миелиновый мембранный белок
1	<i>Nbea</i>	30 интрон	51	интегральный белок везикул
1	<i>Pcdh9</i>	2 интрон	38	кадгерин
1	<i>Robo2</i>	1 интрон	26	сигнальный белок мембраны
1	<i>Tmprss15</i>	16 интрон	70	мембранная сериновая протеаза
1	<i>Vwf</i>	21 интрон	22	гликопротеин
1	<i>Zpld1</i>	1 интрон	41	гликопротеин
2	<i>Adarb2</i>	1 интрон	40	аденозиновая деаминаза
2	<i>Amph</i>	16 интрон	34, 30, 21	белок везикулярных мембран
2	<i>Cdh19</i>	2 интрон	29	кадгерин
2	<i>Cntnap2</i>	1 интрон	33	нейрексин
2	<i>Cubn</i>	37 интрон	21	сигнальный белок мембраны
2	<i>Dip2c</i>	4 интрон	31	регуляторный белок
2	<i>Dlgap1</i>	2 интрон	15	компонент глутаматергического синапса
2	<i>Frk</i>	1 интрон	21	тирозиновая киназа
2	<i>Npsr1</i>	1 интрон	21	трансмембранный рецептор
2	<i>Nrn1</i>	2 интрон	45	сигнальный белок мембраны
2	<i>Ppp1r9a</i>	6 интрон	25	мембранная фосфатаза
2	<i>Tsnare1</i>	10 интрон	32	интегральный белок везикул
2	<i>Wisp1</i>	1 интрон	32	сигнальный белок
3	<i>Bmp5</i>	7 интрон	13	сигнальный белок
3	<i>Csmd1</i>	3 интрон	20	сигнальный белок
3	<i>Csmd3</i>	1 интрон 35 интрон	40 9	сигнальный белок

Таблица 1. Окончание

Хромосома	Ген	Район	Число копий	Характеристика белка
3	<i>Grik2</i>	11 интрон	35	глутаматергический белок
3	<i>Msra</i>	6 интрон	25	метионинсульфоксидредуктаза
3	<i>Nrxn1</i>	1 интрон	20	глутаматергический белок
3	<i>Raly1</i>	1 интрон	39	РНК-связывающий белок
3	<i>Sntg2</i>	10 интрон	26	интегральный белок
4	<i>Fhl1</i>	2 интрон	28	интегральный белок
4	<i>Gria3</i>	3' область	33	глутаматергический белок
4	<i>Ppp2r2c</i>	6 интрон	42	мембранная протеаза
4	<i>Sorcs2</i>	3 интрон	13	сигнальный белок
5	<i>Lrrc4c</i>	6 интрон	42	сигнальный белок
6	<i>Gdf10</i>	2 интрон	22, 16	сигнальный белок
6	<i>Zmiz1</i>	2 интрон	8	транскрипционный регулятор
9	<i>Mecom</i>	1 интрон	7	транскрипционный регулятор
15	<i>Tbx1</i>	3 интрон	19	транскрипционный фактор
20	<i>Asip</i>	1 интрон	30, 16	сигнальный белок
22	<i>Nefm</i>	промотор	31	белок цитоскелета нейронов
27	<i>Asic2</i>	2 интрон	19	ионный канал
28	<i>Onecut3</i>	1 интрон	40	транскрипционный фактор
31	<i>Chir-B2</i>	1 интрон	14	сигнальный белок мембраны
31	<i>Chir-B4</i>	1 интрон 2 интрон	15 26	сигнальный белок мембраны
Z	<i>Aldh1a1</i>	1 интрон	19	альдегидная дегидрогеназа
Z	<i>Dnai1</i>	8 интрон	9	компонент моторного белка
Z	<i>Fbxl17</i>	7 интрон	10	регулятор катаболизма
Z	<i>Ptprd</i>	2 интрон 23 интрон	19 20	мембранная тирозиновая фосфотаза
Z	<i>Rab3c</i>	2 интрон	23	малая мембранная ГТФаза
Z	<i>Rasef</i>	1 интрон	21	малая мембранная ГТФаза
Z	<i>Rit2</i>	1 интрон	27	малая мембранная ГТФаза
Z	<i>Rnf165</i>	1 интрон	21	убиквитиновая трансфераза
Z	<i>Rorb</i>	1 интрон 7 интрон	51 30	транскрипционный фактор
Z	<i>Setbp1</i>	2 интрон 3 интрон	27 26	транскрипционный фактор
Z	<i>Sh3gl2</i>	3 интрон	27	транскрипционный регулятор
Z	<i>Trpm3</i>	1 интрон	31	трансмембранный катионный канал

разованию белков разной длины, что особенно важно для регуляции активности трансмембранных рецепторов.

По данным базы данных UNIPROT, продукты более 40% выявленных генов оказались вовлечены во взаимные регуляторные и белок-белковые взаимодействия, а 13 из этих генов образуют общий функциональный кластер. Большая часть генов, содержащих полипуриновые/полипиримидиновые непрерывные последовательности (GGAAA)_n, участвует в синаптической передаче сигнала. Среди таких генов оказались *Grm5*, *Dlgap1*, *Grik1*, *Grik2*, *Gria3*, продукты которых входят в состав глутаматергических синапсов и существенны для синаптической пластичности. Как было показано ранее, эти гены задействованы в обучении и развитии памяти, а для певчих птиц играют существенную роль в обучении пению (Wada et al., 2004). Экспрессия еще трех выявленных нами генов *Lrrc4c*, *Robo2*, *Slit2* также упоминается в литературе в связи с пением и описана в голосовых ядрах мозга у самцов птиц (Lovell et al., 2018). Подавление активности этих генов у самок птиц может быть опосредовано участием транскриптов тандемных повторов (GGAAA)_n, локализованных на половой хромосоме W.

Агрессивное половое поведение самцов *G. gallus*, петухов, непосредственно связано с борьбой за социальное доминирование и является одной из характеристик проявления полового диморфизма у этого вида. При сравнении полученного в ходе анализа списка генов из генома *G. gallus*, несущих в своем составе повторяющийся элемент (GGAAA)_n, с гомологами человека, было выявлено 8 генов, дифференциальная экспрессия которых так или иначе связана с агрессивным поведением. Один из них, а именно *Sorcs2*, был ранее выявлен в ходе скрининга мутаций у пород бойцовых кур, характеризующихся повышенной агрессивностью в поведении петухов (Li et al., 2016). Интересно, что описанная у китайской желтой карликовой породы кур мутация, приводящая к увеличению вероятности реализации альтернативного сайта инициации транскрипции, была локализована в 3-м интроне. Именно в третьем интроне в этом гене в геномной сборке GRCgба локализуется блок тандемных повторов (GGAAA), состоящий из 13 мономеров, который может регулировать реализацию альтернативной транскрипции и увеличивать вероятность продукции более длинного белка с дополнительным интегральным доменом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Функциональные особенности генов, несущих в составе некодирующих регуляторных последовательностей тандемный повтор (GGAAA)_n и различия в их экспрессии у самцов и самок, свидетельствуют о том, что полипуриновые/полипиримидиновые непрерывные последовательности (GGAAA)_n могут участвовать в регуляции активности генов, вовлеченных в дифференцировку пола, развитие признаков полового диморфизма и половое поведение у курицы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Результаты настоящего исследования посвящаются 120-летию со дня рождения выдающегося российского ученого академика Бориса Львовича Астаурова, внесшего существенный вклад в исследование генетики пола. Авторы благодарят Р. В. Четверикову и Е. В. Большакову, выполнявших учебные проекты и внесших вклад в исследование.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование не имеет финансовой поддержки.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования принадлежит А. Ф. Сайфитдиновой. Оба автора участвовали в анализе данных, обсуждении результатов и подготовке рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bellott D.W., Skaletsky H., Cho T.-J. et al. Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators // Nature Genetics. 2017. V. 49. № 387. P. 94.
- Komissarov A.S., Galkina S.A., Koshel E.I. et al. New high copy tandem repeat in the content of the chicken

- W chromosome // *Chromosoma*. 2018. V. 127. № 1. P. 73–83.
- Li Z., Zheng M., Abdalla B.A., Zhang Z. et al. Genome-wide association study of aggressive behaviour in chicken // *Scientific reports*. 2016. V. 6. № . 30981.
- Lovell P.V., Huizinga N.A., Friedrich S.R. The constitutive differential transcriptome of a brain circuit for vocal learning // *BMC Genomics*. 2018. V. 19. № 1.
- Matos-Rodrigues G., Hisey J.A., Nussenzweig A. et al. Detection of alternative DNA structures and its implications for human disease // *Molecular Cell*. 2023. V. 83. № 20. P. 3622–3641.
- Maroteaux L., Heilig R., Dupret D. et al. Repetitive satellite-like sequences are present within or upstream from 3 avian protein-coding genes // *Nucleic Acids Research*. 1983. V. 11. P. 1227–1243.
- Wada K., Sakaguchi H., Jarvis E.D. et al. Differential expression of glutamate receptors in avian neural pathways for learned vocalization // *The Journal of Comparative Neurology*. 2004. V. 476. P. 44–64.
- Zopf D., Dineva B., Betz H., Gundelfinger E.D. Isolation of the chicken middle-molecular weight neurofilament (NF-M) gene and characterization of its promoter // *Nucleic Acids Research*. 1990. V. 18. № 3. P. 521–529.

Participation of Chicken GGAAA Repeat in Sex Differentiation

A. F. Saifitdinova^{1, 2, *}, A. A. Zhukova^{1, 3}

¹Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, 191186 Russia

²St. Petersburg University, St. Petersburg, 199034 Russia

³Saint Petersburg branch of the Russian Federal Research Institute of Fisheries and oceanography, St. Petersburg, 199053 Russia

*e-mail: saifitdinova@mail.ru

Tandem repeating elements that form extended polypurine/polypyrimidine tract sequences have been found in the genomes of various species. Their structural properties bend the DNA helix and cause a transition to non-canonical DNA secondary structures. The modern scientific literature describes many examples of the involvement of such elements in the regulation of gene expression and the formation of alternative transcripts in cells of different types of differentiation (Matos-Rodrigues et al., 2023). Previously, we described the (GGAAA)_n repeating element of chicken (*Gallus gallus domesticus*), which is predominantly localized on the sex chromosome W and makes up about 1% of the female genome (Komissarov et al., 2018). Here we describe the localization peculiarities of this tandem repeat in the chicken genome within autosomes and the sex chromosome Z. The study identified a number of genes carrying tandemly repeated (GGAAA)_n elements within non-coding transcribed regulatory regions that can influence expression intensity and the formation of alternative transcripts. Functional characterization of genes carrying stacks of (GGAAA)_n allowed us to suggest the involvement of these tandem repeats in regulating the differential activity of genes important for the development of sexual dimorphism traits in chicken.

Keywords: chicken, tandem repeats, polypurine/polypyrimidine tract sequences, genome data analysis, sex differentiation

СОМАТИЧЕСКИЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЖИВОТНЫХ: ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАДИГМЫ (ТОЧКА ЗРЕНИЯ СПОНГИОЛОГА)

© 2024 г. А. В. Ересковский

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

e-mail: aereskovsky@gmail.com

Поступила в редакцию 15.10.2024 г.

После доработки 25.11.2024 г.

Принято к публикации 29.11.2024 г.

За последние пять лет существенно изменилась парадигма, в рамках которой научное сообщество рассматривает стволовые клетки животных и само понятие “стволовости”. В соответствии с господствовавшей ранее парадигмой, сформировавшейся в ходе изучения млекопитающих, соматические стволовые клетки (ССК) — крайне малочисленные коммитированные клоноспецифичные клетки; их судьбы ограничены тканями/органами, в которых они находятся. Однако исследования, выполненные на водных беспозвоночных, показали, что ССК, напротив, очень многочисленны, морфологически разнообразны, демонстрируют широкий спектр состояний и уровней “стволовости”. Более того, ССК ряда беспозвоночных могут возникать *de novo* путем трансдифференцировки из дифференцированных соматических клеток. Одну из ключевых ролей в формировании новой парадигмы сыграло изучение представителей типа Porifera. Краткий обзор рассматривает основные положения современной концепции стволовых клеток и роль спонгиологии в формировании новой парадигмы.

Ключевые слова: стволовые клетки, соматические стволовые клетки, Metazoa, базальные Metazoa, губки, архециты

DOI: 10.31857/S0475145024020022, EDN: MDDPAU

ВВЕДЕНИЕ

Если поискать в интернете информацию, используя ключевые слова “somatic stem cells”, то окажется, что соматические стволовые клетки (ССК), они же “adult stem cells” (стволовые клетки взрослых) представляют собой малочисленные популяции недифференцированных клеток в составе дифференцированных органов и тканей. При этом создается впечатление, что в настоящее время изучаются только ССК позвоночных (млекопитающих). Есть ли ССК у других животных и насколько хорошо они изучены? Насколько ССК разных животных похожи (или не похожи) друг на друга? Можно ли объединить ССК всех Metazoa в рамках единой концепции?

Эти вопросы сейчас активно разрабатываются исследователями, работающими в области эволюционной биологии развития и специализирующимися на изучении водных беспозвоночных животных. В число их объектов входят представители как базальных Metazoa (Porifera,

Cnidaria), так и Spiralia (Platyhelminthes, Annelida), и даже хордовых (Tunicata). Все эти таксоны обладают несколькими общими свойствами: способность к бесполому размножению, высокая способность к регенерации, а также часто (но не всегда) наличие колониальных форм.

Данная статья представляет собой точку зрения спонгиолога на происходящее на наших глазах изменение парадигмы ССК. Краткий анализ современного состояния наших знаний о ССК Metazoa и их ниши дается сквозь призму немодельных водных беспозвоночных животных, которые часто остаются вне внимания специалистов по стволовым клеткам. Подобный выход за пределы модельных объектов биологии развития и клеточной биологии способствует изменению наших представлений о стволовых клетках животных. Статья демонстрирует, какую важную роль в изучении стволовых клеток играют базальные в филогенетическом отношении группы животных, в первую очередь губки (тип Porifera), и сколько еще вопросов, касаю-

щихся биологии развития Porifera, остаются пока без ответа. Автором выбраны для анализа фундаментальные обзорные работы, в которых использованы данные, полученные на губках. Именно в этих работах были сформулированы новые идеи и концепции, которые привели к изменению парадигмы ССК. Автор надеется, что его обобщение будет способствовать изменению устоявшихся взглядов коллег на общее представление о стволовых клетках у Metazoa, их происхождение и раннюю эволюцию.

КАК (И ПОЧЕМУ) ИЗМЕНИЛАСЬ КОНЦЕПЦИЯ ССК?

Одна из наиболее масштабных аналитических работ на тему “стволовости” клеток беспозвоночных была выполнена коллективом биологов, занимающихся изучением нормального развития и регенерации водных беспозвоночных. Итогом этой работы стал аналитический обзор, опубликованный журналом *Biological Reviews* (Rinkevich et al., 2022). В первую очередь авторы нарисовали портрет ССК позвоночных. Это тканеспецифичные недифференцированные клетки, которые характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и малыми размерами (по сравнению с дифференцированными потомками). ССК классифицируются по морфологии, тканевому происхождению, пластичности и активности. Находясь в состоянии покоя, они сохраняют способность возобновить пролиферацию. В то время как стволовые клетки ранних эмбрионов тотипотентны (могут давать начало как соматическим клеткам, так и клеткам зародышевой линии), ССК позвоночных — мульти/олиго/унипотентны (Clevers, Watt, 2018). Это клетки, способные к самовозобновлению и многолинейной дифференцировке, часто взаимодействующие со специализированными нишами стволовых клеток. Они считаются клетками с медленным циклом (Moore, Lyle, 2011). Число ССК в ткани или органе, как правило, небольшое. Для ССК характерна экспрессия специфических “генов стволовости” (Grün et al., 2016; Clevers, Watt, 2018; Marescal, Cheeseman, 2020). Основная функция ССК — поддержание тканевого гомеостаза за счет восполнения убыли клеток, связанной с их повреждением или старением.

Можно ли сказать, что получившийся портрет является архетипом ССК всех Metazoa? Ответить на этот вопрос помогают сравнительные исследования (Weissman 2000; Ballarin et al., 2021;

Rinkevich et al., 2022). Если посмотреть на филогенетическое древо Metazoa, станет очевидным, что ССК изучены только у ограниченного числа таксонов. Главным образом это животные, способные к бесполому размножению и/или обладающие высокой способностью к регенерации. Исключение составляют только представители позвоночных и *Drosophila* — модельный объект биологии развития. Таким образом, среди беспозвоночных ССК обнаружены и изучены с разной степенью глубины у кишечнополостных, губок, некоторых Spiralia (Platyhelminthes) и вторичноротых (оболочники, иглокожие) (Rinkevich et al., 2022). Среди Ecdysozoa ССК были обнаружены только у нескольких представителей членистоногих, а у Nematodea, Scalidophora и большинства Panarthropoda они так и не были найдены (Rinkevich et al., 2022).

Чтобы заполнить лакуны в наших знаниях об ССК беспозвоночных, был проведен анализ наличия/отсутствия ССК и свойств ССК у разных животных. Был выполнен меж- и внутри-типовой сравнительный анализ свойств ССК, включая особенности экспрессии генов, клеточного окружения, а также роли ССК в различных биологических процессах (например, в регенерации всего тела) (whole body regeneration).

Оказалось, что ССК позвоночных и других типов животных объединяют только два фундаментальных свойства: способности к самовозобновлению и дифференцировке. Все остальные характеристики ССК разных типов Metazoa могут различаться (рис. 1).

Проведенный сравнительный анализ ССК широкой выборки таксонов беспозвоночных позволил сделать следующие выводы:

- ССК не “обитают” в специальных нишах;
- ССК могут появляться в организме за счет трансдифференцировки других соматических клеток (рис. 1). Они и их потомки необязательно связаны с производными определенных зародышевых листков или тканей;
- ССК дают начало не только клеткам соматических линий, но и клеткам зародышевой линии (а значит, зародышевая линия не всегда обособляется в раннем развитии) (рис. 1).

Многие типы животных имеют свои специфические ССК. Примером могут служить хоанциты и археоциты губок (рис. 1), интерстициальные клетки кишечнополостных из класса Hydrozoa, необласты плоских червей).

Сравнительный анализ также показал, что в пределах каждого из типов Metazoa ситуация с наличием/отсутствием ССК очень разнообразна. ССК могут обладать только некоторые таксоны внутри типа. Например, архециты отсутствуют у губок из класса Calcarea, да и у губок из класса Homoscleromorpha их наличие до сих пор не доказано (Ereskovsky et al., 2024).

У многих беспозвоночных число ССК не сильно отличается от числа дифференцированных клеток организма. Так, эпителиальные ткани могут полностью или частично состоять из ССК, имеющих все отличительные признаки эпителиальных клеток. Наиболее ярким примером являются губки, у которых клетки внутреннего и внешнего эпителия — хоаноциты и пинакоциты соответственно — функционируют в повседневной жизни губки как эпителиальные клетки, но при обновлении тканей и регене-

рации выполняют функции ССК (Lavrov et al., 2018; Skorentseva et al., 2023).

ССК беспозвоночных экспрессируют ортологи многих генов, которые у позвоночных являются признанными маркерами “стволовости” (“stemness”), а также гены, которые вносят вклад в “стволовой потенциал” (“stem cell potential”) раковых клеток (Mashanov et al., 2010; Yun et al., 2017; Ben-Namo et al., 2018; Rinkevich et al., 2022). Однако молекулярные механизмы, помогающие беспозвоночным поддерживать популяции ССК в состоянии стабильной пролиферации, остаются неизученными.

Стволовость ССК не может быть сведена к универсальному для всех Metazoa “молекулярному отпечатку пальца” (molecular fingerprint). Об этом, например, свидетельствует факт коэкспрессии в ССК беспозвоночных генов, характерных для соматических клеток и клеток зародышевой линии. Ортологи генов *POU*, *SOX*,

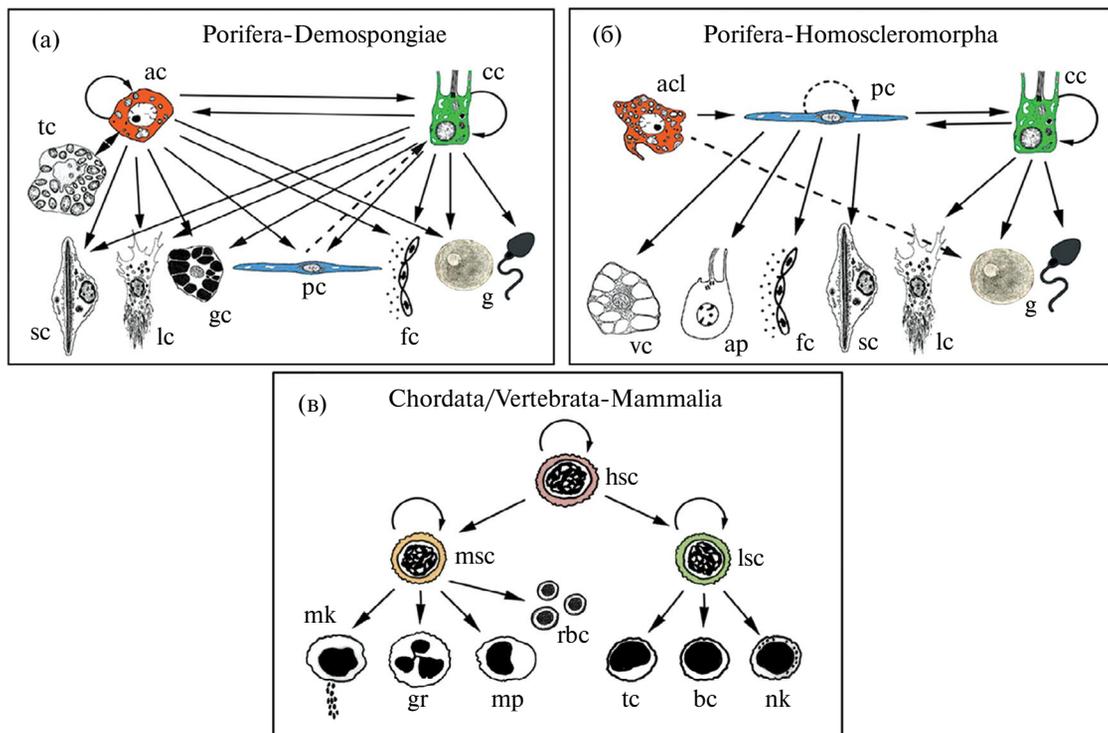


Рис. 1. Пластичность соматических стволовых клеток животных (соматические стволовые клетки = стволовые клетки взрослых (adult stem cells) = ASC). ASC выделены цветом, продукты дифференциации показаны черно-белыми схемами. (а, б) Представители губок: (а) *Amphimedon queenslandica*, *Ephydatia fluviatilis*; (б) *Oscarella lobularis* (ac — архецит, cc — хоаноцит, tc — тессоцит, sc — склероцит, lc — лофоциты, gc — гранулярные клетки, pc — пинакоциты, fc — фолликулярные клетки, g — гаметы, vc — вакуолярные клетки, ар — апопилярные клетки). (с) Млекопитающие (для сравнения) (hsc — гематопоэтические стволовые клетки, msc — миелоидные предшественники, lsc — лимфоидные предшественники, mk — мегакариоцит, gr — гранулоциты, mp — макрофаги, rbc — красные кровяные клетки, tc — Т-клетки, bc — В-клетки, nk — лимфоциты-киллеры). Для губок характерно превращение одного типа ASC в другой, а также дифференцировка гамет из потомков ASC. (Из Rinkevich et al., 2022, с изменениями; © 2021 The Authors, опубликовано John Wiley & Sons Ltd. под лицензией CC-BY-4.0.)

Piwi, *Bruno*, *Vasa* и *Pl10* экспрессируются в ССК многих беспозвоночных (Rinkevich et al., 2022). Тотипотентность ССК беспозвоночных обеспечивает такие функции организма, как гаметогенез, эмбриогенез, гомеостаз, бесполое размножение и регенерация. В отличие от позвоночных, у беспозвоночных маркеры стволовости соматических клеток и клеток зародышевой линии (таких как *Vasa*, *Pl10*, *Piwi*, *Nanos*, *Bruno*, *Pumilio*, *Tudor* и т.д.) коэкспрессируются в дифференцированных соматических клетках разных тканей (Rinkevich et al., 2022). Это может означать, что функции этих генов различаются у позвоночных и беспозвоночных животных либо то, что эти гены плеiotропны. С другой стороны, это может свидетельствовать о том, что общепринятое представление о специфических “генах стволовых клеток” должно быть пересмотрено.

Многие из признаков, используемых для идентификации ССК позвоночных, связаны с их функциями. В первую очередь это касается поддержания клеточных линий, замены поврежденных / “изношенных” клеток, поставкой дифференцированных клеток для поддержания постоянного состава тканей. Напротив, ССК многих беспозвоночных, помимо поддержания гомеостаза, могут играть важную роль в поддержании ключевых биологических функций, таких как регенерация (включая регенерацию всего тела и бесполое размножение), почкование и деление, а также регуляцию состояний покоя или анабиоза (Rinkevich et al., 2022).

Таким образом, ССК многих беспозвоночных обладают модифицированным и диверсифицированным репертуаром функций по сравнению с ССК позвоночных. Очевидно, что не все упомянутые в обзоре Rinkevich et al., (2022) характеристики ССК являются общими для всех типов животных. Важным выводом этой статьи является то, что ССК позвоночных на самом деле уникальные (специфичные для позвоночных), а не типичные для Metazoa.

Для того чтобы получить всестороннее представление об уровне разнообразия свойств ССК, необходимы обширные дополнительные исследования. Однако даже имеющихся данных оказалось достаточно для того, чтобы появилась оригинальная модель, иллюстрирующая разнообразие свойств ССК у Metazoa (рис. 2а) (Rinkevich et al., 2022). При создании этой модели авторы соединили два известных графиче-

ческих объекта: лестницу Пенроуза (рис. 2б) (Penrose, Penrose, 1958) и эпигенетический ландшафт Уоддингтона (рис. 2в) (Waddington, 1957). Эпигенетический ландшафт — традиционная метафора, которую используют, чтобы наглядно показать траектории дифференцировки клеток или пластичность траекторий развития. Ключевой момент ландшафта Уоддингтона — наличие точек выбора между траекториями развития или дифференцировки (рис. 2в). Лестница Пенроуза имеет такую конструкцию, что при движении в одном направлении объект будет бесконечно подниматься, а при движении в обратном — спускаться. При этом объект движется фактически по кругу, постоянно оказываясь в одной и той же точке (рис. 2б). Трехмерность лестницы Пенроуза в сочетании с возможностью выбора траектории дифференцировки дала трехмерное пространство “колеблющегося ландшафта Пенроуза” (“wobbling Penrose landscape”) (рис. 2а) (Rinkevich et al., 2022). Этот ландшафт представляет собой метафору доступных для ССК состояний и путей между ними. Тотипотентные ССК перемещаются в пределах верхнего темно-синего уровня (“лестницы стволовости Пенроуза”), оставаясь в тотипотентном состоянии (рис. 2а). ССК также могут выбирать траектории и перемещаться с верхнего на более низкие уровни — от тотипотентного к дифференцированному состоянию. Клетки могут изменить свой статус стволовости из любого начального состояния — они могут как спуститься ниже, так и подняться выше, вплоть до возврата на уровень тотипотентности (рис. 2а). Ландшафт Пенроуза хорошо иллюстрирует тот факт, что ССК позвоночных представляют собой только один из возможных типов ССК — те ССК, которые сильно ограничены в своих перемещениях по ландшафту.

ГДЕ ОБИТАЮТ СОМАТИЧЕСКИЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ?

Традиционно считается, что многие ССК населяют межклеточные компартменты в дифференцированных тканях, называемые нишами стволовых клеток (НСК) (Cheung, Rando, 2013). НСК обеспечивают специфическое микроокружение, регулирующее выживание и пролиферацию популяции ССК.

В наших знаниях о клеточном, молекулярном и системном уровнях организации НСК имеются серьезные пробелы, такие же, как и в знаниях об ССК. Взаимодействия клеток внутри

НСК были охарактеризованы на молекулярном уровне лишь в единичных случаях, и в основном на позвоночных животных (Li, Xie, 2005). По-видимому, может существовать несколько подтипов НСК (например, простые ниши, сложные ниши, ниши хранения), каждый из которых характеризуется специфической морфологией, особенностями межклеточных взаимодействий и клеточного цикла. Единой концепции, обобщающей данные об НСК всех Metazoa, в настоящее время не существует.

Широкий сравнительный анализ информации, имеющейся по ССК водных беспозвоночных и позвоночных животных, впервые был проведен в обзоре Martinez et al. (2022). Благодаря взгляду через призму “немодельных” видов водных беспозвоночных авторам удалось сформулировать новую парадигму ниши соматических стволовых клеток у животных.

Анализ особенностей ССК модельных организмов, таких как позвоночные, позволил авторам выявить некоторые общие свойства и осо-

бенности структуры НСК (рис. 3). Выделены четыре группы свойств ниши, которые связаны со всеми ее функциями: (1) структурная поддержка ССК; (2) трофическая поддержка ССК; (3) поддержка ССК за счет топографической информации; (4) поддержка ССК за счет физиологических сигналов. Таким образом, у Metazoa НСК — это специфическая группа клеток в определенном месте дифференцированной ткани, предназначенная для поддержания популяции стволовых клеток. Структура ниши может меняться от организма к организму, и формирование ее среды может обеспечиваться различными типами клеток и регуляторных молекул.

В отличие от НСК позвоночных и представителей Ecdysozoa (*Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*), НСК “немодельных” наземных и водных беспозвоночных изучены гораздо хуже. Тем не менее имеющиеся данные позволяют провести сравнительные исследования. В работе Martinez et al. (2022) основными объектами сравнительного анализа НСК послужили

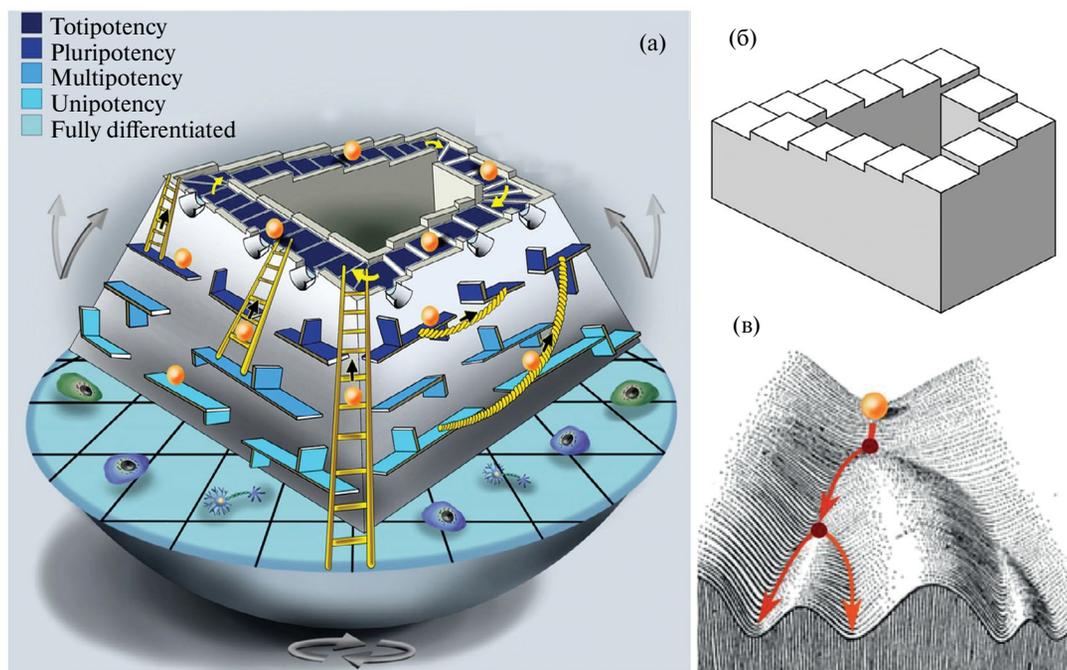


Рис. 2. Графическая метафора новой концепции соматических стволовых клеток. (а) “Колесблюющийся ландшафт Пенроуза”, созданный авторами статьи Rinkevich et al. (2022). Цветовым кодом (от темно-синего до светло-голубого) показаны состояния клеток (от тотипотентного до полностью дифференцированного). Обратите внимание, что клетка (оранжевый шарик) может как “упасть” на нижний светло-голубой уровень из воронки, так и вернуться на верхний темно-синий уровень с помощью одной или нескольких лестниц или канатов (из Rinkevich et al., 2022; © 2021 The Authors, опубликовано John Wiley & Sons Ltd. под лицензией CC BY4.0). (б) Лестница Пенроуза, один из его “невозможных объектов” (Penrose L. S., Penrose R., 1958) (изображение с веб-сайта https://en.wikipedia.org/wiki/Penrose_stairs). (в) Ландшафт Уоддингтона применительно к дифференцировке клетки (оранжевый шарик); оранжевыми стрелками показаны траектории дифференцировки, коричневыми кружками — точки бифуркации (выбора траектории) (адаптировано из Waddington C. H. © (1957) George Allen and Unwin (London)).

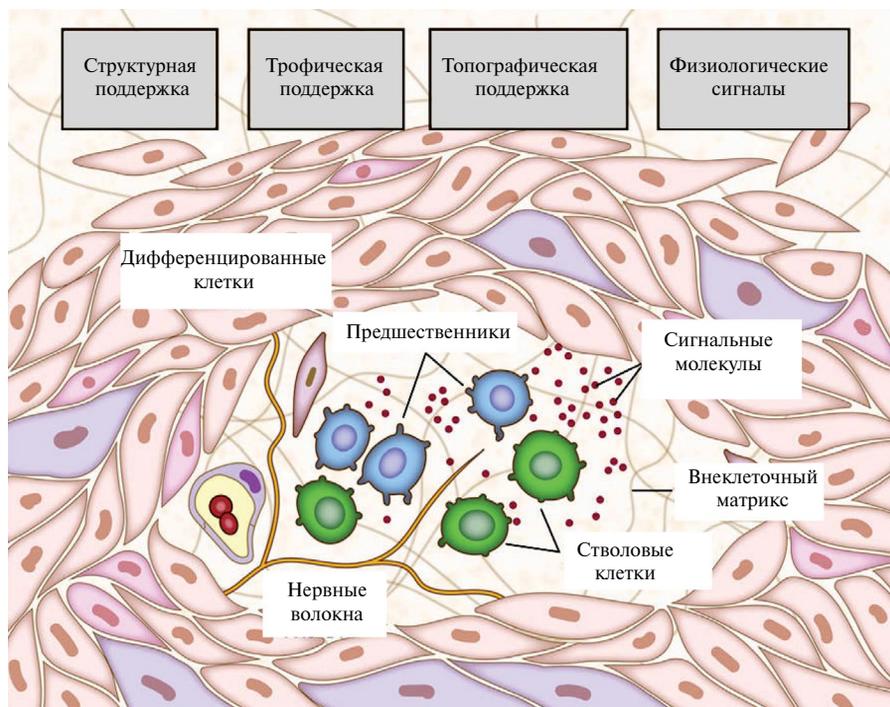


Рис. 3. Обобщение данных о структуре и свойствах ниши стволовых клеток (НСК) у модельных организмов. Представлены наиболее важные базовые структуры, которые, как предполагается, определяют НСК. Вверху перечислены четыре физиологических свойства, связанных с функциональностью ниши. Далее показаны различные компоненты ниши, связанные с активностью НСК: различные клетки, сигнальные молекулы и внеклеточный матрикс (из Martinez et al., 2022, с изменениями; © 2022 The Authors, опубликовано BMC Biology под лицензией CC-BY-4.0).

представители типов Cnidaria, Platyhelminthes, Acoelomorpha, Tunicata. У них с разной степенью подробности описаны те области тела, где популяции предполагаемых ССК поддерживаются и активируются во время регенерации, почкования и гомеостаза. Однако о citoархитектуре этих предполагаемых НСК и взаимодействиях резидентных ССК между собой и с окружающими их клетками известно очень мало. Оказалось, что термин “ниша стволовых клеток” часто используется в отношении предполагаемых НСК без достаточных оснований, особенно в тех случаях, когда о биологии ССК и их локализации в теле животного известно очень мало (как, например, у Porifera, Anthozoa (Cnidaria), Stenophora, Annelida (*Capitella teleta*)) (Martinez et al., 2022).

В результате сравнительного анализа НСК разных животных авторы предложили три типа организации ниши стволовых клеток: А, В, С (рис. 4). Несмотря на то что эти три типа ниш имеют специфические признаки (авторами выделено 12 таких признаков), это не означает, что все существующие ниши должны быть “втиснуты” в данную классификацию. Поскольку при-

знаки архитектуры НСК являются результатом естественного отбора, то в реальности возможны различные комбинации и промежуточные варианты признаков, характерных для того или иного типа выделенной авторами ниши.

Архитектура типа “А” (отсутствие очевидной ниши) (рис. 4а, б). Такой вариант характерен для животных, у которых нет структурированных НСК. Для них типичен высокопластичный набор ССК, т.е. ССК появляются по мере необходимости (например, мезенхимальные архециты демоспонгий). Кроме того, каждая стволовая клетка создает свою собственную микросреду, заменяющую оформленную нишу.

Архитектура типа “В” характерна для животных, группы ССК которых распределены по всему телу (равномерно или неравномерно) и не демонстрируют регионально-специфичной экспрессии генов (рис. 4в, г). У животных, имеющих ниши типа “В”, НСК представляют собой либо отдельный орган или ткань (как у *Hydra*), либо нишей является все животное (как в случае Platyhelminthes). К нише типа “В” также можно отнести и хоаноциты губок, поскольку сам

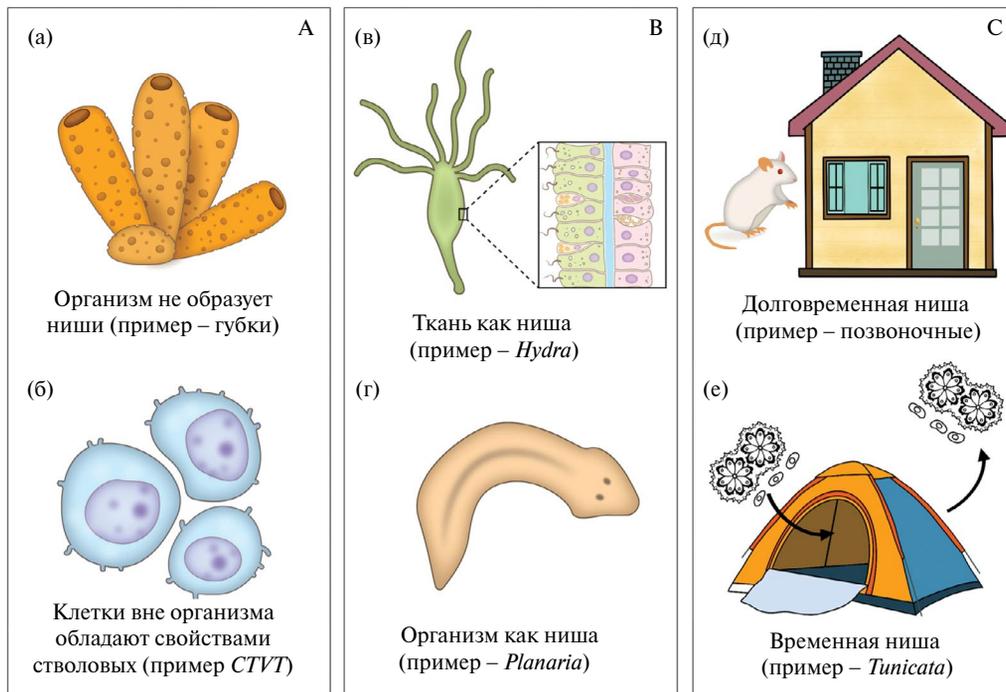


Рис. 4. Концептуальная схема, представляющая три различных типа архитектуры ниши стволовых клеток у многоклеточных животных. (а, б), (в, г) и (д, е) относятся к трем структурным состояниям (А, В и С), выделенным для описания постепенно усложняющейся архитектуры ниш и их локализации в теле животного. СТ VT — трансмиссивная венерическая опухоль собак (из Martinez et al., 2022, с изменениями; © 2022 The Authors, опубликовано BMC Biology под лицензией CC-BY-4.0).

по себе эпителий — хоанодерма — у различных групп губок является микроокружением, поддерживающим пролиферацию и дифференцировку хоаноцитов. Таким образом, представители различных классов одного типа (например, *Porifera*) могут иметь либо НСК одного из двух типов — “А” или “В”, либо оба типа НСК — “А” и “В” внутри одного организма.

Архитектура типа “С” описана для тех животных, которые обладают пространственно ограниченными (и богатыми межклеточными взаимодействиями) нишами ССК (рис. 4д, е). В первую очередь такой тип архитектуры характерен для млекопитающих и насекомых, а также, возможно, для некоторых видов оболочников (*Tunicata*). В этих случаях пространственно ограниченные ниши ССК, состав их клеток и внеклеточного матрикса являются ключевыми факторами для обеспечения как поддержания статуса стволовости клеток, так и регуляции их дифференцировки.

Благодаря проведенному анализу становится очевидно, что ниши стволовых клеток у многоклеточных животных характеризуются гораздо

большим разнообразием вариантов структурной организации и свойств, чем это представлялось на основе исследования лишь модельных для биологии развития организмов. Однако для лучшего понимания свойств этих ниш необходимы дальнейшие тщательные исследования комплекса параметров НСК: (а) четкая идентификация резидентных стволовых клеток; (б) подробная карта клеточных компонентов и внеклеточного матрикса; (в) доказательства молекулярных взаимодействий между стволовыми клетками и компонентами их внешней среды; (г) функциональные исследования. Без интегративного анализа всех параметров ниши выделение любого нового типа НСК будет оставаться спекулятивным, в какой бы биологической системе он ни изучался.

ЧТО ТАКОЕ АРХЕОЦИТЫ У ГУБОК? НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА СТАРУЮ ПРОБЛЕМУ

История изучения археоцитов губок — хороший пример того, как детальное изучение репрезентативной выборки модельных объектов может привести к пересмотру привычных пред-

ставлений о стволовых клетках. Традиционно считалось, что все представители типа Porifera (губки), вне зависимости от их таксономического положения и анатомической структуры, в качестве основной линии ССК имеют архециты. С недавних времен дополнительной группой плюрипотентных клеток также стали признавать хоаноциты (Funayama, 2018).

Архециты часто занимают центральное место в дискуссиях по цитологии, физиологии, гаметогенезу, регенерации и биологии развития губок (Simpson, 1984; Funayama, 2018; Sogabe et al., 2019; Nakanishi & Jacobs, 2020; Ereskovsky et al., 2021).

Страстные споры вокруг архецитов не утихают уже более века. Одни исследователи подвергали сомнению само существование этого типа клеток (Ефремова, 1972; Короткова, 1981), другие считали их тотипотентными клетками (Alié et al., 2015). Одни авторы считают, что архециты присутствуют только в одном классе губок — Demospongiae (Ereskovsky, 2019), другие утверждают, что они характерны для всего типа (Simpson, 1984). Предполагаемые функции архецитов варьируют от фагоцитоза и переноса пищевых частиц по телу губки до их участия практически во всех физиологических процессах, включая иммунный ответ и размножение (Simpson, 1984). При этом, как это ни парадоксально, ни одно специальное сравнительное исследование не было посвящено всестороннему анализу архецитов.

Учитывая, что губки занимают базальное филогенетическое положение, всесторонний анализ этих полиморфных и многофункциональных клеток необходим для лучшего понимания происхождения и эволюции типов клеток, ССК и самой стволовости, процессов дифференцировки и трансдифференцировки, происхождения и эволюции мезенхимально-эпителиального перехода и ряда других аспектов регенеративной биологии Metazoa.

Исследователи первой половины 20-го столетия считали архециты многофункциональными клетками с большими потенциями. Несмотря на технические ограничения, исследователи дали морфологические описания и выделили разные аспекты биологии архецитов (Simpson, 1984). Эти пионерские исследования сформировали концепцию архецитов и влияли на трактовку клеточной биологии губок на протяжении более столетия. Некоторые вопросы, заданные

ранними исследователями архецитов, актуальны и сегодня.

В 2024 году вышел аналитический обзор, авторы которого поставили перед собой цель понять природу и функции архецитов у губок (Ereskovsky et al., 2024). Для этого они попытались ответить на следующие вопросы: присутствуют ли архециты во всех таксонах губок; каковы их морфологические, функциональные и молекулярные отличительные особенности; являются ли архециты тотипотентными или плюрипотентными клетками; и представляют ли архециты один клеточный тип или искусственную смесь нескольких типов клеток?

Ответить на эти вопросы авторам помог глубокий анализ литературных и собственных данных. Были проанализированы публикации по представителям всех четырех классов губок (Demospongiae, Hexactinellida, Homoscleromorpha, Calcarea), что позволило выявить сходные и различающиеся черты у амебоидных (archaeocyte-like) клеток мезохила разных губок. Сопоставление проводилось по их морфологии, функциям, молекулярным характеристикам, участию в гаметогенезе, половом и бесполом размножении, регенерации и гомеостазе тканей.

Традиционно типы клеток определяются в соответствии с их фенотипами, которые обычно отражают специализированные функции этих клеток (Arendt et al., 2016; Wagner, 2019). Морфология клеток на гистологическом и ультраструктурном уровнях также служит основой для определения типа клеток. Сегодня — как и в начале XX века — архециты выделяются в основном на основе морфологии. Однако морфологические характеристики этих клеток весьма общие: это амебоидные клетки, рассеянные по мезохилу, с крупными ядрами, содержащими ядрышки, хорошо развитым ЭПР и многочисленными неспецифическими включениями. Фактически архециты характеризуются скорее отсутствием, чем наличием каких-либо особых признаков на морфологическом уровне (рис. 5). Это затрудняет выделение архецитов как отдельного типа клеток, а также может привести к ошибочной идентификации других клеток в качестве архецитов.

Соответствующая морфологически определенная популяция клеток (архециты в широком смысле) состоит из многофункциональных клеток: они участвуют в пищеварении и иммунной

защите, содержат симбионтов и дают начало различным типам клеток во время полового и бесполого размножения, регенерации и поддержания гомеостаза тканей. Однако неясно, действительно ли все эти клетки следует считать археоцитами, основываясь исключительно на их морфологии. Центральной идеей концепции археоцитов с момента ее возникновения (Minchin, 1900) является

предполагаемая плюрипотентность археоцитов и их активность как ССК. По крайней мере, некоторые клетки популяции археоцитоподобных клеток проявляют активность, подобную ССК. Но, в отличие от ранних исследований, которые описывали археоциты как имеющие почти неограниченные потенции, современные работы показывают двухкомпонентную систему стволо-

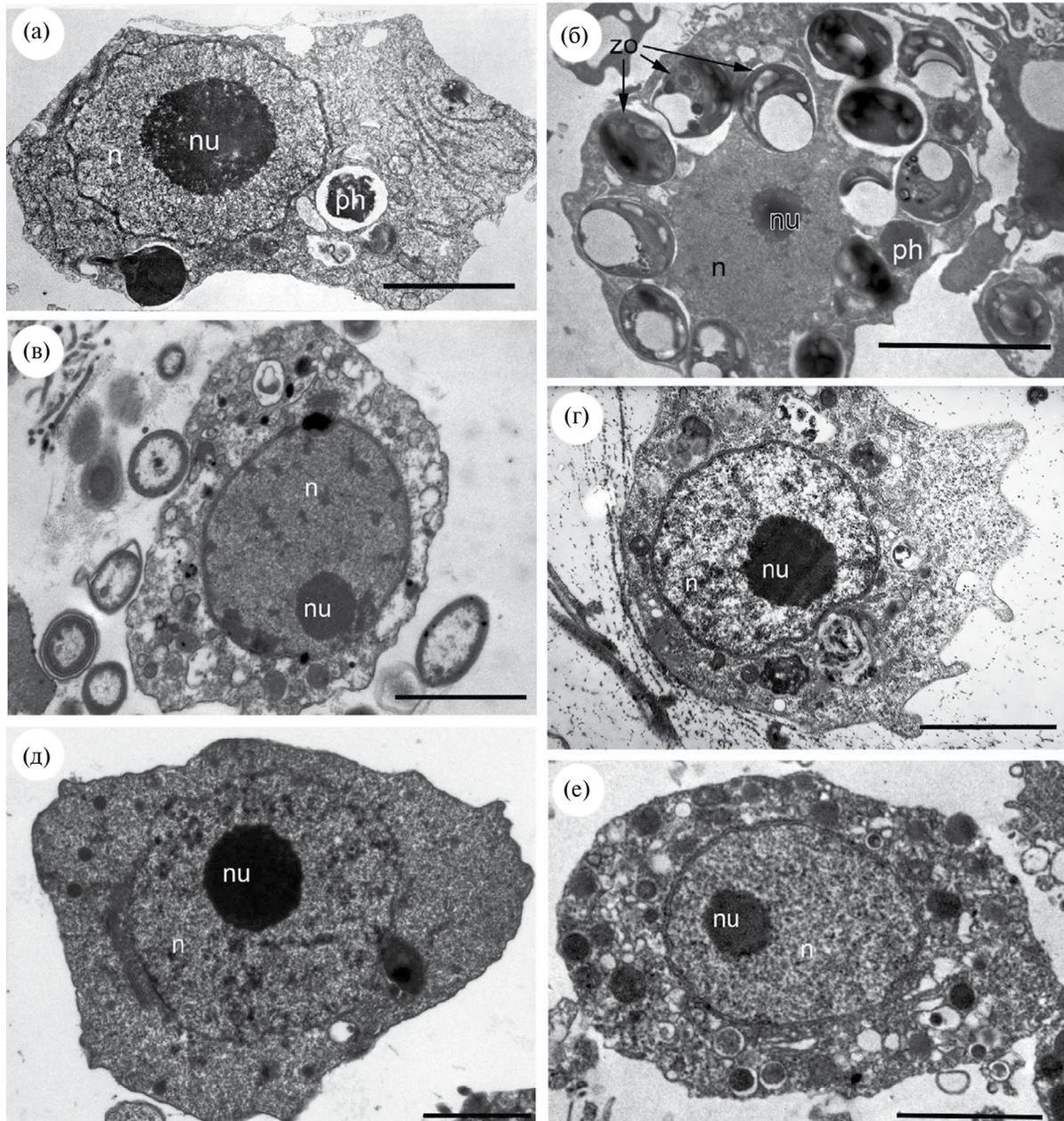


Рис. 5. Археоциты разных демоспонгий (данные трансмиссионной электронной микроскопии. (а) *Ephydatia muelleri* (отряд Spongillida); (б) *Lubomirskia baicalensis* (отряд Spongillida); (в) *Spongia officinalis* (отряд Ductyceratida); (г) *Halisarca dujardinii* (отряд Chondrillida); (д) *Crellomima imparides* (отряд Poecilosclerida); (е) *Suberites domuncula* (отряд Suberitida). n — ядро; nu — ядрышко; ph — фагосома; zo — эндосимбиотическая зоохлорелла. Масштабные линейки: а, в–е = 2 мкм; б = 5 мкм (из Ereskovsky et al., 2024; разрешение на воспроизведение рисунка получено от John Wiley and Sons, License Number 5916501382860).

вых клеток губок, состоящую из археоцитов и хоаноцитов (Funayama, 2018; Melnikov et al., 2022).

Ситуация с молекулярными характеристиками археоцитов не лучше. Нет известных генов с археоцит-специфической экспрессией (за возможным исключением *EfMsi2* у *Ephydatia fluviatilis* (Okamoto et al., 2012), но это еще предстоит подтвердить для других демоспонгий). Данные секвенирования РНК отдельных клеток (scRNA-seq) ограничены двумя видами (пресноводная *Spongilla lacustris* и морская *Amphimedon queenslandica*), и в обоих случаях было реконструировано несколько кластеров археоцитоподобных клеток (Sebé-Pedros et al., 2018; Musser et al., 2021). Мы пока не знаем, как эти кластеры амeboидных клеток мезохила соотносятся с археоцитами.

Данные по пресноводным губкам указывают на возможное разделение между предполагаемыми ССК и клетками с соматическими функциями. Методом гибридизации *in situ* у *E. fluviatilis* археоцитоподобные клетки, экспрессирующие *EfLectin* (который может быть вовлечен во врожденный иммунитет), были отделены от предполагаемой популяции “настоящих” археоцитов, которые экспрессируют *EfPiwiA*, как и полагается ССК (Funayama et al., 2005, 2010). По данным scRNA-seq, полученным для *S. lacustris*, кластер предполагаемых популяций ССК-археоцитов можно четко отделить от морфологически схожих кластеров мезоцитов (т.е. клеток мезохила) с пока неизвестными функциями (Musser et al., 2021).

В целом создается впечатление, что термин “археоцит” применялся к различным категориям амeboидных клеток мезохила демоспонгий. Все эти клетки соответствуют “классическим” морфологическим описаниям археоцитов, например, имеют везикулярное ядро с выраженным ядрышком, фагосомы и т.д. То есть мы имеем в данном случае пример фетишизации термина, которая приводит к тому, что термин заслоняет понятие, встает над ним.

Авторы обзора Ereskovsky et al. (2024) пришли к выводу, что неконтролируемое использование термина “археоцит” может привести к нежелательному расширению и размыванию характеристик самого понятия “тип клеток” (поскольку под этот термин подпадают разные клетки) или маскировке механизмов анализируемых процессов. Например, достоверно показано, что выраженный вклад в восстановительные процессы губок вносят различные дедифференцирующиеся

клетки, а не “археоциты” (Ereskovsky et al., 2024). Поэтому представляется разумным ограничить использование термина “археоцит” только для тех случаев, когда можно детально охарактеризовать клетку (с помощью специфических маркеров, экспериментов по отслеживанию клеток и т.д.) или, по крайней мере, предположить, что она является стволовой клеткой.

На основе проведенного анализа авторы сделали следующие выводы. Археоциты не универсальны для типа Porifera. Они присутствуют только у губок класса Demospongiae. Губки классов Calcarea и Homoscleromorpha лишены клеток мезохила, которые морфологически и функционально достаточно сходных с археоцитами, чтобы считать их гомологичными. Симпластические стеклянные губки (класс Hexactinellida) имеют скопления неподвижных археоцитов, но их гомология с археоцитами демоспонгий в настоящее время неясна.

Даже у Demospongiae четко выделить и охарактеризовать определенную клеточную популяцию, соответствующую археоцитам, очень сложно. Этому мешают нечеткие морфологические характеристики и отсутствие у археоцитов каких-то особых специфических признаков. Молекулярная характеристика археоцитов только начинает развиваться. Несмотря на то что до сих пор нет четкого мнения об однородности/гетерогенности археоцитоподобных клеток, выделяемых на основе морфологии, имеющиеся данные говорят в пользу сценария их гетерогенности.

Стволовость всегда занимала центральное место в концепции археоцитов. Однако, в отличие от ранних взглядов на них как на клетки с почти неограниченными потенциями, современные данные подтверждают существование двухкомпонентной системы стволовых клеток, состоящей из археоцитов и хоаноцитов (Funayama, 2018; Melnikov et al., 2022). Наиболее последовательные данные о функции археоцитов как стволовых клеток получены при изучении развивающихся геммул пресноводных губок: в этой системе археоциты действительно представляют собой активные стволовые клетки (Alie et al., 2015). Однако в тканях взрослых демоспонгий археоциты могут не играть столь заметную роль, как ССК, отдавая приоритет хоаноцитам.

Клетки с морфологией археоцитов (archaeocytes *sensu lato*) активно участвуют в цикле пищеварения и иммунной защите, представляя

собой макрофаги демоспонгий. К таким клеткам не следует применять термин “археоцит”, поскольку он изначально тесно связан с представлением о стволовости. Кажется разумным ограничить использование термина “археоцит” только случаями, когда доказано или по крайней мере предполагается, что клетка является стволовой. В исследованиях амебоидных клеток мезохила, которые не касаются стволовости, предпочтительным является более нейтральный термин “ядрышковые амебоциты”.

По палеонтологическим данным предковые губки представляли собой тонкостенные организмы. Их мезохил, вероятно, не содержал отдельной популяции ССК. Можно предположить, что плюрипотентными свойствами обладали эпителиоподобные популяции хоаноцитов и пинакоцитов. Последующее увеличение числа и роли ядрышковых амебоцитов (и/или археоцитов) произошло только у Demospongiae, поскольку эволюция у этой линии губок была связана с увеличением объема мезохила.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИМБИОНТЫ

Одним из необычных и пока мало изученных явлений является присутствие в ССК некоторых беспозвоночных внутриклеточных симбионтов. Это явление абсолютно несовместимо с традиционными представлениями о стволовых клетках животных. В обзоре Ereskovsky et al., (2022) представлены данные по ССК и их внутриклеточным симбионтам у губок, а также приведено несколько примеров из других групп животных.

Согласно последним исследованиям, у губок существует как минимум четыре типа плюрипотентных ССК: археоциты и хоаноциты (рис. 1а, б), а также пинакоциты и особые амебоидные вакуолярные клетки (Ereskovsky et al., 2024; Fierro-Constain et al., 2017; Funayama, 2018; Lavrov et al., 2018). Однако сейчас мы уделим внимание археоцитам, поскольку внутриклеточные эукариотические симбионты встречаются только в этих ССК и только у одного класса губок — Demospongiae. Как указывалось в предыдущем разделе, археоциты проявляют высокий полиморфизм и полифункциональность. Примечательно, что у археоцитов Demospongiae есть еще одна необычная особенность: наличие внутриклеточных фотосинтезирующих симбионтов (рис. 5б, археоциты с симбионтами). Археоциты пресноводных губок содержат од-

ноклеточные водоросли Chlorophyta из классов Trebouxiophyceae и Chlorophyceae, а также Ochrophyta из класса Eustigmatophytacea. Археоциты некоторых морских демоспонгий включают в себя динофлагеллят *Symbiodinium* spp. (Zooxanthella). Археоциты обычно содержат от 3 до 12 клеток симбионтов. В то же время эндосимбиоз археоцитов и фотосинтезирующих водорослей является факультативным: представители одного и того же вида, обитающие в разных световых условиях, могут содержать симбионтов или не иметь их совсем, как, например, в затемненных местообитаниях (Gaino et al., 2003).

Были проведены эксперименты по заселению симбионтами молодых апосимбиотических губок *Ephydatia muelleri*. Уже через 4 часа после вылупления из геммул археоциты включали эти симбиотические водоросли (Hall et al., 2021). При половом размножении передача симбионтов происходит горизонтально, то есть из внешней среды. Однако при бесполом размножении за счет фрагментации или геммулогенеза передача симбионтов может сочетать как вертикальный перенос, так и горизонтальный.

Роль эндосимбионтов в физиологии губок активно исследуется, но, к сожалению, совершенно неизвестно, оказывают ли эти фотосинтезирующие симбионты какое-либо влияние на проявление или ингибирование “стволовости” археоцитов.

Интересно, что прокариотические эндосимбионты никогда не обитают в археоцитах или других плюрипотентных клетках губок. Для этого имеются специальные дифференцированные клетки — бактериоциты (Ereskovsky, Lavrov, 2021).

В отличие от демоспонгий, у других многоклеточных животных эндосимбионты в ССК встречаются редко. Тем не менее имеется несколько хорошо документированных примеров, которые свидетельствуют о важности ССК в координации и поддержании внутриклеточного симбиоза. Примеры включают глубоководных вестиментифер (Polychaeta), у которых симбиотические бактерии обитают в бактериоцитах. Эти клетки, расположенные в специальном органе — трофосоме, считаются тканеспецифическими монопотентными стволовыми клетками (Pflugfelder et al., 2009). У *Hydra* (Cnidaria) клоны эпителиальных стволовых клеток (но не интерстициальные клетки) формируют микробные внутриклеточные сообщества (Fraune et al., 2009). У ветвя-

щихся кораллов *Stylophora pistillata* клетки эндодермы, содержащие водоросли, демонстрируют признаки стволовости. Они экспрессируют гены “стволовости”, такие как *nanos* и *tudor*, а также гены, продукты которых важны для регуляции клеточного цикла (Levy et al., 2021).

Имеются примеры участия ССК насекомых в поддержании или контроле популяции внутриклеточных симбионтов. На ранних стадиях развития тлей *Acyrtosiphon pisum* и *Megoura viciae*, а также таракана *Periplaneta americana* бактериоциты появляются *de novo* из апосимбиотических ССК. У *P. americana* наблюдали также постэмбриональную пролиферацию бактериоцитов. Внутриклеточные симбионты *Wolbachia* — не единственные цитосимбиотические бактерии в стволовых клетках насекомых. Клетки половой линии также могут быть колонизированы другими микроорганизмами, такими как грамположительная бактерия *Spiroplasma* у дрозофилы (Hackett et al., 1986) или граммотрицательная бактерия *Arsenophonus*, которая заражает симбионта *Sulcia* цикадки *Macrostelus laevis* (Kobiałka et al., 2016).

До сих пор неизвестны механизмы, обеспечивающие специфическое поведение ССК в таких своеобразных симбиозах. Имеется несколько примеров такого поведения ССК. (1) Непрерывная пролиферация унипотентных бактериоцитов у некоторых кольчатых червей, связанная с образованием новых бактериоцитов. (2) Поддержание симбиоза во время непрерывного образования бактериоцитов из апосимбиотических необластов у плоских червей. (3) Формирование микробных внутриклеточных сообществ эпителиальными стволовыми клетками *Hydra*. Исследование особенностей функционирования стволовых клеток в этих симбиозах представляет интерес для более глубокого понимания природы ССК Metazoa. Очень полезно взглянуть на ССК беспозвоночных как на клетки, способные к установлению и поддержанию внутриклеточных симбиозов. Это расширяет наше представление о разнообразии ССК, сформировавшихся в ходе диверсификации многоклеточных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ появившихся за последнее время работ (в том числе фундаментальных обзорных статей), касающихся изменения парадигмы стволовых клеток Metazoa и основанных на из-

учении беспозвоночных животных, позволяет сделать следующие выводы.

1. В очередной раз было показано, что исследователям не стоит фокусироваться исключительно на позвоночных животных и/или использовать лишь хорошо разработанные модельные объекты. Такой односторонний подход приводит к некорректной экстраполяции данных биологии развития и клеточной биологии, полученных для конкретной филогенетической группы, на всех Metazoa.

2. Необходимо использовать в исследованиях широкий спектр объектов из филогенетически удаленных ветвей Metazoa, обитающих в разных экологических условиях. По возможности в выборку должны входить водные (морские и пресноводные), наземные и паразитические (эндо- и эктопаразитические) представители каждой ветви.

3. Особое значение приобретают данные, полученные на базальных в филогенетическом отношении животных, особенно таких, как губки (тип Porifera). Результаты, полученные на них, дают важнейший материал для понимания возникновения и ранних этапов эволюции клеточной стволовости, плюрипотентных клеток (стволовых клеток), их ниш, а также клеточных типов.

4. Именно данные, полученные на низших Metazoa, демонстрируют пластичность стволовых клеток, широкий спектр их потенциалов и их мультифункциональность. Кроме того, они выявляют способность дифференцированных клеток с определенными функциями и морфологией дедифференцироваться и изменять статус стволовости.

5. Новые данные, полученные на низших многоклеточных животных, показывают, что, несмотря на впечатляющий прогресс в исследовании стволовых клеток у позвоночных, нам по-прежнему очень мало известно о стволовых клетках беспозвоночных. Поэтому мы все еще не можем с уверенностью реконструировать происхождение и ранние этапы эволюции стволовых клеток.

6. В очередной раз показано, что применение к базальным Metazoa терминов и понятий, сформулированных для относительно молодых филогенетических групп, методологически некорректно. Такой подход создает реальные проблемы как при планировании исследований, так

и при интерпретации полученных данных. Термин в науке является таким же точным и важным инструментом, как прибор новейшей генерации или новый химический реagent. Терминологическая путаница может привести не только к взаимному непониманию специалистов, работающих в одной области, но на разных объектах, но и к неверной интерпретации полученных результатов. Это было убедительно показано в работах, посвященных археоциатам губок.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор приносит глубокую благодарность Ю.А. Краус (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН) за конструктивные замечания и помощь в написании статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда грант № 24-14-00452.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии какого-либо конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ефремова С.М.* 1972. Морфофизиологический анализ развития пресноводных губок *Ephydatia fluviatilis* и *Spongilla lacustris* из диссоциированных клеток // Бесполое размножение, соматический эмбриогенез и регенерация. Ред. Б.П. Токин. Л.: Изд-во ЛГУ, 1972. С. 110–154.
- Короткова Г.П.* 1981. Общая характеристика организации губок // Морфогенезы у губок. Ред. Короткова Г.П. и др. Труды Биол. ин-та ЛГУ, № 33. с. 5–51.
- Alié A., Hayashi T., Sugimura I. et al.* (2015). The ancestral gene repertoire of animal stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. P. E7093–E7100.
- Arendt D., Musser J.M., Bake C. et al.* (2016). The origin and evolution of cell types // Nature Reviews Genetics. 2015. V. 17. P. 744–757.
- Ballarin L., Karahan A., Salvetti A. et al.* Stem cells and innate immunity in aquatic invertebrates: bridging two seemingly disparate disciplines for new discoveries in biology // Front. Immunol. 2021. V. 12. P. 688106.
- Ben-Hamo O., Rosner A., Rabinowitz C. et al.* Coupling astogenic aging in the colonial tunicate *Botryllus schlosseri* with the stress protein mortalin // Dev. Biol. 2018. V. 433. P. 33–46.
- Cheung T.H., Rando T.A.* Molecular regulation of stem cell quiescence // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2013. V. 14. P. 329–40. <https://doi.org/10.1038/nrm3591>
- Clevers H., Watt F.M.* Defining adult stem cells by function, not by phenotype // Ann. Rev. Biochemistry. 2018. V. 87. P. 1015–1027.
- Ereskovsky A.V.* Stem cells cell in sponges (Porifera): an update // ISJ-Invert. Survival J. 2019. V. 16. P. 62–63. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v0i0.60-65>
- Ereskovsky A., Lavrov A.* Porifera // Invertebrate Histology. 2021. Elise E. B., LaDouceur E.E.B., Ed., John Wiley & Sons, Inc. P. 19–54. <https://doi.org/10.1002/9781119507697.ch2>
- Ereskovsky A., Borisenko I.E., Bolshakov F.V., Lavrov A.I.* Whole-body regeneration in sponges: diversity, fine mechanisms and future prospects // Genes. 2021. V. 12, 506. <https://doi.org/10.3390/genes12040506>
- Ereskovsky A., Rinkevich B., Somorjai I.M.L.* Adult stem cells host intracellular symbionts: The poriferan archetype // Advances in aquatic invertebrate stem cell research. Balarin L., Rinkevich B., Hobmayer B. Eds. 2022. MDPI Books. P. 80–108. <https://doi.org/10.3390/books978-3-0365-16не36-3>
- Ereskovsky A., Melnikov N.P., Lavrov A.* Archaeocytes in sponges: simple cells of complicated fate // Biol. Rev. 2024. <https://doi.org/10.1111/brv.13162>
- Fraune S., Yuichi Abe Y., Bosch T.* Disturbing epithelial homeostasis in the metazoan *Hydra* leads to drastic changes in associated microbiota // Environ. Microbiol. 2009. V. 11. P. 2361–2369.
- Funayama N.* The cellular and molecular bases of the sponge stem cell systems underlying reproduction, homeostasis and regeneration // Internat. J. Dev. Biol. 2018. V. 62. P. 513–525.
- Funayama N., Nakatsukasa M., Hayashi T., Agata K.* Isolation of the choanocyte in the fresh water sponge, *Ephydatia fluviatilis* and its lineage marker, Ef annexin // Dev. Growth Diff. 2005. V. 47. P. 243–253.
- Funayama N., Nakatsukasa M., Mohri K. et al.* Piwi expression in archaeocytes and choanocytes in demosponges: insights into the stem cell system in demosponges // Evol. Dev. 2010. V. 12. P. 275–287.
- Gaino E., Rebora M., Corallini C., Lancioni T.* 2003. The life-cycle of the sponge *Ephydatia fluviatilis* (L.) living on the reed *Phragmites australis* in an artificially regulated lake // Hydrobiologia. 2003. V. 495. P. 127–42.
- Grün D., Muraro M.J., Boisset J.C. et al.* De novo prediction of stem cell identity using single-cell transcriptome data // Cell Stem. Cell. 2016. V. 19. P. 266–277.
- Hackett K., Lynn D., Williamson D. et al.* Cultivation of the *Drosophila* sex-ratio spiroplasma // Science. 1986. V. 232. P. 1253–1255.

- Kobińska M., Michalik A., Walczak M. et al.* Sulcia symbiont of the leafhopper *Macrosteles laevis* (Ribaut, 1927) (Insecta, Hemiptera, Cicadellidae: Deltocephalinae) harbors *Arsenophonus* bacteria // *Protoplasma*. 2016. V. 253. P. 903–912.
- Levy S., Elek A., Grau-Bové X. et al.* A stony coral cell atlas illuminates the molecular and cellular basis of coral symbiosis, calcification, and immunity // *Cell*. 2021. V. 11. P. 2973–2987.
- Li L., Xie T.* Stem cell niche: structure and function // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005. V. 21. P. 605–631.
- Martinez P., Ballarin L., Ereskovsky A.V. et al.* Articulating the “stem cell niche” paradigm through the lens of non-model aquatic Invertebrates // *BMC Biology*. 2022. V. 20:23.
<https://doi.org/10.1186/s12915-022-01230-5>
- Mashanov V.S., Zueva O.R., Rojas-Catagena C., Garcia-Ararras J.E.* Visceral regeneration in a sea cucumber involves extensive expression of survivin and mortalin homologs in the mesothelium // *BMC Dev. Biol.* 2010. V. 10, e117.
- Marescal O., Cheeseman I.M.* Cellular mechanisms and regulation of quiescence // *Developmental Cell*. 2020. V. 55. P. 259–271.
- Melnikov N.P., Bolshakov F.V., Frolova V.S. et al.* Tissue homeostasis in sponges: quantitative analysis of cell proliferation and apoptosis // *J. Exp. Zool. Pt B: Mol. Dev. Evol.* 2022. V. 338. P. 360–381
<https://doi.org/10.1002/jez.b.23138>
- Minchin E.A.* (1900). Sponges — phylum Porifera // *Treatise on Zoology*. V. 2. The Porifera and Coelenterata. E. Ray Lankaster. Ed. P. 1–178. Adam and Charles Black, London.
- Moore N., Lyle S.* Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance // *J. Oncol.* 2011. V. 2011, 396076. <https://doi.org/10.1155/2011/396076>
- Musser J.M., Schippers K.J., Nickel M. et al.* Profiling cellular diversity in sponges informs animal cell type and nervous system evolution // *Science*. 2021. V. 374. P. 717–723.
- Nakanishi N., Jacobs D.K.* The early evolution of cellular reprogramming in animals // *Deferring Development: Setting Aside Cells for Future Use in Development and Evolution*. 2020. (eds C. D. Bishop, B. K. Hall). P. 67–86. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Okamoto K., Nakatsukasa M., Alié A. et al.* The active stem cell specific expression of sponge Musashi homolog EflMsiA suggests its involvement in maintaining the stem cell state // *Mechanisms Dev.* 2012. V. 129. P. 24–37.
- Penrose L.S., Penrose R.* Impossible objects: a special type of visual illusion // *British Journal of Psychology*. 1958. V. 49. P. 31–33.
<https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1958.tb00634.x>
- Pflugfelder B., Cary C.S., Bright M.* Dynamics of cell proliferation and apoptosis reflect different life strategies in hydrothermal vent and cold seep vestimentiferan tubeworms // *Cell Tissue Res.* 2009. V. 337. P. 149–165.
- Rinkevich B., Ballarin L., Martinez P. et al.* A pan-metazoan concept for adult stem cells: The wobbling Penrose landscape // *Biol. Rev.* 2022. V. 97. P. 299–325.
<https://doi.org/10.1111/brv.12801>
- Sebé-Pedros A., Chomsky E., Pang K. et al.* Early metazoan cell type diversity and the evolution of multicellular gene regulation // *Nature Ecol. Evol.* 2018. V. 2. P. 1176–1188.
- Simpson T.L.* *The Cell Biology of Sponges*. New York: Springer-Verlag, 1984. 662 p.
- Sogabe S., Hatleberg W.L., Kocot K.M. et al.* Pluripotency and the origin of animal multicellularity // *Nature*. 2019. V. 570. P. 519–522.
- Wagner G.P.* Devo-Evo of cell types // *Evolutionary Developmental Biology. A Reference Guide*. 2019. L.N. De La Rosa, G.B. Müller Eds. P. 511–528. Springer International Publishing, Cham.
- Waddington C.H.* *The Strategy of the Genes*. London: Geo Allen & Unwin, 1957.
- Weissman I.L.* Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution // *Cell*. 2000. V. 100. P. 157–168.
- Yun C.O., Bhargava P., Na Y. et al.* Relevance of mortalin to cancer cell stemness and cancer therapy // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 42016.

Adult Stem Cells in Animals: a Paradigm Shift From a Spongiologist Perspective

A. V. Ereskovsky

Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

e-mail: aereskovsky@gmail.com

The paradigm within which the scientific community views animal adult stem cells (ASCs) and the concept of “stemness” itself was changed significantly over the past five years. According to the previously dominant paradigm, formed during the study of mammals, adult stem cells are extremely few in number, committed lineage-specific cells; their fates are limited to the tissues/organs in which they are located. However, studies performed on aquatic invertebrates have shown that ASCs, on the contrary, are very numerous, morphologically diverse, and demonstrate a wide range of states and levels of “stemness”. Moreover, ASCs of a number of invertebrates can arise *de novo* by transdifferentiation from differentiated somatic cells. One of the key roles in the formation of the new paradigm was played by the study of representatives of the phylum Porifera. This brief review examines the state of the arts of the modern concept of stem cells and the role of spongiology in the formation of the new paradigm.

Keywords: stem cells, adult stem cells, Metazoa, basal Metazoa, sponges, archaeocytes

CRISPR-ТЕХНОЛОГИЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ПОМОГАЕТ МАНИПУЛИРОВАТЬ ПОЛОМ ПОТОМСТВА У МЫШЕЙ

© 2024 г. А. Ю. Кулибин

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

e-mail: Kulibin.A.BKRJ@gmail.com

Поступила в редакцию 20.10.2024 г.

После доработки 29.11.2024 г.

Принято к публикации 02.12.2024 г.

Технология получения потомства нужного пола важна для многих отраслей сельского хозяйства и научных исследований, где имеется потребность в животных преимущественно одного пола, так как позволяет снизить расходы и решить этические проблемы, связанные с избавлением от нежелательных потомков. Манипулировать полом потомства у некоторых видов животных с наружным оплодотворением можно путем изменения температуры или кислотности среды, в которой происходит оплодотворение. Однако эти способы не подходят для организмов, у которых пол определяется набором половых хромосом, например млекопитающих. В этом случае могут помочь методы генетической селекции с использованием технологий редактирования генома, таких как CRISPR-Cas9. В настоящем обзоре будут рассмотрены результаты трех недавних исследований, проведенных на лабораторных мышах, где были представлены различные подходы для получения пометов только из самцов или самок.

Ключевые слова: CRISPR-Cas9, манипулирование полом потомства, генетическая селекция

DOI: 10.31857/S0475145024020031, **EDN:** MDBLPS

Во многих отраслях сельского хозяйства, таких как молочная промышленность, птицеводство, производство шерсти, шелка и др., а также научных исследованиях, касающихся репродуктивной системы, рака молочной железы или простаты, используются животные преимущественно одного или только одного пола. В этой связи технология контролирования пола получаемого потомства имеет не только важное экономическое значение, но и позволит разрешить многие этические проблемы, связанные с избавлением от нежелательных потомков.

В стенах Института биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН проблемой манипулирования полом потомства в 1940-е гг. занимался академик Борис Львович Астауров. Он работал на своем излюбленном объекте биологии развития, тутовом шелкопряде (*Bombyx mori*). Кокон шелкопряда используется для производства шелка. Известно, что в коконах мужских особей содержится примерно на четверть больше шелка, чем в женских, и, следовательно, получение

только самцов экономически более выгодно. Борис Львович нашел два способа решения проблемы. Первый — температурное воздействие на только что оплодотворенные яйца, приводящее к инактивации женского ядра зиготы. В этом случае оплодотворение завершалось слиянием двух ядер спермиев, в результате чего все зародыши были самцами, так как мужской пол у шелкопряда гомогаметный и определяется двумя одинаковыми половыми хромосомами (ZZ). Второй способ получения андрогенного, т.е. мужского, потомства шелкопряда — это инактивация женского ядра яйцеклетки рентгеновским облучением с последующим оплодотворением (<http://museum.idbras.ru/?show=content32>).

У некоторых беспозвоночных, а также позвоночных животных с наружным оплодотворением, имеющих промысловое значение (например, ракообразные, рыбы), пол потомства часто определяется температурным фактором или кислотностью окружающей среды, в которой происходит оплодотворение. Это легко позволя-

ет получать особей нужного пола. Такой подход, однако, не может быть использован для получения только самцов или самок у млекопитающих, у которых пол определяется набором половых хромосом. У млекопитающих гетерогаметным полом является мужской и определяется наличием двух половых хромосом (XY), а женский пол, наоборот, гомогаметный (XX). Так как гаметы гаплоидны и несут только одну из половых хромосом то, следовательно, у самцов могут быть сперматозоиды двух типов, содержащие только X- или только Y-хромосому. При этом Y-хромосома, как правило, меньше X-хромосомы, что приводит к небольшим различиям в весе и размере между “X”- и “Y”-гаметами. Интересно, что такие различия у некоторых видов, например у крупного рогатого скота, достаточно существенны, что позволяет отсортировать сперму перед проведением искусственного осеменения. Однако используемая технология является очень дорогостоящей и не подходит для других видов сельскохозяйственных животных (Rath et al., 2018). В этом случае единственным альтернативным методом контроля соотношения полов у потомства может стать генетическая селекция. Генетическая селекция может быть достигнута, например, путем встраивания в одну из половых хромосом отца гена “самоубийства”. Если, к примеру, мы встроим такой ген в Y-хромосому, будут погибать все потомки мужского пола,

а если в X — то женского. Такая модель требует также наличия еще гена-“триггера”, приходящего от матери, который бы включал ген “самоубийства” в образующемся после оплодотворения зародыше. Вариации этого подхода с использованием *CRISPR-Cas9* технологии направленного редактирования генома были уже использованы для манипуляции полом потомства у рыбки данио-рерио (Yin et al., 2015), комаров (Galizi et al., 2016), шелкопряда (Zang et al., 2018) и дрозофилы (Fasulo et al., 2020). У млекопитающих такой подход до недавнего времени осуществить не удавалось из-за определенных сложностей с экспрессией генов, расположенных на половых хромосомах. В настоящем обзоре мы рассмотрим три недавних исследования, отражающих эволюцию в подходе к генетической селекции потомства по полу у лабораторных мышей.

Статья (Yosef et al., 2019) исследователей с кафедры клинической иммунологии медицинского факультета Тель-Авивского университета стала первой работой, где авторы попробовали создать технологию получения потомства из одних самок путем генетической селекции. Для этого они получили трансгенных самок, встроив им в отцовскую и материнскую 6-ю хромосому ген *CRISPR-Cas9*, выступающий в роли гена “самоубийства” (рис. 1). При этом конструкция вставки позволяла трансгену экспресси-

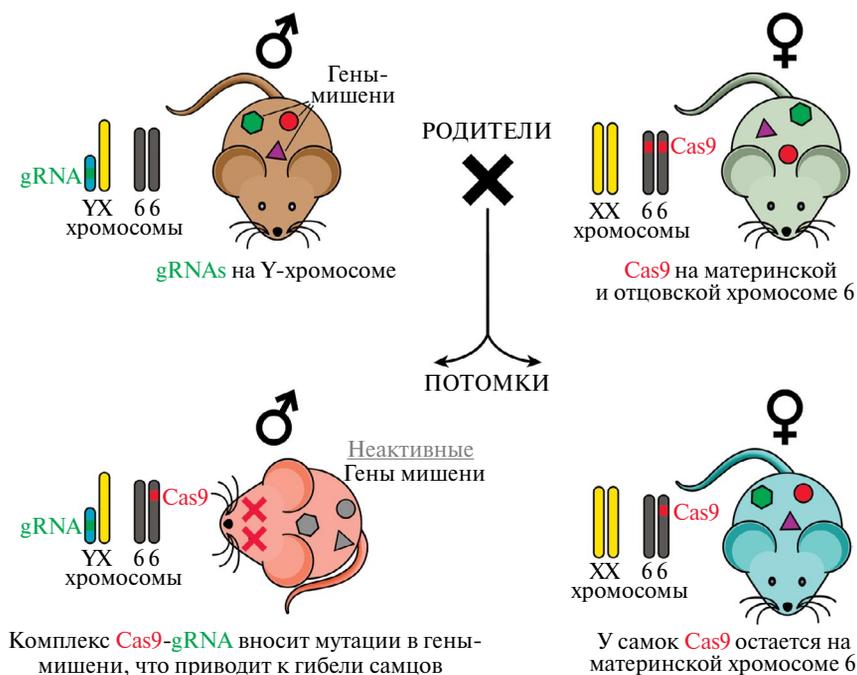


Рис. 1. Схема эксперимента по получению потомства из одних самок по данным работы (Yosef et al., 2019).

роваться в любом типе клеток. Ген *CRISPR-Cas9* кодирует бактериальную нуклеазу белок Cas9, способный делать двуцепочечный разрез ДНК в области гена-мишени; репарация такого разрыва генетическим аппаратом клетки приводит к мутации и выключению гена (Ran et al., 2013). Для того чтобы нуклеаза могла найти нужную область на ДНК, ей необходима т.н. направляющая РНК (gRNA — ген-“триггер”), содержащая последовательность, комплементарную той области, в которой необходимо произвести разрез. Для достижения успеха авторы использовали три такие последовательности gRNA, нацеленные на три важных для развития зародыша гена (*Atp5b* — ATP synthase F1 subunit beta, *Cdc20* — cell division cycle protein 20 и *Casp8* — Caspase-8). Все три последовательности были встроены в Y-хромосому самца и также могли экспрессироваться во всех типах клеток. Авторы поменяли ген-“триггер” и ген “самоубийства” местами в своей модели относительно теоретической схемы, описанной выше, и, как станет видно ниже, это решение привело к рождению генетически модифицированных самок. Теоретически скрещивание трансгенных самцов и самок должно было приводить к гибели всех потомков только мужского пола на ранних сроках эмбрионального развития, так как только в этом случае клетки экспрессировали ген, кодирующий нуклеазу и направляющую РНК одновременно (см. рис. 1). Однако на практике этот подход привел лишь к частичному успеху, и некоторые самцы все же выживали, хотя и несли сильные нарушения развития, а после рождения довольно быстро погибали. Неполная элиминация мужских особей может объясняться неполной специфичностью используемых gRNA, а также вероятностным характером возникающих в генах мутаций. Так, авторы использовали только по одному варианту gRNA для каждого из трех генов-мишеней и не тестировали эффективность различных последовательностей перед проведением основного эксперимента. Соотношение полов в помете у контрольных мышей (без трансгена) было статистически одинаковым: 58% самцов и 42% самок (всего 84 мышонка, в среднем 6.75 мышонка на помет). В опыте соотношение сильно смещалось в пользу самок: 8% самцов и 92% самок (всего 113 мышат, в среднем 3.75 мышонка на помет). Сразу бросается в глаза, что количество мышат на помет в опыте почти в два раза меньше, чем в контроле (55.8%), что обусловлено гибелью потомков мужского пола. Такая потеря в количестве потомков неизбежна при

выбранном подходе, и при его переносе на сельскохозяйственных животных снизит экономическую выгоду. Кроме этого, к недостаткам метода можно также отнести то, что получаемые самки были трансгенными, так как несли ген *CRISPR-Cas9* в одной из своих хромосом (см. рис. 1). Сложности с использованием генетически модифицированных животных для производства пищевых продуктов также являются серьезным ограничением на пути внедрения этой технологии. Наконец, необходимо отметить и этический аспект: рождение небольшого количества самцов с сильными аномалиями развития. В случае переноса технологии на сельскохозяйственных животных это может свести на нет все преимущества от ее использования.

В следующей работе (Douglas et al., 2021) ученые из института Фрэнсиса Крика в сотрудничестве с Кентским университетом использовали технологию редактирования генов для создания пометов мышей, состоящих только из самок и только из самцов, со 100%-ной эффективностью. Авторы также использовали две линии трансгенных мышей, но, в отличие от предыдущей работы, перенесли ген *Cas9* с аутосомы на половую хромосому, а gRNA, необходимую для нацеливания, наоборот — с половой хромосомы на 11-ю хромосому. В результате этого изменения получаемые потомки, и самки, и самцы (см. схему на рис. 2а, б), будут нести только gRNA в одной из своих хромосом, которая не кодирует трансгенные белки. Кроме этого, авторы изменили ген-мишень, сосредоточившись на одном гене — *Top1*, кодирующем топоизомеразу 1, необходимую для процесса репликации ДНК и деления клеток. Мутации в этом гене приводят к гибели зародышей на очень ранней стадии развития, примерно 16-32-ве клетки (Morham et al., 1996). Наконец, были протестированы несколько последовательностей gRNA и выбрана наиболее эффективная из них. Для получения пометов только из одних самок ген *Cas9* встраивали в Y-хромосому самца (см. рис. 2а), а пометов только из самцов — в X-хромосому (см. рис. 2б). В обоих экспериментах были получены пометы, состоящие на 100% только из самок или самцов, тогда как в контроле соотношение между полами было примерно одинаковым. В этой работе среднее число мышат в помете в экспериментах с получением как самок, так и самцов по сравнению с контролем составило 61%, что немного выше, чем в предыдущей работе. Это, вероятно, связано с гибелью зародышей на более ранней стадии,

еще до имплантации в матку. В этом случае компенсация происходит за счет того, что количество оплодотворенных яйцеклеток у мышей, как правило, чуть больше, чем количество имплантированных в матку зародышей и количество мышат в помете. Этот сдвиг в 16% по сравнению с 50%-ным теоретическим показателем даст преимущество этой технологии по сравнению с предыдущей только в случае ее реализации, например, на свиньях, у которых пометы также большие.

В случае же реализации технологии на коровах, у которых рождается только один теленок, использование технологии генетической манипуляции полом потомства в этом виде может привести к отсутствию потомства вообще, если зародыш был мужского пола. Учитывая сложности с получением трансгенных линий, использование такого подхода будет экономически невыгодно, хотя авторы технически значительно продвинулись по сравнению с первой работой.

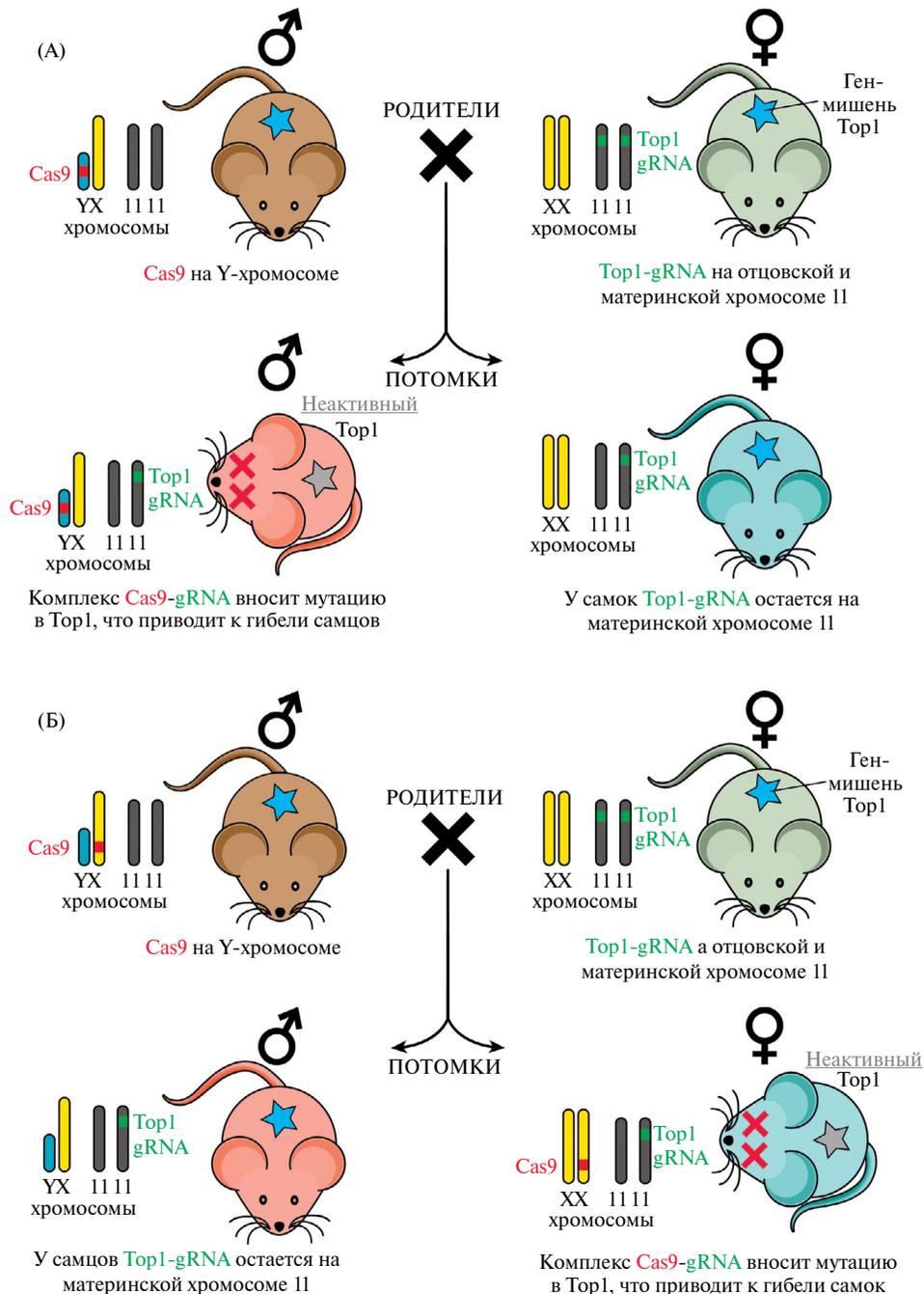


Рис. 2. Схемы получения потомства только из самок (А) и только из самцов (Б) по данным статьи (Douglas et al., 2021).

Наконец, в последнем, еще не опубликованном исследовании, пока выложенном в виде препринта на сайте <https://www.biorxiv.org/> (Yosef et al., 2024), предложен оптимальный вариант метода селекции по половому признаку. Работа выполнена под руководством Уди Кимрона (Udi Qimron) из Тель-Авивского университета и, по сути, является переосмыслением первоначального подхода, представленного в исследовании 2019 г. В этой статье авторы также

сосредоточились на получении пометов только из одних самок, но решили, что оптимально будет проводить селекцию сразу сперматозоидов, так, чтобы у самцов на выходе получались только гаметы с половой хромосомой X (см. рис. 3). В результате оплодотворения такими сперматозоидами яйцеклеток обычных (не трансгенных) самок в помете будут только самки, причем теоретически размер помета не должен отличаться от контроля. Еще одним преимуществом та-

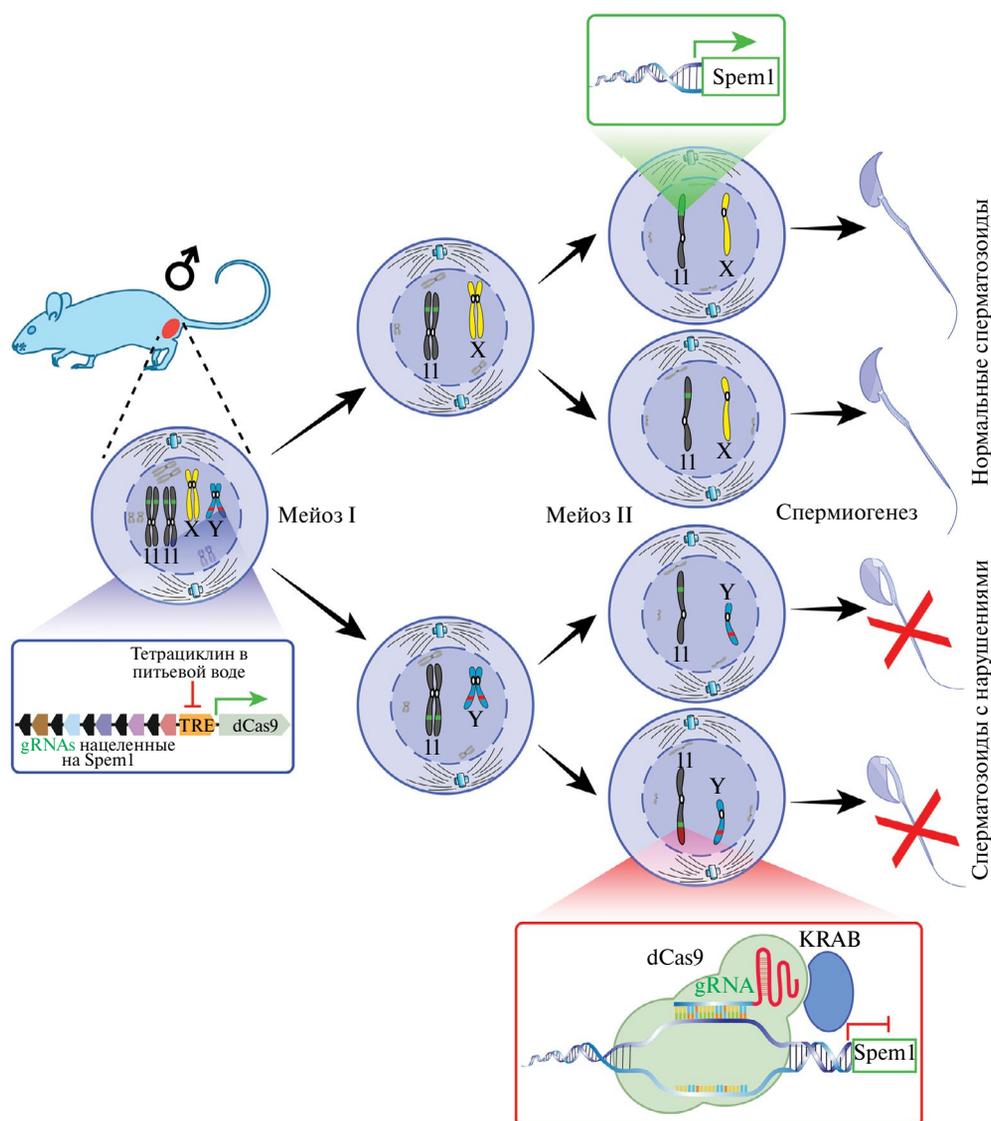


Рис. 3. Схема селекции спермы по половому признаку для получения пометов мышей, состоящих только из одних самок по (Yosef et al., 2024). Все клетки организма трансгенных самцов, в том числе и ранние половые клетки, содержат Y-хромосому и в отсутствие в питьевой воде тетрациклина экспрессируют генетическую конструкцию, подавляющую экспрессию гена *Spem1* (синий прямоугольник). Экспрессия *Spem1* происходит только в гаплоидных половых клетках, образующихся в результате делений мейоза — особого типа деления, характерного только для развивающихся мужских и женских половых клеток, приводящего к редукции числа хромосом вдвое и образованию гаплоидных гамет. В части гаплоидных гамет, содержащих X-хромосому (сверху) ген *Spem1* активен (зеленый прямоугольник), а в тех, что содержат Y-хромосому (снизу), заблокирован (красный прямоугольник). В результате X-содержащие гаметы развиваются нормально, тогда как Y-содержащие гаметы либо погибают, либо становятся аномальными.

кого подхода является получение только одной трансгенной линии — самцов, что экономичнее, чем при других подходах. В этот раз авторы встроили единую генетическую конструкцию с направляющими РНК и нуклеазой в хромосому Y самца. При этом были сделаны следующие улучшения: во-первых, количество gRNA, учитывая прошлый неудачный опыт, было увеличено с 1 на ген до 5. Каждая из gRNA кодировала последовательность, комплементарную различным участкам одного гена-мишени — *Spem1*, расположенного на 11-й хромосоме. Во-вторых, авторы вместо гена *Cas9* взяли его модифицированную форму (*dCas9*), не обладающую нуклеазной активностью, и соединили этот белок с белком KRAB. Именно KRAB будет блокировать экспрессию гена мишени без внесения изменений в последовательность гена на эпигенетическом уровне (McCutcheon et al., 2024). Здесь необходимо пояснить, чем продиктована необходимость использования *dCas9*. Дело в том, что авторы встроили 5 gRNA, *dCas9* и KRAB в определенный локус на Y-хромосоме — *Uty*, позволяющий активную экспрессию встроенной конструкции в любом типе клеток. В результате, если бы был использован обычный *Cas9*-ген, то его нуклеазная активность привела бы к возникновению мутаций в *Spem1* во всех клетках организма и его выключению. Ген *Spem1* кодирует белок — Sperm maturation 1, необходимый для развития мужских гамет на самой последней стадии их созревания — спермиогенезе. Мутации в этом гене у мышей приводят к мужскому бесплодию и образованию аномальных, неспособных к оплодотворению яйцеклетки гамет (Zheng et al., 2007). Чтобы этого избежать, был использован подход с блокированием экспрессии *Spem1*. Этот ген активен только в гаплоидных мужских половых клетках, которые несут только один набор хромосом, в том числе и половых. В результате блокирование экспрессии *Spem1* происходит только в клетках с Y-хромосомой, они не могут закончить свое развитие, погибают или приобретают серьезные аномалии (рис. 3). Авторы также предусмотрели возможность размножения полученных ими трансгенных самцов, встроив под промотор *dCas9* тетрациклин-зависимый трансаактиватор. В результате добавление тетрациклина в питьевую воду самцам блокировало экспрессию *dCas9*, и образовывались как "X"-, так "Y"-содержащие гаметы. Согласно полученным результатам, 100%-ной селекции не получилось: при естественном оплодотворении было получе-

но 83% самок, а в случае искусственного оплодотворения с последующим переносом эмбрионов в матку этот показатель достигал 91%. Однако, согласно данным литературы (Zheng et al., 2007), мутантные по *Spem1* самцы полностью стерильны. В случае же блокирования экспрессии этого гена только в Y-содержащих гаметах часть из них может нормально развиваться, вероятно, за счет наличия цитоплазматических мостиков между развивающимися мужскими половыми клетками. Эти мостики разрушаются только после завершения развития гамет. Вероятно, часть SPEM1, синтезированного в X-клетках, попала в Y-клетки по этим мостикам и позволила им нормально развиваться. В конце хотелось бы отметить, что при таком подходе количество мышат в получаемых пометах не отличалось от контроля, и полученные самки не несли в своем геноме каких-либо трансгенных генетических конструкций.

Таким образом, на сегодняшний день все подходы к генетической селекции пола у млекопитающих, пока разработанные только на мышах, не являются совершенными. Для возможного переноса технологии на сельскохозяйственных животных имеет смысл рассматривать только два последних варианта. В первом случае авторы получили пометы только из самок и только из самцов со 100%-ным выходом, но их технология требует вносить генетические модификации как в самцов, так и в самок и приводит к снижению числа потомков в помете по сравнению с генетически не модифицированными мышами той же линии. Кроме этого, получаемые потомки содержат в своем геноме гены, кодирующие gRNA. Вторая технология лишена всех недостатков первой, но не дает 100%-ного выхода и была реализована только для получения пометов исключительно из самок. Второй подход все же выглядит более перспективным, но с его реализацией на других видах животных могут возникнуть сложности. Динамика экспрессии и функция гена *Spem1* изучены только на мышах, поэтому неизвестно, приведет ли его инактивация у других животных к тому же эффекту, что и у мышей. Вполне возможно, что у других видов млекопитающих *Spem1* начинает экспрессироваться еще в профазе I мейоза, тогда его экспрессия будет заблокирована как в Y-, так и в X-содержащих гаметах. Также есть вероятность, что у других животных функция *Spem1* не настолько важна для формирования сперматозоидов или продублирована функциями других генов. То есть потребуются поиск другого гена-мишени.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках ГЗ ИБР РАН № 0088-2024-0012.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии какого-либо конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Астауров Борис Львович* (1904–1974) // Выдающиеся ученые Института. Виртуальный музей Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. <http://museum.idbras.ru/?show=content32>
- Rath D., Tiedemann D., Gamrad L., Johnson L.A. et al.* Sex-sorted boar sperm — an update on related production methods. // *Reproduction in domestic animals*. 2015. Vol.50, Suppl 2. P. 56–60.
- Yin L., Maddison L.A., Li M., Kara N. et al.* Multiplex conditional mutagenesis using transgenic expression of Cas9 and sgRNAs. // *Genetics*. 2015. Vol.200, № 2. P. 431–441.
- Galizi R., Hammond A., Kyrou K., Taxiarchi C. et al.* A CRISPR-Cas9 sex-ratio distortion system for genetic control. // *Sci. Rep.* 2016. Vol.6. P. 31139.
- Zhang Z., Niu B., Ji D., Li M. et al.* Silkworm genetic sexing through W chromosome-linked, targeted gene integration. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. Vol.115, № 35. P. 8752–8756.
- Fasulo B., Meccariello A., Morgan M., Borufka C., Papatianos P.A., Windbichler N.* A fly model establishes distinct mechanisms for synthetic CRISPR/Cas9 sex distorters. // *PLoS Genet.* 2020. Vol.16, № 3. P.e1008647.
- Yosef I., Edry-Botzer L., Globus R., Shlomovitz I. et al.* A genetic system for biasing the sex ratio in mice. // *EMBO Rep.* 2019. Vol.20, № 8. P.e48269.
- Ran F., Hsu P., Wright J. et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. // *Nat. Protoc.* 2013. Vol.8. P. 2281–2308.
- Douglas, C., Maciulyte, V., Zohren, J. et al.* CRISPR-Cas9 effectors facilitate generation of single-sex litters and sex-specific phenotypes. // *Nat. Commun.* 2021. Vol.12. P. 6926.
- Morham S.G., Kluckman K.D., Voulomanos N., Smithies O.* Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection. // *Mol. Cell Biol.* 1996. Vol.16, № 12. P. 6804–6809.
- Yosef I., Mahataa T., Chenb Y., Bar-Joseph H. et al.* Engineering mice for female-biased progeny without impacting genetic integrity and litter size. (preprint)// *bioRxiv*. 2024. <https://doi.org/10.1101/2023.11.21.568055>
- McCutcheon S.R., Rohm D., Iglesias N., Gersbach C.A.* Epigenome editing technologies for discovery and medicine. // *Nature Biotechnology*. 2024. Vol.42. P. 1199–1217.
- Zheng H., Stratton C.J., Morozumi K., Jin J., Yanagimachi R., Yan W.* Lack of *Spem I* causes aberrant cytoplasm removal, sperm deformation, and male infertility. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. Vol.104, № 16. P. 6852–6857.

CRISPR Technology of Genome Editing Helps to Manipulate the Offspring Sex Ratio in Mice

A. Yu. Kulibin

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

e-mail: Kulibin.A.BKRJ@gmail.com

Development of technologies for producing mainly single-sex progeny is urgently needed for many areas of agriculture and laboratory research that require animals of predominantly one sex. Such technologies would reduce economic costs and address ethical concerns about culling animals of undesired sex. For some species with external fertilization, it is possible to manipulate the offspring sex ratios by changing the temperature or acidity of the environment where the fertilization occurs. However, these methods are not suitable for animals in which sex is determined by a set of sex chromosomes, such as mammals. In this case, breeding systems using genome editing technologies, such as CRISPR-Cas9, can help. This review describes the results of three recent studies on laboratory mice that present different approaches to producing male-only and female-only litters.

Keywords: CRISPR-Cas9, manipulation of the offspring sex ratio, genetic selection

ГЕНЕАЛОГИЯ НЕЙРОНОВ: 50 ЛЕТ РЕКОНСТРУКЦИИ ЭВОЛЮЦИИ НЕРВНЫХ СИСТЕМ

© 2024 г. Л. Л. Мороз^а, *, В. Е. Дьяконова^б, **

^аУниверситет Флориды, Флорида, США

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

*e-mail: leonidlmoroz@gmail.com

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

Поступила в редакцию 25.11.2024 г.

Окончательная версия 09.12.2024 г.

Принято к публикации 12.12.2024 г.

11 ноября ушел из жизни Дмитрий Антонович Сахаров (1930–2024), уникальный человек, наставник, ученый и поэт. В этом же году мировое сообщество отмечает 50-летие выхода в свет его книги “Генеалогия нейронов”, оказавшей громадное влияние на несколько поколений нейробиологов. Представленные в этой книге гипотезы, стратегии и экспериментальные подходы сохранили актуальность и сегодня. Мы представили гипотезы Сахарова о полигенезе и функциональном значении гетерохимизма нейронов в свете последних работ в области эволюционной нейробиологии, геномики и транскриптомики одиночных нейронов.

Ключевые слова: происхождение нейронов, гомологичные нейроны, нейротрансмиттеры, глутамат, ГАМК, эволюция нервной системы, нейрогенез, транскриптомика одиночных клеток, мозг

DOI: 10.31857/S0475145024020049, **EDN:** MCVORF

ПОЧЕМУ НЕЙРОНЫ РАЗНЫЕ?

11 ноября 2024 г. ушел из жизни Дмитрий Антонович Сахаров (1930–2024), уникальный человек, наставник, ученый и поэт.

Один из авторов этой статьи, будучи студентом третьего курса, совершенно случайно, в медицинской библиотеке Минска, работая по курсовому проекту, посвященному ядрам мозга кролика, натолкнулся на небольшую книжку (всего за 86 копеек!) Дмитрия Антоновича. Эта работа называлась “Генеалогия нейронов” (Сахаров, 1974), где сразу, во введении, были суммированы две фундаментальные, но далеко не тривиальные стратегии анализа принципов нейрональной организации. В результате прочтения “Генеалогии” в тот же день работа на кроликах была забыта. Представленные стратегии и экспериментальные подходы “Генеалогии” оказались не только чрезвычайно интересны, но и плодотворны. Они сохранили актуальность и сегодня, 50 лет спустя.



Дмитрий Антонович Сахаров, ученый и поэт, 2012 г.
Фото: Вячеслав Коротихин.

Первый подход — это необходимость исследовать “откровенность” (Вагнер, 1885; то есть открытость и доступность для исследования) простых нервных систем брюхоногих моллюсков с гигантскими полиплоидными нейронами ($n = 100/000 - 200/000$), иногда достигающими рекордных 1 мм в диаметре. Центральная нервная система у этих моллюсков (принадлежащих к подгруппе *Euthyneura* кледы *Heterobranchia*) состоит из нескольких тысяч нервных клеток, расположенных на поверхности пяти — десяти ганглиев, и, таким образом, доступных для физиологического, микрохимического и геномного анализов на уровне каждого отдельного нейрона. Что особенно важно, такой многофакторный анализ можно проводить во время реализации простого и сложного поведения, в реальной динамике процессов обучения и формирования памяти в *каждом* из нейронов участвующих в формировании этого поведения.

Второй подход — это постановка вопроса “Почему нейроны разные?” и ответ Сахарова на этот вопрос (Сахаров 1972). Действительно, уже в начале 1970-х стало известно, что практически все нейроны у моллюсков и многих других беспозвоночных уникальны по десяткам параметров. Объяснение, которое предложил для этого явления Сахаров, сразу и простое, и сложное: нейроны разные, главным образом потому, что у них разное происхождение. При этом функциональные адаптации клеточного фенотипа не исключаются, а интегрируются с историей становления нейрональной специфичности. В этом и научная оригинальность, и красота подхода Сахарова, опередившего время на десятилетия. Сахаров назвал свою гипотезу *гипотезой полигенеза* нейронов (то есть гипотезой множественного происхождения нейронов из разных тканевых или клеточных предшественников). Эта гипотеза была сформулирована в противовес альтернативной концепции *функциональной специализации*, в соответствии с которой нейроны и нервные системы могли возникнуть “из одного корня” (то есть от одного общего предка) или одного клеточного типа. Позднее Сахаров сказал, что правильнее было бы называть его гипотезу полигенезом или полифилией, чтобы избежать параллелей с религиозной терминологией.

Сахаров объединил два подхода неслучайно. Чтобы “разобраться” с полифилией (множественность происхождения) или монофилией (единство происхождения), надо было начинать

работать с *Euthyneura* и их большими, хорошо доступными нейронами. Это позволило бы находить *гомологичные* нейроны у разных видов и на разных филогенетических расстояниях. Иными словами, необходимо было разработать и применить критерии гомологии на уровне отдельных идентифицированных нейронов, что Сахаров и сделал на примере серотонергических и пептидергических клеток в 1970–1974, впервые в СССР и в мире.

Как это часто бывает в науке, история началась с переоткрытия Сахаровым в 1958 г. морского ангела (*Clione limacina*) как уникального модельного объекта нейробиологии. Н. П. Вагнер писал в 1885 г.: “При первом взгляде на узлы нервной системы клиона каждый наблюдатель, наверное, будет поражен громадной величиной их клеток... При взгляде на эту громадную величину... мне пришло на мысль исполнить давнее желание и разработать хоть у одного беспозвоночного типа вполне весь комплекс нервной системы. Такой разбор, по всей вероятности, повел бы к объяснению, хотя гадательному, многих функций нервной системы у большей части, если не у всех, беспозвоночных животных. Правда, мне хотелось сделать эту работу без особого труда, и прозрачность, или, так сказать, откровенность нервной системы клиона давала мне в этом случае надежду на успех” (Вагнер 1885).

“Сверкание околوجلочного ожерелья и наглая зримость нейронов” клиона (Сахаров 1960) поразила 28-летнего Сахарова, наверное, сильнее, чем Вагнера, и он расширил спектр видов, нашел и предложил для нейробиологии другие уникальные модельные объекты, такие как беломорские голожаберные моллюски *Aeolidia papillosa*, *Dendronotus frondosus* (Сахаров 1962) и дальневосточная *Tritonia diomedea* (Вепринцев и др., 1964; В. Л. Боровягин, Д. А. Сахаров 1968). Это было важное сравнительное дополнение к *Aplysia californica*, набирающей тогда популярность, но недоступной в Советском Союзе (рис. 1).

Сравнивая нейроны у разных видов брюхоногих моллюсков и их нейромедиаторы (творчески расширяя методологию своего учителя, Х. С. Коштойнца, при анализе сигнальных молекул (Коштойнец 1957; Koshtoyants, et al., 1961; Артемов, Сахаров 1986)), Сахаров показал, что секреторная специфичность нейронов у исследуемых моллюсков эволюционно консервативна и, следовательно, может быть использована как

один из важных параметров для идентификации гомологичных нейронов. Как итог нескольких лет сравнительных исследований — первые клеточные гомологи были найдены у морских, пресноводных и наземных моллюсков (Сахаров 1970, 1974, 1976).

Наиболее интересный случай представляет пара серотонин-содержащих интернейронов в церебральных ганглиях, известных как МСС (metacerebral cells) (рис. 2). К настоящему вре-

мени эти два нейрона найдены у всех исследованных *Euthyneura* исходя из критериев специального качества, положения и, что особенно важно, непрерывности, то есть наличия этих клеток у представителей всех “промежуточных” таксономических рангов от вида до подкласса. МСС отвечают за ключевое “поведенческое решение” моллюска — “есть” или не “есть”? (eat or not to eat), участвуя в запуске и интеграции пищевой программы (Rosen et al., 1983; 1989;



Рис. 1. Голожаберные моллюски — популярные нейробиологические модели. *Tritonia tetraquetra* (Pallas, 1788) [ранее известная как *T. diomedea*], *Clione limacina* (Phipps, 1774) из Friday Harbor США, *Aplysia californica* (J. G. Cooper, 1863) из Калифорнии, США. Фото: Леонид Мороз.

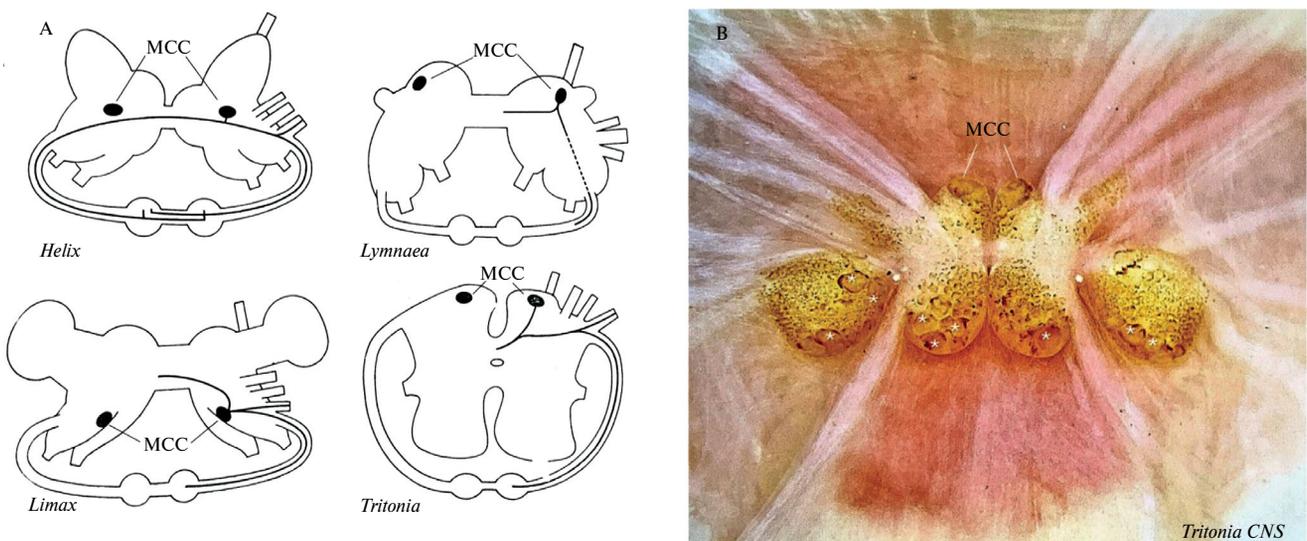


Рис. 2. А — МСС разных моллюсков, рисунок Сахарова (Сахаров, 1974); В — дорсальный вид живой центральной нервной системы *Tritonia* с гигантскими нейронами МСС; звездочками показаны некоторые другие гигантские нейроны; фото: Леонид Мороз.

Alexeeva et al., 1989) у тысяч видов и таксономических линий, разделенных 380 миллионами лет независимой эволюции (Moroz, 2018). Это уникальный пример сохранения сложного фенотипа одного идентифицированного нейрона и его роли в поведении на таких гигантских эволюционных расстояниях.

Не для всех типов нейронов такая удаленная гомология на клеточном уровне прослеживается: данные на моллюсках четко показывают, что есть большой диапазон нейронов: от эволюционно консервативных до эволюционно пластичных, с появлением и потерями разных клеточных линий (Moroz 1986; 1988). В любой интерпретации предложенные подходы создали фундамент для построения эволюционной классификации нейронов (Сахаров 1970) или даже “Периодической системы нейронов” (Moroz 2018), концептуального аналога периодической системы химических элементов Менделеева, с предсказуемыми свойствами клеточных фенотипов, что очень полезно для их поиска и функциональной идентификации.

Сейчас концептуальная гипотеза полифилии нейронов получает подтверждение в исследованиях на гребневиках (тип *Stenophora*) (Moroz et al., 2024). У этих загадочных морских организмов, потомков самой древней ветви животного царства (Whelan et al., 2017), нейроны, мышцы, мезодерма и пищеварительный тракт возникли независимо от остальных Metazoa (Moroz et al., 2014; Moroz 2024). Не исключена вероятность, что нейроны и синапсы независимо возникали в эволюции как минимум 3–4 раза из секреторных клеток (Moroz 2021). Альтернативные несинаптические нейроидные интегративные системы (non-synaptic neuroid systems) действительно найдены у губок (Porifera) (Musser et al., 2021) и пластинчатых (Placozoa) (Moroz, Romanova 2022). Неудивительно, что растущее разнообразие нейрональных фенотипов, молекулярная, морфологическая и функциональная гетерогенность клеточных популяций в мозге вызывает вопрос: “что такое нейрон?”. Попытки дать определение нейрону приводят к заключению, что универсальный нейрон — это не генетическая, а функциональная категория. Получается, что нейроны демонстрируют множество примеров конвергентной эволюции и мозаику *филогенетически разных* популяций клеток (Moroz 2014), как и предсказывал Сахаров полвека назад.

Помимо проблемы понимания возникновения нейронов, существует не менее важная проблема возникновения мозга как объединения множества гетерогенных нейронов и глии в единую морфологическую структуру/орган со своей уникальной микросредой и гомеостазом. Сахаров писал в далеком 1974-м: “Путь, приведший к рождению мозга, не был строго предопределен; на разных его этапах имелись возможности выбора направлений развития, и реализация этих возможностей привела к тому, что в природе, помимо мозга человека, существует мозг пчелы или, скажем, осьминога. В каких-то важных отношениях, однако, выбор был невелик, и возможности эволюции ограничивались свойствами исходного материала и тем, что этот материал мог меняться только в сфере действия биологических законов развития” (Сахаров 1974). Сколько же раз природа создавала мозг?

Теперь мы можем реконструировать многократное возникновение мозга или централизации нейронов в единую структуру (Moroz et al., 2021): не менее 20 раз в эволюции животных и даже не менее 5 раз в рамках только одного типа так любимых Сахаровым моллюсков (Moroz, 2009). Конечно, сейчас мы все еще в начале долгой дороги к полноценной реконструкции эволюции нейронных клеток и центральных нервных систем у более чем тридцати типов животных. На этом пути, с развитием “single-cell multi-omics” методологии (Baysoy et al., 2023), проблема генеалогии клеточных типов снова стала и становится все более и более актуальной (Arendt et al., 2016). Исследования в рамках решения этой проблемы направлены на поиск и идентификацию разных гомологичных клеточных линий, даже между отдельными типами животных (Tarashansky et al., 2021). При этом, конечно, надо учитывая множественность транскрипционных фенотипов, и в первую очередь возможность существования многих, эволюционно древних линий секреторных клеток у безнервных животных.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГИПОТЕЗА ПОЛИФИЛИИ НЕЙРОНОВ

За прошедшие годы появилось много геномных и транскриптомных исследований, которые подтверждают, что все исследованные на сегодняшний день нервные системы представлены нейронами разной транскрипционной специфичности (Moroz 2021; Moroz et al., 2021b). Сахаров как наблюдатель, так и предвидел такую секретор-

ную гетерогенность, и его интерес рано сместился в сторону расшифровки функциональной роли множественности нейротрансмиттеров. Он пришел сначала к интуитивному пониманию того, что в нервной системе огромную роль должна играть несинаптическая коммуникация между нейронами, при которой упорядоченность взаимодействий достигается за счет наличия соответствующих рецепторов у соответствующих нейронов. Это представление было озвучено в 1985–1990 гг. под названием “*гетерон*” (Сахаров 1985; 1990).

Уже к девяностым годам в работах его лаборатории накопилось много экспериментальных доказательств несинаптической нейротрансмиссии (Сахаров, Каботянский 1986; Rózsa, Dyakonova 1989; Moroz 1991). Появились и другие авторы, активно развивающие это направление (Fuxe et al., 1990; Benfenati, Agnati 1991; Bach-y-Rita P, Illis 1993). Однако отличие взглядов Д. А. Сахарова от их представлений о роли несинаптической нейротрансмиссии было принципиальным. Он рассматривал “*volume transmission*” (объемную нейрональную секрецию) не как внешнюю модуляцию жесткого синаптического ансамбля, а как основу упорядоченного взаимодействия нейронов на всех уровнях организации нервной системы. А классический синапс с его изолирующими барьерами Сахаров рассматривал как редкий и предельный случай такой коммуникации.

Очевидно, что у двух основных гипотез Д. А. Сахарова, полигении нейронов и функциональности первичного гетерохимизма (множественности нейротрансмиттеров), должно было быть следствие: функциональный ансамбль нейронов (который может работать только при наличии в нем нейронов разного химизма) должен состоять из нейронов разного происхождения. То есть нейроны при образовании химических контактов руководствуются примерно тем же принципом, который работает при выборе полового партнера: *предпочтение отдается неродственному фенотипу*.

Стремительное развитие транскриптомики и мультиомики одиночных клеток, позволяющих не только устанавливать онтогенетическое родство нейронов на основании сходства их молекулярной архитектуры, но и проследить развитие разных линий в онтогенезе, может уже в ближайшее время ответить на вопрос о справедливости этого утверждения, так же, как и на вопрос о связи

нейротрансмиттерных фенотипов с онто- и филогенетическими линиями развития нейронов. Некоторые данные, важные для проверки гипотезы онтогенетической полигении, уже получены в 2023–2024 гг. при построении транскриптомных клеточных атласов мозга мыши и дрозофилы (Dorkenwald et al., 2024; Lin et al., 2024; Schlegel et al., 2024; Yao et al., 2023).

Всего десять лет назад коннекционизм, то есть построение коннектомов, изучающих анатомические синаптические связи между всеми отделами и нейронами нервной системы, доминировал в подходах к изучению мозга. Ожидаемый результат часто преподносился как информация, не только полезная для последующих исследований, но и обеспечивающая быстрое понимание механизмов функционирования мозга. С этими ожиданиями не соглашались сторонники гетерохимической парадигмы, осознававшие важность химического разнообразия нейронов и их несинаптической коммуникации для функционирования нервной системы. В какой-то момент выражение “*Beyond the connectome*” стало популярным слоганом среди нейробиологов, критиковавших увлечение коннектомами (см. например, Bargmann 2012; Kopell et al., 2014). Но критика должна быть конструктивной: если не коннектом, то что? Мечты о создании транскриптомов отдельных нейронов появились и реализовались как раз на серотонергических МСС нейронах у *Aplysia* (Moroz et al., 2006). В этот период были получены транскриптомы десятков видов моллюсков и их нервных систем, что привело к построению новой филогении моллюсков (Kocot et al., 2011) и открытию новых нейрон-специфичных секреторных молекул (как раз по Сахарову).

В 2015 г. Российское когнитивное сообщество было возбуждено лекцией Д. А. Сахарова с названием “*Нейронная основа мозговых функций: коннектом versus транскриптом*” (Сахаров Д. А. 2015). Обосновывая важность дальнейшего развития транскриптомики, он писал: “*Мозг — это арена постоянных взаимодействий между эндогенно активными, химически разнородными секреторными клетками* (биологическими нейронами). Они соединяются в ансамбли для принятия совместных решений, обеспечивающих бесперебойное функционирование организма. В пределах ансамбля продукты нейронной секреции действуют контактно (‘синапсы’) и дистантно, а также физически (‘синаптическая передача’) и тонически (в составе трансмиссер-

ного ‘бульона’ межклеточной среды). В приложении к отдельной клетке транскриптом означает совокупность транскриптов всех генов, экспрессирующихся в ней в определенные моменты функционирования, то есть контекст-зависимо. Транскриптом определяет и связи клетки (куда тянуть отростки), и ее химизм (экспрессия генов, отвечающих за нейротрансмиттеры и за рецепторы к сигнальным молекулам). Короче, он дает наиболее полное описание фенотипических свойств нейрона в конкретный момент времени”.

ГИПОТЕЗА ПОЛИГЕНЕЗА НЕЙРОНОВ И ТРАНСКРИПТОМНЫЕ АТЛАСЫ НЕРВНЫХ СИСТЕМ

Наиболее значимые подтверждения гипотезы Д. Сахарова о связи происхождения нейрона и его трансмиссивного фенотипа получены на дрозофиле. Первая работа, выполненная на брюшной нервной цепочке, вышла в 2019-м с четким выводом, обозначенном в самом названии статьи “Neurotransmitter identity is acquired in a lineage-restricted manner in the *Drosophila* CNS” (Lacin et al., 2019). При развитии нервной системы *Drosophila* каждый нейробласт обычно производит две гемелинии нейронов, которые заметно отличаются по друг от друга по морфологии клеток и могут экспрессировать разные нейротрансмиттеры. Авторы создали полную карту трех нейротрансмиссивных типов нейронов (ацетилхолин, ГАМК или глутамат) для всей брюшной нервной цепочки в соответствии с их происхождением, т.е. отношением к одной из 32 известных гемелиний. Они не обнаружили ни одного случая использования нейронами более одного низкомолекулярного нейротрансмиссивтера. Хотя ацетилхолин-специфический ген ChAT транскрибируется во многих глутаматергических и ГАМКергических нейронах, эти транскрипты обычно не покидают ядро и не транслируются. Наиболее важным результатом своей работы авторы сочли формулировку простого правила: *все нейроны в пределах онтогенетической гемелинии используют один и тот же нейротрансмиссивтер*. Таким образом, идентичность нейротрансмиссивтера приобретается на уровне стволовых клеток. Это правило немедленно приобрело название “Правило Лацина” (Lacin’s law). Не стоит, наверное, ожидать от международного сообщества памяти о вышедших, в том числе в международных журналах (Sakharov 1974a, b), работах 50-летней

давности Д. А. Сахарова, выдвинувшего гипотезу о связи трансмиссивного фенотипа с происхождением нейрона.

Правило Лацина заинтересовало некоторых исследователей, и правильность этого постулата проверили по отношению к головному мозгу дрозофилы, а затем и по отношению к мозгу млекопитающих. Для мозга дрозофилы правило выполнялось, хоть с некоторыми оговорками. Так, в мае 2024 г. в журнале Cell вышла статья (Eckstein et al., 2024), в которой искусственные нейронные сети научили предсказывать трансмиссивный фенотип нейронов для шести нейротрансмиссивтеров (ацетилхолин, глутамат, ГАМК, серотонин, дофамин, октопамин) по электронно-микроскопическим фотографиям секретирующих окончаний. Точность такого предсказания достигала 87% для отдельных синапсов, 94% для нейронов и 91% для известных типов клеток во всем мозге *D. melanogaster*. Способность нейронных сетей делать такие предсказания свидетельствует о том, что существуют тонкие, но существенные различия между трансмиссивными фенотипами нейронов по морфологии секретирующих окончаний. Анализируя распределение нейротрансмиссивтеров в мозге, авторы показали, что нейроны, которые развиваются вместе, в основном экспрессируют только один из быстродействующих трансмиссивтеров (ацетилхолин, глутамат или ГАМК), то есть подтвердили правило Лацина.

Октябрь 2024-го отмечен мощным выступлением консорциума по изучению мозга дрозофилы, выпустившим три статьи в Nature (Dogkenwald et al., 2024; Lin et al., 2024; Schlegel et al., 2024). Они посвящены построению транскриптомного, коннектомного и онтогенетического атласа мозга дрозофилы. Эти данные позволили максимально уточнить выявленные выше закономерности формирования трансмиссивного фенотипа нейронов в онтогенезе. Показано, что примерно 120 идентифицированных нейробластов генерируют все нейроны мозга и часть зрительных проекционных нейронов в каждом (левом и правом) полушарии. Каждая из этих стволовых клеток определяется уникальным транскрипционным кодом и генерирует стереотипную линию путем упорядоченных асимметричных делений. Каждый нейробласт обычно производит две гемелинии, которые заметно отличаются по нейронной морфологии и могут экспрессировать разные нейротрансмиссивтеры, но нейроны в каждой ге-

милинии обычно экспрессируют один быстродействующий трансмиттер. Внутри гемилинии нейроны образуют отростки, которые собираются вместе в один плотный пучок, образуя общий тракт, который входит, пересекает и соединяет разные области нейропиля. Таким образом, не нейробласт, а именно гемилиния представляет собой естественную функциональную, а также, возможно, эволюционную единицу, с помощью которой можно изучать нервную систему. В этом выводе авторов интересен акцент не только на онтогенетической систематике нейронов, объединенных общим химизмом, но и на эволюционно древней предковой составляющей, которая предполагает наследуемость и сохранение трансмиттерных фенотипов в филогенезе, что очень близко идеям Д. А. Сахарова.

В отношении применимости правила Лацина к мозгу млекопитающих все оказалось сложнее. В работе на мозге обезьяны игрунки обыкновенной исследователи проанализировали транскриптомы более 2.4 миллиона клеток мозга, пытаясь ответить на вопросы: (1) кластеризуются ли транскриптомные профили нейронов в соответствии с секретлируемым трансмиттером (глутаматом или ГАМК) и (2) есть ли у нейронов с общим секреторным химизмом (снова идет речь только о глутамате и ГАМК) какие-то дополнительные общие молекулярные особенности, помимо нескольких генов, напрямую отвечающих за синтез и высвобождение нейротрансмиттера (Krienen et al., 2023). В препринте этой статьи был дан четкий ответ на оба вопроса: нет. В принятой к публикации версии статьи этот вывод представлен в смягченной форме: “Транскриптомная идентичность большинства типов нейронов формируется в большей степени происхождением в процессе развития, чем нейротрансмиттерным фенотипом” (Krienen et al., 2023). Однако сама постановка вопроса, как представляется, уже была обречена на отрицательный ответ. Даже на основании данных, полученных на дрозофиле в 2019 г., понятно, что правило “одна гемилиния развития — один нейротрансмиттер” не работает в обратном направлении.

Более полезную информацию о взаимосвязи трансмиттерного фенотипа и происхождения нейронов в мозге млекопитающих дала работа по созданию транскриптомного атласа мозга мыши (Yao et al., 2023). Это исследование, в отличие от ряда других работ с применением

транскриптомики одиночных клеток, позволило не просто получить представление о разнообразии нейронов мозга, но и создать пространственный атлас клеточных типов с разрешением в одну клетку. Атлас был создан путем объединения набора данных поклеточного секвенирования РНК (scRNA-seq), включающего около 7 миллионов профилированных клеток, и набора пространственных транскриптомных данных, состоящего примерно из 4.3 миллиона клеток, с использованием мультиплексированного метода устойчивой к ошибкам флуоресцентной гибридизации *in situ* (MERFISH). На его основе создана онлайн-платформа Allen Brain Cell Atlas для пространственной визуализации типов клеток: <https://portal.brain-map.org/atlasses-and-data/bkp/abc-atlas>. Эти данные позволяют ответить на вопросы о том, как транскриптомный ландшафт типов клеток в масштабах всего мозга связан с анатомической и структурной организацией и его онтологией, основанной на развитии и эволюции, а также о том, как скоординированная экспрессия генов определяет идентичность и функциональные свойства типов клеток.

Помимо очевидной значимости для последующего изучения мозга, эта гигантская работа уже позволила сделать целый ряд важных выводов, в том числе о связи химического фенотипа и онтогенетического происхождения нейрона. Ниже коротко перечислим наиболее значимые ее результаты.

В очередной раз подтвердилось представление о большом разнообразии нейронов, входящих в состав головного мозга. На основе изучения степеней удаленности клеток друг от друга по составу экспрессируемых генов авторы построили иерархически организованную систему, которая в настоящий момент включает 34 больших класса нейронов, в которые входят 338 подклассов, которые, в свою очередь, делятся на 1201 супертип, а те, в свою очередь, состоят из 5322 кластеров нейронов (рис. 3).

Одним из наиболее важных результатов этого исследования оказалось то, что клетки со сходными или идентичными транскриптомами часто локализованы в одном и том же регионе и имеют общее происхождение и микроокружение. И наоборот, транскриптомно более удаленные типы клеток находятся дальше друг от друга в пространстве, а также в другом окружении. Переходные типы клеток в транскриптомном

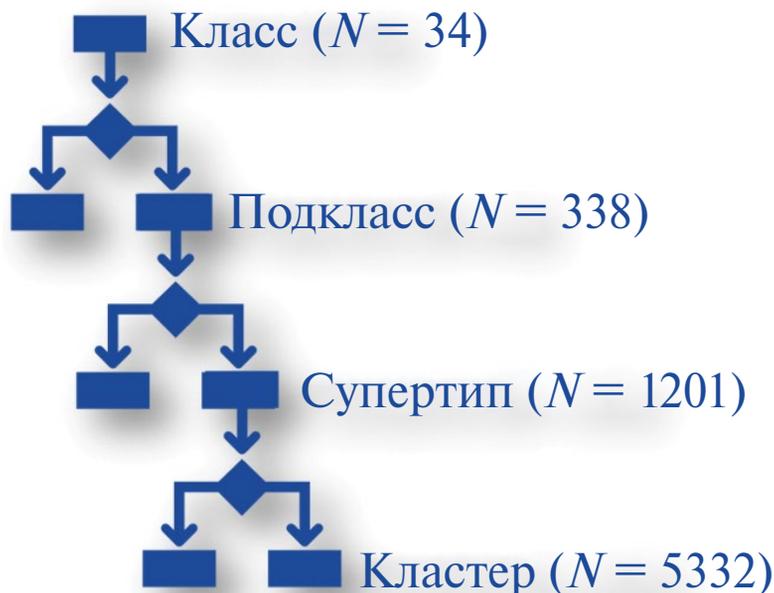


Рис. 3. Принцип иерархической классификации нейронов на основе сходства транскриптомов одиночных нейронов. Указано число групп на каждом иерархическом уровне (по данным статьи Yao et al., 2023).

пространстве также пересекают региональные границы. Сильное соответствие между транскриптомной и пространственной специфичностью и родством указывает на важность анатомической специализации и регионализации типов клеток, кроме того, повышает достоверность классификации типов клеток, основанной на транскриптоме.

Показаны уникальные особенности организации разных отделов мозга по разнообразию, размерам и удаленности друг от друга кластеров нейронов. Количество кластеров из разных областей мозга не коррелирует с количеством клеток, профилированных с помощью scRNA-seq, даже с поправкой на объемы областей мозга. В отдельных областях коры мозга обнаружили больше кластеров, чем во многих ядрах гипоталамуса, среднего и заднего мозга, что позволяет предположить, что в каждом кортикальном слое расположено больше типов клеток, чем в субрегионах гипоталамуса, среднего и заднего мозга. Кроме того, размеры кластеров (то есть количество клеток в каждом кластере) также различаются в разных областях мозга. Так, гипоталамус, средний мозг и задний мозг состоят из более мелких кластеров, что, вероятно, обусловлено небольшим размером ядер, характерных для этих областей. Выявилась отчетливая разница между антериальной/дорсальной и постериаль-

ной/вентральной частями мозга. Первая содержит сильно различающиеся между собой типы нейронов, тогда как вторая — многочисленные типы нейронов, более близких друг к другу. Выявленная дихотомия может отражать различия в эволюции этих структур мозга.

Наконец, возвращаемся к вопросу о нейротрансмиттерах. Было выявлено необычайное разнообразие и гетерогенность в экспрессии секреторных молекул: нейромедиаторов и нейропептидов. Связь транскриптомной (и онтогенетической) классификацией оказалась неоднозначна. Скорее всего, она отражает многоуровневость нейрональной интеграции и эволюции клеточных типов. Для некоторых нейротрансмиттеров, таких как серотонин, норадреналин и гистамин, действительно показана четкая принадлежность соответствующих нейронов лишь к определенным выразенно отличающимся кластерам, принадлежащими к конкретному подклассу нейронов. Эти транскмиттеры удовлетворяют правилу соответствия происхождения клетки ее транскмиттерной специфичности. Однако наиболее широко распространенные нейротрансмиттеры, глутамат и ГАМК, не только количественно доминируют среди других нейротрансмиттерных типов нейронов. Они к тому же гораздо шире распределены по отделам мозга, классам и клас-

терам нейронов, часто проникая и в консервативные кластеры дофаминовых, серотониновых и других нейронов.

Сходная картина наблюдается и при анализе распределения нейропептидов. Некоторые из них (например, *Cck*, *Pnoc*, *Adcyap1*, *Penk*, *Sst* и *Tac1*) экспрессируются чрезвычайно широко и на высоком уровне (подобно глутамату и ГАМК) в разных онтогенетических группах нейронов. Другие нейропептиды высоко экспрессируются только в одном или нескольких кластерах (например, *Avp*, *Agpr*, *Pomc*, *Pmch*, *Oxt*, *Rln3*, *Npw*, *Nps*, *Ucn*, *Hcrt*, *Gnrh1*, *Gcg* и *Pyy*).

Интересно, что состав коэкспрессируемых транмиттеров не выглядит случайным. Так, найдено большое число кластеров (а именно 62) с двойной экспрессией глутамат–ГАМК. Эти кластеры широко распространены в разных отделах мозга. Глутамат и ГАМК являются также и наиболее распространенными “добавочными” нейротрансмиттерами в сочетании с другими секреторируемыми молекулами. На этом фоне не выявлено ни одного нейрона, экспрессирующего одновременно маркеры серотонина и дофамина. Здесь следует напомнить, что способность синтезировать разные нейротрансмиттеры оценивали с помощью комбинаций маркерных генов. Однако недавние работы выявили выраженную посттрасляционную регуляцию транмиттерного фенотипа и у млекопитающих (Chen et al., 2023), указывающую на то, что оценка числа ко-транмиттеров на основе данных экспрессии маркерных генов может быть существенно завышена.

Таким образом, анализ связи транмиттерного фенотипа с формированием в онтогенезе нейронального фенотипа выявил у млекопитающих, в отличие от дрозофилы, довольно смешанную картину. С одной стороны, есть сигнальные молекулы (классические низкомолекулярные нейротрансмиттеры и пептиды), которые экспрессируются довольно строго в соответствии с линиями развития нейронов. Но на этом фоне глутамат, ГАМК и некоторые нейропептиды экспрессируются настолько широко и разнообразно, что правило “общее происхождение — общий нейротрансмиттер” кажется явно нарушенным. Хотя здесь следует разделять онтогенез и филогенез индивидуальных клеточных линий, а сравнительной инфор-

мации пока недостаточно для специфических предсказаний по типам нейронов.

Такая картина предполагает многофакторность формирования транмиттерного фенотипа нейронов у млекопитающих. То есть, помимо происхождения нейрона в эволюции и онтогенезе, на формирование транмиттер-специфических нейронов оказывали сильное влияние многие, пока не идентифицированные факторы. Одним из важных факторов может быть уже упомянутая динамическая функциональность гетерохимизма. Первое ограничение, которое обуславливает особенности нейрональной архитектуры: многофункциональный ансамбль не может работать на одинаковых нейронах, если он весь состоит из нейронов, имеющих общее происхождение в развитии. Под ансамблем понимается саморегулирующаяся система нейронов с обратными связями, способная контролировать определенную функцию (хороший пример — разнообразные центральные генераторы паттерна). Между тем в связи с возросшей нагрузкой на стабильность нейронального генома у теплокровных (Dyakonova, 2023) в их эволюции могла возникнуть необходимость быстро увеличить число нейронов за счет роста одной популяции нейронов общего происхождения. В таком случае формирование альтернативного гетерохимизма в такой популяции могло происходить уже вторично. Интересно, что “минимальный гетерохимизм” формируется главным образом за счет глутамат- и гамкергических нейронов. Работы 2021 г. позволяют предположить, почему (Moroz 2021; Moroz et al., 2021). Благодаря высокому содержанию глутамата как метаболита во всех живых клетках все, что требуется для формирования его транмиттерной функции, — это разблокировка экспрессии глутаматного везикулярного транспортера. Сходная “эпигенетическая простота” просматривается и в отношении ГАМК, которая синтезируется из глутамата. Здесь достаточно экспрессии всего двух генов для формирования транмиттерной функции.

Кроме того, на формирование транмиттерного ландшафта мозга в эволюции могла влиять разная биологическая стоимость разных транмиттерных фенотипов как в смысле энергии (Moroz et al., 2021), так и в смысле опасности для стабильности генома нейрона (Dyakonova, 2020; 2022; 2023). Действительно, с энергетической точки зрения глутамат является “дешевым” транмиттером. Он требует минимальных

затрат на синтез и позволяет к тому же использовать его метаболиты в качестве источника энергии (Moroz et al., 2021). Эпигенетической простотой и энергетической дешевизной глутамата как нейротрансмиттера можно объяснить выраженное увеличение доли глутаматергических нейронов головного мозга в эволюции млекопитающих (от 50 процентов у мыши до 80 у человека в сравнении с первичноротыми, у которых не более 10 процентов нейронов являются глутаматергическими) (Moroz et al., 2021). Можно предположить, что мозг стремительно увеличивался в эволюции млекопитающих, главным образом за счет увеличения доли глутаматергических нейронов. Кроме того, вторичное обогащение транзиттерного разнообразия новых популяций нейронов происходило, вероятно, за счет ГАМК и некоторых пептидов.

Таким образом, эволюционная траектория мозга формировалась совокупностью разных факторов. Сложное взаимодействие этих факторов может объяснять довольно неоднозначную связь происхождения нейрона, его химического фенотипа и функций у млекопитающих, в отличие от исследованных первичноротых, у которых эта связь хорошо показана.

В заключение следует сказать, что тема онто- и филогении транзиттерных фенотипов нейронов еще не закрыта, напротив, мы являемся свидетелями ее начавшегося возрождения на междисциплинарном этапе развития технологий и научных концепций. В ближайшие годы нас ждут данные по закономерностям формирования нейронального разнообразия у представителей всех 34 типов животных, включая Ctenophora, Porifera, Placozoa и Cnidaria, что существенно прояснит дальнейшие направления тестирования и развития гипотез Д. А. Сахарова.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа В. Е. Дьяконовой поддержана Государственным заданием ИБР РАН № 0088-2021-0008.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы внесли равный вклад в работу над статьей.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Артемов Н. М., Сахаров Д. А. Хачатур Седракович Коштоянц. М.: Наука, 1986.
- Боровягин В. Л., Сахаров Д. А. Ультраструктура гигантских нейронов тритонии. Атлас. М.: Наука, 1968.
- Вагнер Н. П. Беспозвоночные Белого моря. Зоологические исследования, произведенные на берегах Соловецкого залива в летние месяцы 1876, 1877, 1879 и 1882 г. Николаем Вагнером Почетным Членом и Ординарным Профессором Императорского С.-Петербургского Университета. Типография М. М. Стасюлевича, Санкт-Петербург, 1885 г.
- Вепринцев Б. Н., Крафтс И. В., Сахаров Д. А. Нервные клетки голожаберного моллюска *Tritonia diomedea* Bergh // Биофизика. 1964. Т. 9. С. 327–336.
- Коштоянц Х. С.. Основы сравнительной физиологии. Т. 2. Сравнительная физиология нервной системы. М.: Наука, 1957.
- Сахаров Д. А. Об автоматизме pedalных ганглиев у крылоногого моллюска *Clione limacina* L. // Научн. докл. высш. школы (биол. науки). 1960. № 3. С. 60–62.
- Сахаров Д. А. Гигантские нервные клетки у голожаберных моллюсков *Aeolidia papillosa* и *Dendronotus frondosus* // Журн. общ. биол. 1962. Т. 23. С. 308–311.
- Сахаров Д. А. Основания к построению системы нервных клеток // Журнал общей биологии. 1970. Т. 31. № 4. С. 449–457.
- Сахаров Д. А. Почему нейроны разные? // Природа. 1972, № 10. С. 52–62.
- Сахаров Д. А. Генеалогия нейронов. 1974. М.: Наука.
- Сахаров Д. А. Синаптическая и бессинаптическая модели нейронной системы // Простые нервные системы. Ч. 2. 1985. Казань: КГУ, С. 78–80.
- Сахаров Д. А. Множественность нейротрансмиттеров: функциональное значение // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1990. Т. 26. № 5. С. 733–741.
- Сахаров Д. А. Нейронная основа мозговых функций: коннектом versus транскриптом // Когнитивная наука в Москве: новые исследования. М.: Буки-Веди, 2015. С. 395–400.
- Сахаров Д. А., Каботянский Е. А. Интеграция поведения крылоногого моллюска дофамином и серото-

- нином // Журн. общ. биологии. 1986. Т. 47. № 2. С. 234–244.
- Alexeeva V., Borovikov D., Miller M.W., Rosen S.C., and Cropper E.C. Effect of a serotonergic extrinsic modulatory neuron (MCC) on radula mechanosensory afferent function in *Aplysia* // *J. Neurophysiol.* 1998. V. 80. P. 1609–1622.
<https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.4.1609>.
- Arendt D., Musser J.M., Baker C.V., Bergman A., Cepko C., Erwin D.H., Pavlicev M., Schlosser G., Widder S., and Laubichler M.D. The origin and evolution of cell types // *Nature Reviews Genetics.* 2016. V. 17. P. 744–775.
- Bach-y-Rita P., Illis L.S. Spinal shock: possible role of receptor plasticity and non synaptic transmission // *Paraplegia.* 1993. V. 31. N. 2. P. 82–87.
<https://doi.org/10.1038/sc.1993.14>
- Bargmann C.I. Beyond the connectome: How neuro-modulators shape neural circuits // *Bioessays.* 2012. V. 34. P. 458–465.
- Baysoy A., Bai Z., Satija R., and Fan. R. The technological landscape and applications of single-cell multi-omics // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2023. V. 24. P. 695–713.
<https://doi.org/10.1038/s41580-023-00615-w>
- Benfenati F., Agnati L.F. Communication and computation in the central nervous system // *Funct. Neurol.* 1991. V. 6. N. 3. P. 202–209.
- Chen N., Zhang Y., Rivera-Rodriguez E.J., Yu A.D., Hobin M., Rosbash M., Griffith L.C. Widespread post-transcriptional regulation of cotransmission // *Sci. Adv.* 2023. V. 9. N.22.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.adg9836>
- Dorkenwald S., Matsliah A., Sterling A.R. et al. Neuronal wiring diagram of an adult brain // *Nature.* 2024. V. 634. P. 124–138.
<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07558-y>
- Dyakonova V.E. Neuronal counter of the life span: does it exist? // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2020. V. 51. P. 197–200.
- Dyakonova V.E. Origin and evolution of the nervous system: new data from comparative whole genome studies of multicellular animals // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2022. V. 53. № 1. P. 55–64.
- Dyakonova V.E. DNA Instability in Neurons: Lifespan Clock and Driver of Evolution. // *Biochemistry (Moscow).* 2023. V. 88. № 11. P. 1719–1731.
<https://doi.org/10.1134/S0006297923110044>
- Eckstein N., Bates A.S., Champion A., Du M., Yin Y., Schlegel P. et al. Neurotransmitter classification from electron microscopy images at synaptic sites in *Drosophila melanogaster* // *Cell.* 2024. V. 187. N. 10. P. 2574–2594. e23.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.03.016>
- Fuxe K., Agnati L.F., Härfstrand A., Zoli M., von Euler G., Grimaldi R. et al. On the role of neuropeptide Y in information handling in the central nervous system in normal and physiopathological states. Focus on volume transmission and neuropeptide Y/alpha 2 receptor interactions // *Ann. NY Acad. Sci.* 1990. V. 579. P. 28–67.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb48351.x>
- Kocot K.M., Cannon J.T., Todt C., Citarella M.R., Kohn A.B., Meyer A. et al. Phylogenomics reveals deep molluscan relationships // *Nature.* 2011. V. 477. P. 452–456.
<https://doi.org/10.1038/nature10382>
- Koshtoyants Kh.S., Buznikov G.A., Manukhin B.N. The possible role of 5-hydroxytryptamine in the motor activity of embryos of some marine gastropods // *Comp. Biochem. Physiol.* 1961. V. 3. N. 1. P. 20–26.
- Krienen F.M., Levandowski K.M., Zaniewski H., Del Rosario R.C.H., Schroeder M.E., Goldman M. et al. A marmoset brain cell census reveals regional specialization of cellular identities // *Sci. Adv.* 2023. V. 9. N.41. eadk3986.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.adk3986>
- Kopell N.J., Gritton H.J., Whittington M.A., Kramer M.A. Beyond the connectome: the dynamome // *Neuron.* 2014. V. 83. N. 6. P. 1319–1328.
- Lacin H., Chen H.-M., Long X., Singer R. H., Lee T., Truman J.W. Neurotransmitter identity is acquired in a lineage-restricted manner in the *Drosophila* CNS // *Elife.* 2019. V. 8.
<https://doi.org/10.7554/eLife.43701>
- Lin A., Yang R., Dorkenwald S. et al. Network statistics of the whole-brain connectome of *Drosophila* // *Nature.* 2024. V. 634. P. 153–165.
<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07968-y>
- Moroz L.L. Evolutionary conservative and plastic elements in nervous system of the *Mollusca* // In: *Problems of Modern Biology.* Moscow University Press. 1986. pp. 19–23.
- Moroz L.L. Phylogenetic plasticity of neuronal cells in molluscan nervous systems // In: *Simple Nervous Systems.* D. Sakharov, ed. Nauka. 1988. pp. 198–202.
- Moroz L.L. Monoaminergic control of the respiratory behaviour in freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis* (L.) // In: *Signal Molecules and Behaviour.* W. Winlow, O.V. Vinogradova, and D.A. Sakharov, eds. Manchester University Press. 1991. pp. 101–123.
- Moroz L.L. On the independent origins of complex brains and neurons // *Brain Behav. Evol.* 2009. V. 74. P. 177–190.
<https://doi.org/10.1159/000258665>
- Moroz L.L. The genealogy of genealogy of neurons // *Commun. Integr. Biol.* 2014. V. 7. e993269.
<https://doi.org/10.4161/19420889.2014.993269>
- Moroz L.L. Neurosystematics and periodic system of neurons: model vs reference species at single-cell resolution // *ACS Chem. Neurosci.* 2018. V. 9. P. 1884–1903.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00100>
- Moroz L.L. Multiple origins of neurons from secretory cells // *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2021. V. 9. P. 669087.

- Moroz L.L. Brief History of Ctenophora // *Methods Mol. Biol.* 2024. V. 2757. P. 1–26.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3642-8_1
- Moroz L.L., Kocot K.M., Citarella M.R., Dosung S., Norekian T.P., Povolotskaya I.S. et al. The ctenophore genome and the evolutionary origins of neural systems // *Nature*. 2014. V. 510. P. 109–114.
<https://doi.org/10.1038/nature13400>
- Moroz L.L., Nikitin M.A., Poličar P.G., Kohn A.B., Romanova D.Y. Evolution of glutamatergic signaling and synapses // *Neuropharmacology*. 2021a. V. 199. P. 108740.
[https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90069-8)
- Moroz L.L., Romanova D.Y., Kohn A.B. Neural versus alternative integrative systems: molecular insights into origins of neurotransmitters // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2021b. V. 376. P. 1821. 20190762.
- Moroz L.L., Romanova D.Y. Alternative neural systems: What is a neuron? (Ctenophores, sponges and placozoans) // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 10. 1071961.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1071961>
- Moroz L.L., Collins R., Paulay G. Ctenophora: Illustrated Guide and Taxonomy // *Methods Mol. Biol.* 2024. V. 2757. P. 27–102.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3642-8_2
- Musser J.M., Schippers K.J., Nickel M., Mizzon G., Kohn A.B., Pape C. et al. Profiling cellular diversity in sponges informs animal cell type and nervous system evolution // *Science*. 2021. V. 374. P. 717–723.
<https://doi.org/10.1126/science.abj2949>
- Rózsa K.S., Dyakonova T.L. Interaction of serotonin and leu-enkephalin on the habituating central neurons of *Helix pomatia* L. *in situ* and *in vitro* // *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol.* 1989. V. 92. N.2. P. 361–370.
- Rosen S.C., Kupfermann I., Goldstein R.S., and Weiss K.R. Lesion of a serotonergic modulatory neuron in *Aplysia* produces a specific defect in feeding behavior // *Brain Res.* 1983. V. 260. P. 151–155.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90778-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90778-3)
- Rosen S.C., Kupfermann I., Goldstein R.S., and Weiss K.R. Lesion of a serotonergic modulatory neuron in *Aplysia* produces a specific defect in feeding behavior // *Brain Res.* 1983. V. 260. P. 151–155.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90778-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90778-3)
- Sakharov D.A. Evolutionary aspects of transmitter heterogeneity // *J. Neural. Transm.* 1974a. Suppl. 11. P. 43–59. PMID: 4152422.
- Sakharov D.A. Evolutionary aspects of transmitter heterogeneity // In: *Neurovegetative Transmission Mechanisms: Proceedings of the International Neurovegetative Symposium, (1974b)*. Tihany. June 19–24. P. 43–59. Vienna: Springer Vienna.
- Schlegel P., Yin Y., Bates A.S. et al. Whole-brain annotation and multi-connectome cell typing of *Drosophila* // *Nature*. 2024. V. 634. P. 139–152.
<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07686-5>
- Tarashansky A.J., Musser J.M., Khariton M., Li P., Arendt D., Quake S.R., Wang B. Mapping single-cell atlases throughout Metazoa unravels cell type evolution // *Elife*. 2021. V. 10. e66747.
- Whelan N.V., Kocot K.M., Moroz T.P., Mukherjee K., Williams P., Paulay G., Moroz L.L., Halanych K.M. Ctenophore relationships and their placement as the sister group to all other animals // *Nat. Ecol. Evol.* 2017. V. 1. P. 1737–1746.
<https://doi.org/10.1038/s41559-017-0331-3>
- Yao Z., van Velthoven C.T.J., Kunst M., Zhang M., McMillen D., Lee C. et al. A high-resolution transcriptomic and spatial atlas of cell types in the whole mouse brain // *Nature*. 2023. V. 624. N.7991. P. 317–332.
<https://doi.org/10.1038/s41586-023-06812-z>

Genealogy of Neurons: 50 Years of Reconstructing the Evolution of Nervous Systems

L. L. Moroz^{1, *}, V. E. Dyakonova^{2, **}

¹University of Florida, Florida, USA

*²N.K. Koltsov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia*

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

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

On November 11, Dmitry Antonovich Sakharov (1930–2024), a unique person, mentor, scientist and poet, passed away. This year, the world community celebrates the 50th anniversary of the publication of his book “Genealogy of Neurons”, which had a profound influence on several generations of neuroscientists. The hypotheses, strategies and experimental approaches presented in this book remain relevant and inspiring today. We outline Sakharov’s hypotheses on neuronal polyphyly and the functional significance of neuronal heterogeneity in light of recent comparative, genomics, and single-cell transcriptomic data.

Keywords: origins of neurons, homologous neurons, neurotransmitters, glutamate, GABA, nervous system evolution, neurogenesis, single-cell transcriptomics, brain