

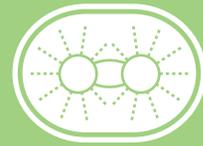
ISSN 0475-1450

Том 54, Номер 3

Май - Июнь 2023



ОНТОГЕНЕЗ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 54, номер 3, 2023

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ экспрессии генов-маркеров яичника выявил антагонистические эффекты серотонина и андростендиона на функциональный статус клеток гранулезы мыши в первичной культуре

Н. М. Алёшина, В. Р. Русанова, Л. А. Мальченко, Ю. В. Храмова, Ю. О. Никишина, В. В. Кондукторова, А. Ю. Евстифеева, Д. А. Никишин 183

Экспрессия гомолога *engrailed* у личинок и ювенилей аннелиды *Alitta virens* раскрывает особенности формирования сегментов из зоны роста

А. И. Кайров, В. В. Козин 196

Резкое увеличение экспрессии генов субъединиц и активности протеасом в онтогенезе гортани связано с развитием плоскоклеточного рака

И. В. Кондакова, Е. А. Сиденко, Т. М. Астахова, Г. В. Какурина, Е. Е. Серeda, О. В. Черемисина, Е. Л. Чойнзонов, Н. П. Шарова 205

Влияние температурного фактора на жизненный цикл инвазионного вида *Gmelinoides fasciatus* (Crustacea: Amphipoda) в Онежском озере

А. И. Сидорова 214

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Особенности распределения ГАМК- и нитроксидергических структур субфорникального органа крыс-самцов породы Вистар в раннем постнатальном развитии

В. А. Разенкова, Д. Э. Коржевский 226

Получение нулевой мутации гена *toothrin* методом направленной гомологичной рекомбинации у *Drosophila melanogaster*

Е. Е. Куваева, Д. А. Куликова, О. Б. Симонова, И. Б. Мерцалов 232

Contents

Vol. 54, No. 3, 2023

RESEARCH PAPERS

- Analysis of the Ovarian Marker Genes Expression Revealed the Antagonistic Effects of Serotonin and Androstenedione on the Functional State of Mouse Granulosa Cells in Primary Culture
N. M. Alyoshina, V. R. Rousanova, L. A. Malchenko, Yu. V. Khramova, Yu. O. Nikishina, V. V. Konduktorova, A. Y. Evstifeeva, and D. A. Nikishin 183
- Expression of the *engrailed* Homologue in Larvae and Juveniles of the Annelid *Alitta virens* Characterizes the Formation of Segments from the Growth Zone
A. I. Kairov and V. V. Kozin 196
- Sharp Increase in Expression of Subunit Genes and Activity of Proteasomes in Laryngeal Ontogeny Is Associated with the Development of Squamous Cell Carcinoma
I. V. Kondakova, E. A. Sidenko, T. M. Astakhova, G. V. Kakurina, E. E. Sereda, O. V. Cheremisina, E. L. Choyznov, and N. P. Sharova 205
- Influence of Temperature on the Life Cycle of Invasive Species *Gmelinoides fasciatus* (Crustacea: Amphipoda) in Lake Onego
A. I. Sidorova 214
-

SHORT COMMUNICATIONS

- Structural Organization of GABA- and Nitroxidergic Systems of Subfornical Organ in Wistar Rats Postnatal Development
V. A. Razenkova and D. E. Korzhevskii 226
- Generation of a Null Mutation of the *toothrin* Gene by Targeted Homologous Recombination in *Drosophila melanogaster*
E. E. Kuvaeva, D. A. Kulikova, O. B. Simonova, and I. B. Mertsalov 232
-
-

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-МАРКЕРОВ ЯИЧНИКА ВЫЯВИЛ АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СЕРОТОНИНА И АНДРОСТЕНДИОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ МЫШИ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ

© 2023 г. Н. М. Алёшина^a, В. Р. Русанова^b, Л. А. Мальченко^a, Ю. В. Храмова^b,
Ю. О. Никишина^a, В. В. Кондукторова^b, А. Ю. Евстифеева^b, Д. А. Никишин^{a, b, *}

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

^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

*e-mail: d.nikishin@idbras.ru

Поступила в редакцию 01.04.2023 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Получение первичной культуры клеток гранулезы необходимо для комплексного исследования нормальной функции и патологий яичника. В данной работе мы предлагаем оптимизированный протокол получения первичной культуры клеток гранулезы мыши в наиболее функционально активном состоянии. Полученная культура была использована для выявления влияния андростендиона и серотонина на экспрессию мРНК маркеров яичников, отражающих функциональное состояние клеток гранулезы. Морфофункциональный анализ яичника после стимуляции гонадотропином сывотки жеребой кобылы (ГСЖК) показал, что 48 ч после инъекции – оптимальный срок для получения клеток гранулезы в наиболее активном функциональном состоянии. Анализируя набор из 14 маркерных генов функционального состояния яичников, мы выявили, что андростендион ингибирует экспрессию маркеров клеток кумулюса и ранних, незрелых клеток гранулезы, при этом уровень экспрессии генов, характерных для зрелого состояния гранулезы, увеличивается. С помощью метода иммуноцитохимии мы показали, что клетки гранулезы экспрессируют серотонинергические рецепторы и транспортер серотонина SERT. Анализ экспрессии генов-маркеров яичника показал, что серотонин повышает экспрессию генов, характеризующих дифференцировку клеток гранулезы в клетки кумулюса. Данные, полученные в работе, позволяют заключить, что серотонин и андростендион оказывают антагонистическое действие на функциональное состояние клеток гранулезы мыши в первичной культуре *in vitro*.

Ключевые слова: клетки гранулезы, первичная культура, яичник, гены маркеры, ГСЖК, серотонин, андростендион, LCA

DOI: 10.31857/S0475145023030023, **EDN:** ZQXTMI

ВВЕДЕНИЕ

Слой клеток гранулезы представляет собой ключевой компонент развивающегося фолликула яичника, служащий посредником между развивающимся ооцитом и тканями материнского организма. Первичная культура клеток гранулезы широко используется как модель для экспериментального изучения функции яичников в норме и при патологии (Galas, 2012). При изучении этих клеток важно иметь в виду, что они способны изменять свою функцию, дифференцируясь в процессе роста фолликула, благодаря динамическому взаимодействию с созревающим ооцитом и окружающими стромальными тканями (Alam et al., 2020; Morris et al., 2022). Таким образом, оптимизация

условий получения первичной культуры клеток гранулезы и стандартизация экспериментальных протоколов является важнейшим условием получения воспроизводимых результатов.

Являясь одним из классических нейротрансмиттеров, серотонин выполняет целый ряд регуляторных функций вне нервной системы, как в эмбриональном развитии, так и во взрослом организме (Vuznikov, 2007). В частности, для многих животных, в том числе млекопитающих, показано участие серотонина в регуляции роста и созревания женских половых клеток (Terranova et al., 1990; Tanaka et al., 1993; Sheng et al., 2005). Серотонин в физиологических концентрациях определяется в яичниках млекопитающих, в изолиро-

ванных ооцитах и клетках кумулюса (Amireault et al., 2005), а также в фолликулярной жидкости (Bódis et al., 2020). На различных моделях показано, что серотонин стимулирует активность фолликулярных клеток. У хомяков и крыс серотонин стимулирует синтез эстрадиола в преовуляторных фолликулах, культивируемых *in vitro*, при этом специфические антагонисты серотониновых рецепторов отменяют этот эффект (Terranova et al., 1990; Tanaka et al., 1993). Стимулирующее действие серотонина наблюдается в том числе и на клетках гранулезы человека (Graveleau et al., 2000; Korpan et al., 2004). Серотонин, наряду с другими нейротрансмиттерами и нейрогормонами, вовлечен в патогенез таких заболеваний репродуктивной системы, как синдром поликистоза яичников (Szeliga et al., 2022) и опухоли яичника (Qin et al., 2021). Конкретные механизмы влияния серотонина на функциональное состояние клеток гранулезы могут сильно различаться у разных видов и требуют более детального изучения. В фолликулярных клетках мыши показана экспрессия мРНК не только ферментов синтеза и деградации серотонина, мембранного и везикулярного транспортера, но и нескольких типов серотониновых рецепторов (Nikishin et al., 2018a).

Существует ряд маркерных генов, о которых известно, что они количественно отражают функциональное состояние клеток гранулезы. Активность стероидогенеза в клетках оценивается по уровню экспрессии ими ферментов синтеза андрогенов и эстрогенов. Ген *Cyp17a1* кодирует фермент синтеза андрогенов, которые являются субстратом для синтеза эстрогенов ароматазой. Ароматаза в свою очередь кодируется геном *Cyp19a1*, уровень экспрессии мРНК которого в фолликуле коррелирует с концентрацией эстрадиола в крови и может быть использован в качестве показателя способности клеток гранулезы синтезировать эстрогены (Grzesiak et al., 2012). Ген *Star* кодирует стероидогенный острый регуляторный белок, который транспортирует холестерин к внутренним мембранам митохондрий. Этот процесс является лимитирующей стадией стероидогенеза, и уровень экспрессии *Star* легко изменяется под действием факторов, регулирующих этот синтез (Niswender, 2002; Fang et al., 2015). Важнейшими количественными показателями зрелости фолликулярных клеток являются уровни экспрессии генов рецепторов гонадотропных гормонов. Относительное содержание как транскриптов, так и белковых продуктов генов рецептора фолликулостимулирующего гормона *Fshr* и рецептора лютеинизирующего гормона *Lhr* увеличивается в процессе фолликулогенеза и достигает высоких значений в нормальных преовуляторных фолликулах, в то время как в атретических фолликулах этот уровень остается низким (Bao et al., 1997). В качестве маркеров функцио-

нальной активности клеток гранулезы также используют уровни экспрессии мРНК генов гиалуронатсинтетазы *Has2*, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста *Igfbp4*, простагландин-эндопероксидсинтетазы *Ptgs2* и лиганда сигнального пути Hedgehog *Ihh* (Zhen et al., 2014). Для клеток гранулезы растущих фолликулов характерна способность к пролиферации. Для того, чтобы охарактеризовать пролиферативную активность клеток гранулезы может быть использована количественная оценка уровня экспрессии стандартных маркеров – ядерного антигена пролиферирующих клеток *Pcna*, маркера пролиферации *Ki-67* (*Mki67*), а также циклинов *Ccnd1* и *Ccnd2* (Han et al., 2013; Zhen et al., 2014). Помимо прочего, в культуре клеток гранулезы необходимо контролировать степень лютеинизации. Так, уровень экспрессии скорость лимитирующего фермента синтеза стероидных гормонов *Cyp11a1* повышается при активации синтеза прогестерона в крупных лютеоцитах (Raporport et al., 1998). В клетках желтого тела по сравнению с клетками гранулезы также увеличивается количество мРНК генов *Star* и *Lhr* (Lee et al., 2013).

В данной работе мы предложили оптимизированный протокол получения первичной культуры клеток гранулезы мыши в функционально активном состоянии и выявили влияние андростендиона и серотонина на экспрессию маркеров яичников, отражающих функциональное состояние клеток гранулезы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В экспериментах использовали самок мышей линии C57BL/6, содержащихся в ЦКП биологических моделей Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Животных содержали в контролируемых условиях (22–24°C и фотопериод 14L:10D). Мышам давали свободный доступ к пище и воде. Гормональную стимуляцию для роста фолликулов проводили путем введения гонадотропина сыворотки жеребой кобылы (ГСЖК) (“Фоллимаг”, Мосагрон, Москва, Россия) по 5 МЕ/мышь в 15–16 ч дня. Яичники выделяли через 12–60 ч после инъекции ГСЖК для дальнейшего исследования. Для молекулярно-генетического анализа интактный контрольный образец получали одновременно с началом эксперимента (0 ч).

Первичная культура клеток гранулезы

Яичники мышей, стимулированных ГСЖК, предварительно инкубировали с 6 мМ ЭГТА и 0.5 М сахарозы (Sèdes et al., 2013) и получали клетки путем пункции фолликулов иглой инсулинового шприца (26.5 G). Агрегаты клеток и ооциты удалялись путем фильтрации клеточной суспензии

через 40-мкм нейлоновый клеточный фильтр (BD Biosciences). Жизнеспособность клеток гранулезы определяли окрашиванием трипановым синим. Клетки гранулезы (0.9×10^6 на лунку в 6-луночном планшете) высевали на ночь в DMEM/F-12 с 10% FBS при 95% влажности и 5% CO₂. Андростендион (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) добавляли в культуральную среду в концентрации 100 нМ, оптимальной для поддержания функциональной активности клеток гранулезы (Corredor et al., 1983). После культивирования в течение ночи в бессывороточной среде клетки гранулезы обрабатывали 1 мкМ серотонин-креатининсульфата (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в течение 48 часов с однократной сменой среды.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Образцы культуральной среды объемом 20 мкл растворяли в 200 мкл 0.1 N HClO₄ с 25 пмоль/мл 3,4-дигидроксибензиламина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) с последующим центрифугированием при 2000 g в течение 20 мин. В приготовленных образцах измеряли концентрацию серотонина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием по описанному протоколу (Kim et al., 2019).

ПЦР в реальном времени

Тотальную РНК выделяли из яичников или клеток с использованием реагента для выделения РНК (Евроген, Москва, Россия). Затем проводили обработку ДНКазой I типа (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), после чего 1 мкг тотальной РНК из каждой группы подвергали обратной транскрипции с использованием случайных гексадеоксинуклеотидов и обратной транскриптазы MMLV (Евроген, Москва, Россия). Реакцию ПЦР в реальном времени проводили для количественного определения уровней мРНК генов интереса с использованием системы StepOne-Plus (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и набора qPCRmix-HS SYBR + HighROX (Евроген, Москва, Россия). В каждом эксперименте уровни экспрессии выбранных генов в каждой группе нормализовали относительно референсного гена с использованием метода $2^{-\Delta Ct}$ при одинаковых пороговых значениях для всех генов. В качестве референсных генов использовали *Rps18* и *Tbp*, для которых показана стабильная экспрессия в ткани яичника (Nikishin et al., 2018). Анализ кривой плавления и проверка правильной температуры плавления продукта ПЦР (табл. 1) использовались для оценки специфичности реакции. Все последовательности праймеров, исполь-

зованные для проведения количественной ПЦР, перечислены в табл. 1.

Вестерн-блоттинг

Образцы ткани яичника гомогенизировали в буфере RIPA, а концентрацию белка измеряли с помощью набора для анализа белка BCA Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Образцы денатурировали в буфере Лэммли в течение 30 мин при 37°C. Белки разделяли с помощью 10% SDS-PAGE, а затем переносили на мембрану Immun-Blot® PVDF (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США) при помощи электрофореза. Мембраны блокировали 5% БСА в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали с первичными антителами (табл. 2) в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки в TBST мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (табл. 2). После отмывки в TBST конъюгированные антитела визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции в 0.1 М Трис-HCl, pH 8.5, 12.5 мМ люминола, 2 мМ кумаровой кислоты и 0.09% H₂O₂. Интенсивность проявления белка измеряли с использованием системы визуализации ChemiDoc™ и программного обеспечения Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США). Уровни экспрессии белковых продуктов генов нормализовали по белку GAPDH.

Иммуногистохимия и флуоресцентная микроскопия

Яичники фиксировали в 4% параформальдегиде (PFA) в течение ночи при 4°C, затем инкубировали в течение 1 ч в 15% сахарозе, после чего в течение ночи в 30% сахарозе и заключали в Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Чикаго, Япония). Криосрезы толщиной 20 мкм получали на криостате CM1900 (Leica Biosystems, Дир-Парк, Иллинойс, США), и каждый пятый срез помещали на покрытое силаном предметное стекло. Образцы окрашивали FITC-конъюгированным агглютинином *Lens Culinaris* (FITC-LCA, 1 : 1000) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), а ДНК окрашивали с помощью 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США).

Клетки гранулезы, адгезированные к покровным стеклам, покрытым полилизинем, фиксировали в 4% параформальдегиде (PFA) в течение ночи при 4°C. Затем эти стекла отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и пермеабилizировали в 0.1% Triton X-100 в течение 15 мин. Образцы инкубировали в блок-растворе, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), а затем

Таблица 1. Специфические олигонуклеотиды, использованные для проведения ПЦР в реальном времени

Название гена	NCBI Gene ID	Последовательности прямых (F) и обратных (R) праймеров, 5' → 3'	$T_{отж}$, °C	Длина продукта, п.н.	$T_{пл}$ продукта, °C
<i>Adamdec1</i>	58860	F: TGGCTCTTGTTGCACTGATGT R: CTTGAAAATGAGAACGGCTGAC	61.0 61.1	162	82.9
<i>Ccnd1</i>	12443	F: GACACCAATCTCCTCAACGACC R: GGCCACGATTTTCCGCATG	62.7 66.3	129	86.1
<i>Ccnd2</i>	12444	F: GCGGTGTTTCGTCACTGCTA R: AACTATACGGCCTTTTCCTCTCA	61.5 61.2	174	78.8
<i>Cyp11a1</i>	13070	F: GCCTGGAGCCATCAAGAACT R: GAAAAGCGGAATAGGTCATCACT	61.1 61.3	138	82.8
<i>Cyp17a1</i>	13074	F: CGGTGGCCCCCTTGCTCA R: GGCTGGTCCCATTCATTTTATCGTG	69.2 70.2	133	84.0
<i>Cyp19a1</i>	13075	F: TCTCCTCATCAAACCAACATCTTCT R: CAGTTGCAAAATCCATACAGTCTTCC	64.3 65.0	164	80.2
<i>Fshr</i>	14309	F: TGCTACACCCACATCTACCTCACA R: GGATCTTGGCCTTGGACACAGT	63.9 64.6	187	85.3
<i>Has2</i>	15117	F: GCGGAAGAAGGGACAACA R: TGCGGTGCCACAATACTG	58.5 58.7	143	82.9
<i>Igfbp4</i>	16010	F: GAAAGGAATGGGGTGAGGAAG R: GGTGGTGGGCAACTAGAAAGATA	62.0 62.0	195	86.0
<i>Ihh</i>	16147	F: CAACTACAATCCCGACATCATCTT R: TCACCCGCAGTTTCACACC	61.8 61.9	140	86.4
<i>Lhcgr (Lhr)</i>	16867	F: CTCTCACCTATCTCCCTGTCAAAGTAA R: TGTAAGAACACCCGGGTTCAATGT	63.4 65.2	197	81.7
<i>Mgp</i>	17313	F: CGCCGAGGAGCCAAATA R: AACCCGCAGAAGGAAGGA	59.8 59.8	162	83.4
<i>Mki67 (Ki67)</i>	17345	F: CGGGATAAAGAAAAACGAGAAG R: TTGGCCCCGAGATGTAGATT	59.9 61.4	100	81.2
<i>Nr5a2</i>	26424	F: CGAGGGGGCAGAAATAAGTT R: TGGAGGCGGAATGAATGTT	60.5 60.6	172	84.6
<i>Pcna</i>	18538	F: CCGAGACCTTAGCCACATTG R: GTTACCGCCTCCTCTTCTTATC	60.1 60.4	144	81.6
<i>Ptgs2</i>	19225	F: CCCTCCGGTGTGTCCTT R: CCTGCAGCATTTTTCATCTTGTA	61.6 61.8	200	78.8
<i>Rps18</i>	20084	F: AAGAAAATTCGAGCCCATAGAGG R: TAACAGCAAAGGCCAGAGACT	62.8 62.6	138	86.1
<i>Runx2</i>	12393	F: ATGATGACACTGCCACCTCTG R: CTGGGTAGTGCAATTCGTGGG	60.1 63.1	165	86.3
<i>Star</i>	20845	F: GCCACTTTTCTGTCCCTTAT R: CTGCCCTCGCTCACCTTA	59.6 59.0	163	80.8
<i>Tbp</i>	21374	F: GTAGCGGTGGCGGGTATCT R: CGTCTTCAATGTTCTGGGTATCT	61.9 61.3	120	84.1

Таблица 2. Антитела, использованные для иммуногистохимии и вестерн-блоттинга

Антиген	Конъюгат	Животное, в котором произведены	Клональность	Производитель, каталожный номер	Разведение
Cyp19a1	Нет	Кролик	Поликлональные	ab18995, Abcam, Кэмбридж, Великобритания	ИЦХ: 1 : 1000 ВБ: 1 : 10000
Fshr	Нет	Кролик	Поликлональные	ab150557, Abcam, Кэмбридж, Великобритания	ИЦХ: 1 : 1000 ВБ: 1 : 10000
Sert	Нет	Коза	Поликлональные	ab130130, Abcam, Кэмбридж, Великобритания	ИЦХ: 1 : 1000
Htr1d	Нет	Кролик	Поликлональные	PA5-95901, Thermo Fisher Scientific, Уолтэм, Массачусетс, США	ИЦХ: 1 : 1000
Htr2a	Нет	Кролик	Поликлональные	PA5-95288, Thermo Fisher Scientific, Уолтэм, Массачусетс, США	ИЦХ: 1 : 1000
Htr7	Нет	Кролик	Поликлональные	SAB46000178, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США	ИЦХ: 1 : 1000
Gapdh	Нет	Кролик	Моноклональные	2118, Cell Signaling Technology, Массачусетс, США	ВБ: 1 : 20000
IgG кролика	CF™ 568	Осел	Поликлональные	SAB4600076, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США	ИЦХ: 1 : 1000
IgG козы	CF™ 633	Осел	Поликлональные	SAB46000128, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США	ИЦХ: 1 : 1000
IgG кролика	HRP	Коза	Поликлональные	111-035-144, Jackson ImmunoResearch Labs, Уест Гроув, Пенсильвания, США	ВБ: 1 : 50000

последовательно инкубировали с первичными и вторичными антителами (табл. 2). Для исследования специфичности антител использовался контроль без добавления первичных антител. ДНК контрастировали с DAPI.

Образцы помещали в монтирующую среду Fluoroshield (Abcam, Кембридж, Великобритания) и анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM880 (Carl Zeiss AG, Оберкохен, Германия). Микрофотографии анализировали с использованием программного обеспечения FIJI ImageJ.

Морфологический анализ

При окрашивании красителем FITC-LCA на микрофотографиях хорошо различаются грани-

цы фолликулов (рис. 1а). Для анализа выбирали только растущие фолликулы с ооцитом, окруженным одним или несколькими слоями клеток гранулезы с округлыми ядрами, при этом исключали примордиальные фолликулы с ооцитами, окруженными клетками прегранулезы. Фолликулы, попавшие на срез, но не содержащие ооцитов, не учитывались.

На микрофотографиях общая площадь фолликула определялась вдоль границы клеток теки и гранулезы (см. рис. 1б). Диаметр фолликула (D фолл.) рассчитывали по общей площади фолликула как диаметр Хейвуда. Площадь гранулезы (S гран.) рассчитывали, как общую площадь фолликула за вычетом площади ооцита и полостей.

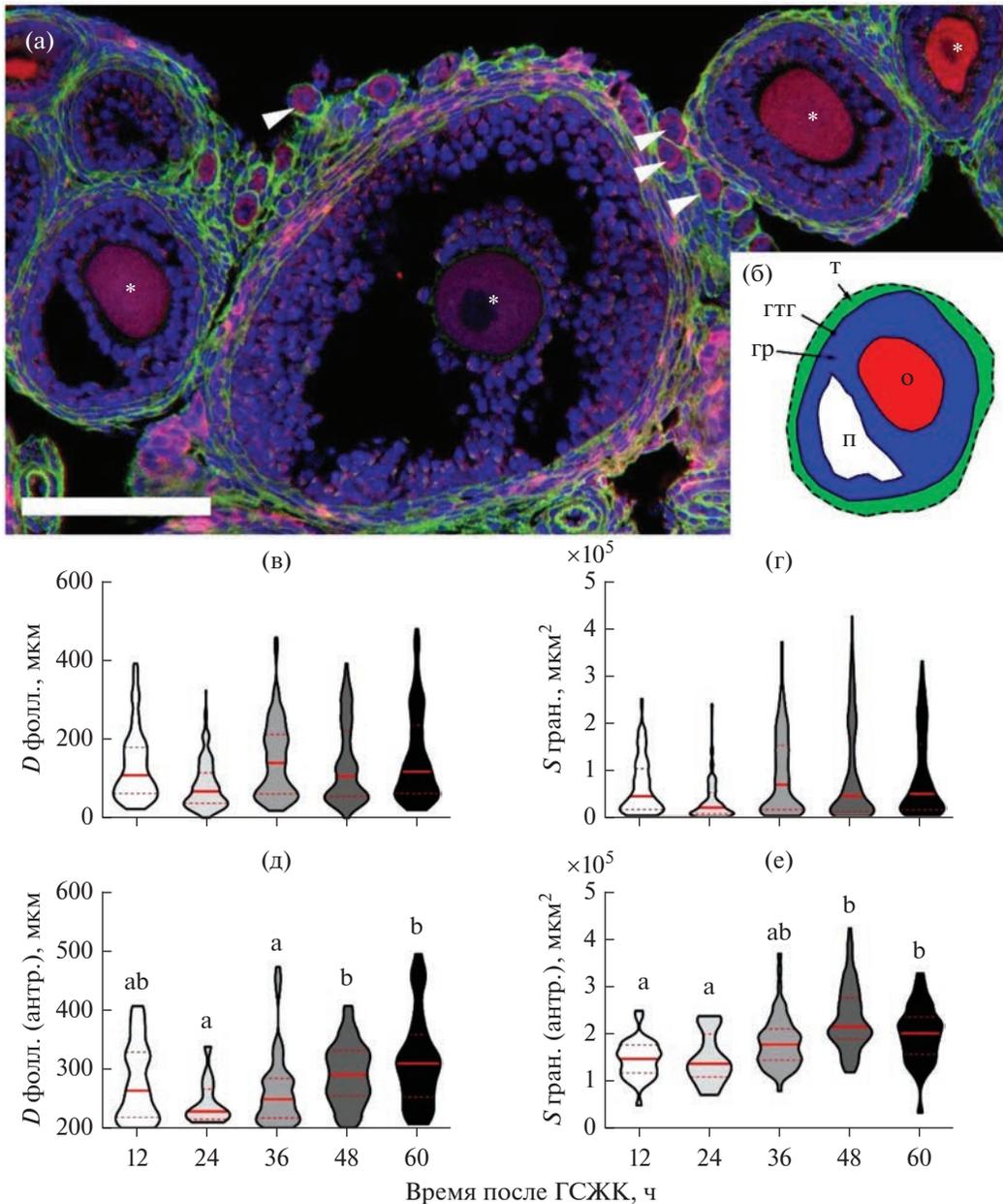


Рис. 1. Морфометрический анализ яичников после стимуляции ГСЖК. (а) Конфокальная микрофотография криосреза ткани яичника, окрашенного с помощью FITC-LCA (зеленый) и DAPI (синий), а также маркированного антителами против Ddx4 (красный). Примордиальные фолликулы отмечены стрелками, ооциты растущих фолликулов отмечены звездочками. Масштабная линейка: 100 мкм. (б) Схематическое изображение зон фолликула, отражающее методику расчета морфометрических параметров. т – слой клеток теки, гр – слой клеток гранулезы, гтг – граница клеток теки и гранулезы, о – ооцит, п – полость фолликула. (в–е) Графики, демонстрирующие распределение морфологических параметров растущих фолликулов после стимуляции ГСЖК. (в) Диаметр фолликула. (г) Зона клеток гранулезы – площадь, которую занимают клетки гранулезы на срезе фолликула. (д) Диаметр антрального фолликула. (е) Зона клеток гранулезы антрального фолликула. Медиана с межквартильным размахом отмечена красным. Разные буквы обозначают статистическую значимость между группами при $p < 0.05$ по критерию Крускала–Уоллиса с множественными сравнениями Данна.

Статистический анализ

Результаты были статистически обработаны с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Сан-Диего, Кали-

форния, США). Критерием значимости считали $p < 0.05$. Корреляционный анализ и построение коррелограммы выполнены с использованием программного обеспечения R (версия 3.2.4).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оптимальный срок получения клеток гранулезы в наиболее активном функциональном состоянии — 48 ч после инъекции ГСЖК

Оптимизация метода выделения клеток гранулезы после гормональной стимуляции необходима для получения первичной культуры в наиболее активном функциональном состоянии. Для того, чтобы оценить динамику фолликулогенеза и выявить сроки, когда возможно выделение максимального количества клеток, было проведено морфологическое исследование яичников мышей через 12, 24, 36, 48 и 60 ч после инъекции ГСЖК. Морфометрические параметры растущих фолликулов яичников измеряли на изображениях криосрезов яичников, окрашенных красителем LCA-FITC, который выявил границы зоны, занимаемой клетками гранулезы (рис. 1). Численные показатели диаметра фолликулов и площади, занятой клетками гранулезы на срезе фолликула, показаны на рис. 1в и 1г. По этим параметрам не было обнаружено существенных различий. Однако на диаграмме на рис. 1г прослеживается тенденция к увеличению площади гранулезы к 48 ч после инъекции ГСЖК. Для дальнейшего анализа отобрали только те фолликулы, диаметр которых составлял более 200 мкм. Этот размер соответствует стадии перехода от преантрального фолликула к антральному, когда в фолликуле только начинает формироваться полость и он приобретает чувствительность к гонадотропным гормонам гипофиза и, следовательно, может реагировать на сигнал ГСЖК. Диаметры и площади гранулезы антральных фолликулов показаны на рис. 1д и 1е. Эти параметры оказались значительно выше через 48 и 60 ч после инъекции по сравнению с более ранними периодами. Площадь, занимаемая клетками гранулезы антральных фолликулов, достигает максимального значения через 48 ч после инъекции ГСЖК.

Немаловажное значение для воспроизводимости результатов, полученных в экспериментах на первичной культуре, имеет функциональное состояние клеток, выделенных из динамически развивающихся фолликулов яичников. Мы провели количественное исследование экспрессии мРНК генов-маркеров функционального состояния яичников с целью уточнения оптимального времени выделения клеток гранулезы после стимуляции ГСЖК. Выбранный набор из 14 маркерных генов включал маркеры пролиферации (*Pena*, *Mki67*), циклины D, важные для регуляции клеточного цикла клеток гранулезы (*Ccnd1*, *Ccnd2*), маркеры ранней гранулезы (*Ihh*, *Igfbp4*) и клеток кумулюса (*Has2*, *Ptgs2*), маркер лютеинизации (*Star*), основные ферменты стройдогенеза (*Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*) и рецепторы гонадотропных гормонов (*Fshr*, *Lhr*). Динамика относительной экспрессии

этих генов в яичнике после стимуляции ГСЖК представлена на рис. 2а.

Большинство ключевых функциональных маркеров, таких как *Cyp17a1*, *Lhr*, *Cyp19a1* и *Fshr*, достигают максимальной экспрессии к 48–60 ч после стимуляции. К 60 ч после инъекции экспрессия *Has2* и *Igfbp4* достоверно снижается, а экспрессия *Star* и *Cyp11a1* резко возрастает, что свидетельствует о постовуляторном статусе яичника и начала лютеинизации фолликулярных клеток. Кроме того, анализ методом вестерн блот уровней экспрессии белков рецептора к ФСГ и ароматазы, имеющих решающее значение для гонадотропной чувствительности и синтеза эстрадиола в фолликуле, подтвердил, что максимальный уровень их экспрессии достигается к 48 ч после инъекции ГСЖК (рис. 2в). В совокупности полученные данные позволяют сделать вывод о том, что 48 ч после стимуляции ГСЖК являются оптимальным временем для получения клеток гранулезы в наиболее активном функциональном состоянии.

Данные, полученные в эксперименте, были проанализированы для выявления наличия корреляции экспрессии выбранных маркерных генов в яичнике (рис. 2б). Выявлено, что эти гены можно объединить в четыре кластера: (I) *Has2* и *Ptgs2* — маркеры клеток кумулюса; (II) *Igfbp4*, *Ihh*, *Ccnd2*, *Cyp19a1*, *Fshr*, *Cyp17a1*, *Lhr* — маркеры клеток гранулезы, характерные для фазы фолликулярного роста; (III) *Cyp11a1* и *Star* — маркеры стероидогенной активности и лютеинизации; (IV) *Mki67*, *Pena* и *Ccnd1* — маркеры, ассоциированные с пролиферативной активностью. Такой набор генов мы использовали в дальнейшем для анализа экспериментального влияния на функциональное состояние клеток гранулезы в условиях первичной культуры *in vitro*.

Подобранный набор функциональных маркеров позволил оптимизировать условия культивирования клеток гранулезы *in vitro*.

Исходя из вышеописанных результатов была выделена первичная культура клеток гранулезы через 48 ч после стимуляции ГСЖК. Анализ чистоты полученной культуры проводили с помощью исследования экспрессии мРНК маркеров клеток гранулезы и теки методом ПЦР в реальном времени (рис. 3з). Клетки, полученные в результате этого протокола, имеют выраженную экспрессию мРНК маркеров клеток гранулезы: *Runx2*, *Nr5a2*, *Fshg* и *Cyp19a1*. В то же время клетки первичной культуры не экспрессируют мРНК маркеров клеток теки: *Mgr* и *Adamdec1*, а *Cyp17a1* — на очень низком уровне. Экспрессия рецептора к ФСГ и ароматазы на уровне белка была подтверждена иммуноцитохимическим окрашиванием при помощи специфических антител (рис. 3а и 3б).

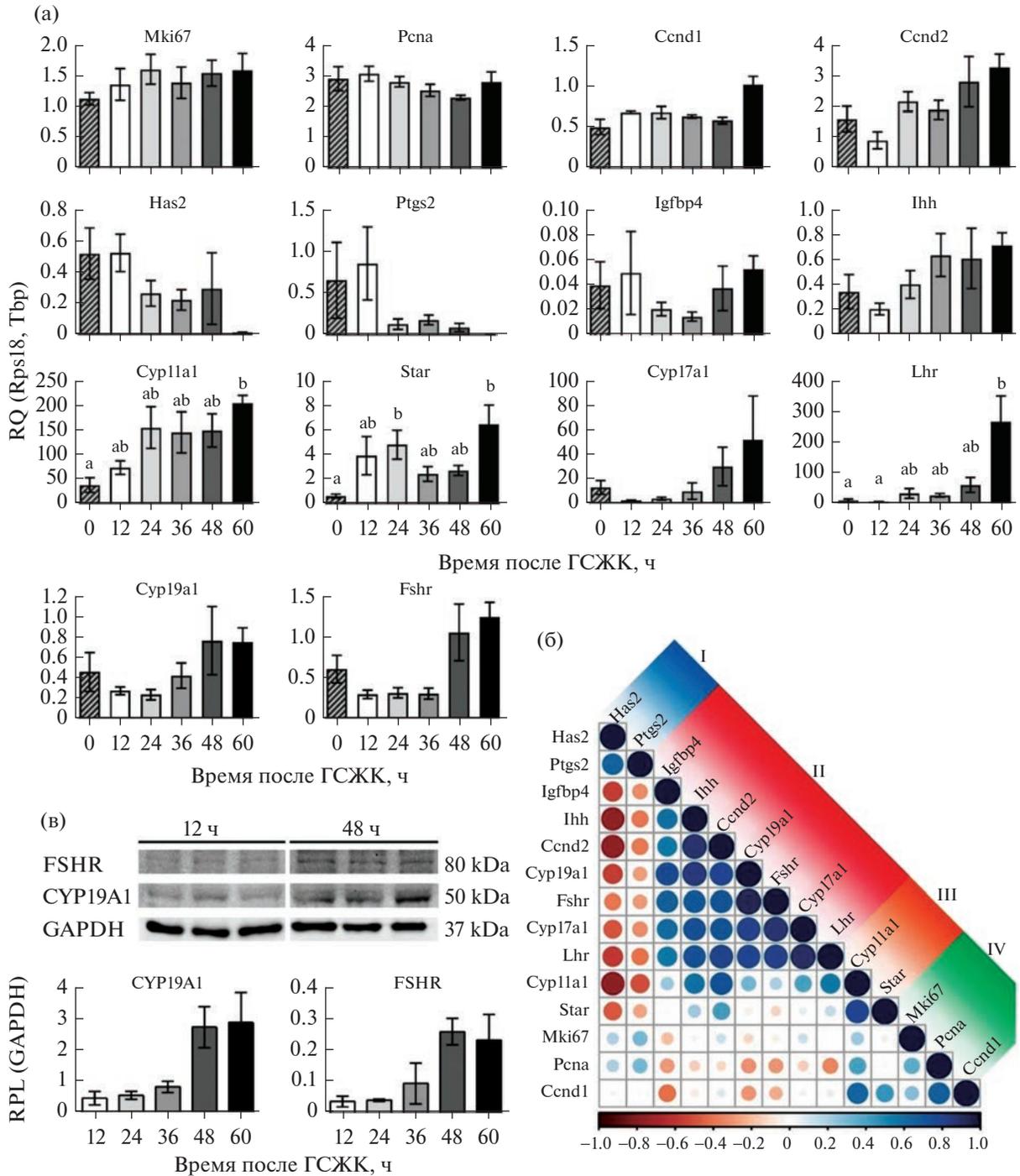


Рис. 2. Экспрессия маркеров функционального состояния яичников после стимуляции ГСЖК. (а) Экспрессия мРНК маркерных генов функционального состояния яичников. $M \pm SEM$, разные буквы обозначают статистическую значимость между группами при $p < 0.05$ по критерию Краскела–Уоллиса с множественными сравнениями Данна. (б) Корреляционная матрица экспрессии мРНК, основанная на непараметрическом методе ранговой корреляции Спирмена. Положительные корреляции отмечены синим цветом, а отрицательные — красным, размер точки отражает статистическую значимость корреляции. (в) Вестерн-блот анализ уровней экспрессии белков FSHR и CYP19A1. Относительный уровень экспрессии белка (RPL) рассчитывали относительно GAPDH ($M \pm SEM$).

Выбранный набор маркерных генов функционального состояния яичников использовали для оценки влияния андростендиона на функциональное состояние клеток гранулы в первичной

культуре. Полученные результаты (рис. 3к) показывают, что экспрессия мРНК Cyp19a1, Fshr и Lhr увеличивается, в то время как Has2, Ptgs2 и Igfbp4 снижается в клетках гранулы в ответ на

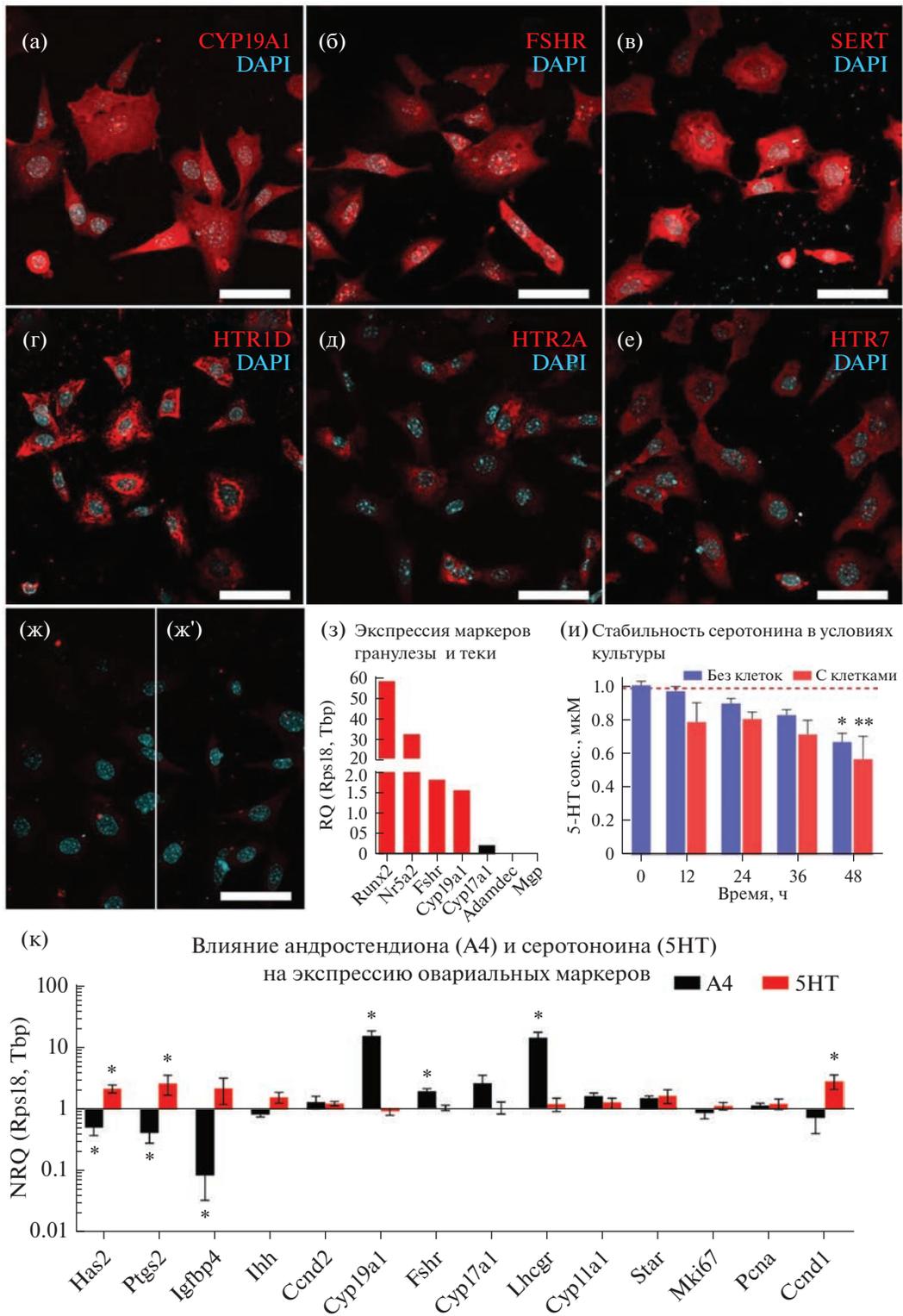


Рис. 3. Анализ полученной первичной культуры клеток гранулезы. (а–ж) Иммуноцитохимическое маркирование клеток гранулезы специфическими антителами к маркерам клеток гранулезы CYP19A1 (а) и FSHR (б); и против ключевых компонентов серотонинергической системы SERT (в), HTR1D (г), HTR2A (д) и HTR7 (е); отрицательный контроль с добавлением вторичных антител против IgG кролика (ж) и козы (ж'). Ядра окрашивали DAPI. Масштабная линейка: 50 мкм. (з) Экспрессия маркеров мРНК клеток теки и гранулезы. (и) Временная динамика изменения содержания серотонина в культуральной среде, измеренная с помощью метода ВЭЖХ. М ± SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по критерию Краскела–Уоллиса с множественными сравнениями Данна. (к) Влияние добавления 100 нМ андростендиона и 1 мкМ серотонина на экспрессию маркерных генов яичников в первичной культуре клеток гранулезы. М ± SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по критерию знаковых рангов Уилкоксона.

добавление в среду 100 нМ андростендиона. Таким образом, андростендион ингибирует экспрессию маркеров кумулюса и ранних, незрелых клеток гранулезы, и при этом стимулирует экспрессию генов стероидогенеза, характерных для зрелого состояния клеток гранулезы.

Клетки гранулезы экспрессируют компоненты серотонинергической системы в условиях культивирования in vitro

Полученную культуру клеток гранулезы также исследовали на предмет экспрессии важнейших компонентов серотонинергической системы, которые могут опосредовать действие серотонина на их функциональное состояние. Мы провели иммуоцитохимическое окрашивание рецепторов серотонина HTR1D, HTR2A и HTR7, а также мембранного транспортера SERT. Иммуомаркирование подтверждает экспрессию этих белков в клетках гранулезы (рис. 3в–3е). Эти мембранные белки, как и FSHR, в значительной степени выявляются в цитоплазме, что может свидетельствовать об их активной рециркуляции или инактивированном состоянии в клетках гранулезы.

Важным методическим моментом является стабильность серотонина в среде в условиях культивирования с исследуемыми клетками. Мы изучили динамику изменения содержания серотонина в культуральной среде при его добавлении в концентрации 1 мкМ к первичной культуре клеток гранулезы (рис. 3и). Полученные результаты свидетельствуют о том, что концентрация серотонина снижается довольно медленно, достигая примерно 0.8 мкМ через 24 ч и 0.65 мкМ через 48 ч культивирования. Исходя из полученных данных, в последующих экспериментах проводили смену питательной среды с серотонином один раз в сутки.

Серотонин влияет на экспрессию функциональных маркеров в клетках гранулезы in vitro

Мы изучили влияние серотонина на функциональное состояние клеток гранулезы на разработанной модели первичной культуры клеток гранулезы с использованием набора маркерных генов функционального состояния яичников. Экспрессию функциональных маркеров изучали методом ПЦР в реальном времени после культивирования клеток гранулезы с 1 мкМ серотонина или в его отсутствии в течение 48 ч. Мы показали, что среди 14 исследованных маркеров только три гена достоверно изменяют уровень экспрессии мРНК в ответ на серотонин: маркеры клеток кумулюса *Has2* и *Ptgs2*, а также регулятор клеточного цикла циклин D (*Ccnd1*) (рис. 3к). Таким образом, серотонин влияет на дифференцировку клеток гранулезы в состояние клеток кумулюса, что может играть роль в процессе роста и созревания фолликулов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полноценные исследования функции яичника в норме и патологии невозможны без использования первичной культуры клеток гранулезы. Для изучения слабых модулирующих и количественных эффектов особенно важно получить первичную культуру клеток в наиболее функционально активном состоянии. В случае клеток гранулезы важно учитывать не только то, насколько в них активен стероидогенез, но и пролиферация, а также какова степень ее зрелости. Проведенный детальный морфофункциональный анализ позволяет сделать вывод о том, что оптимальным временем для получения большого количества функционально активных клеток гранулезы является 48 ч после стимуляции роста фолликулов с помощью ГСЖК. Именно в это время наблюдается как максимальный размер фолликулов, так и экспрессия ключевых ферментов стероидогенеза и рецепторов гонадотропных гормонов, при этом экспрессия маркеров лютеинизации остается на низком уровне. На других, более ранних сроках после инъекции профили экспрессии маркерных генов демонстрируют более низкий уровень функциональной активности.

В группе без инъекции ГСЖК экспрессия большинства маркерных генов имеет большой разброс, что отражает неоднородность этой группы, а следовательно, и отсутствие синхронизации. Интересно, что наибольший разброс как в морфометрическом, так и в молекулярно-генетическом анализе наблюдается через 12 ч после инъекции ГСЖК. Причиной этого является недостаточное время для синхронизации яичников, изначально неоднородных по функциональному состоянию. Действительно, 46–48 ч после стимуляции ГСЖК – наиболее распространенный период в протоколах получения клеток гранулезы мыши (Qian et al., 2022). В этой работе мы показали, что такой временной интервал оправдан, на основании морфометрических параметров роста фолликулов, динамики экспрессии маркерных генов яичников и более высокого уровня экспрессии ароматазы и рецептора к ФСГ в ткани яичника.

Для проведения морфометрического анализа с использованием флуоресцентной микроскопии применяли протокол окрашивания криосрезов яичников красителем FITC-LCA. Этот конъюгированный лектин окрашивает ткань яичника таким образом, что на полученных изображениях легко обнаружить все фолликулы и четко различить границу между клетками гранулезы и теки (рис. 1а). Хотя лектины уже давно используются для флуоресцентного окрашивания тканей и отдельных типов клеток (KleinJan et al., 2014), в этой работе LCA впервые используется для анализа морфологии яичника мыши. Описанный метод

имеет большие преимущества, в частности благодаря скорости и простоте протокола.

Концентрация серотонина, добавляемого к клеткам (1 мкМ), была выбрана в соответствии с его содержанием в фолликулярной жидкости на поздних стадиях созревания фолликула (Bódis et al., 2020). Важным методологическим моментом является вопрос об устойчивости серотонина в среде в условиях эксперимента. Прямые измерения серотонина методом ВЭЖХ показали, что в культуральной среде он медленно окислялся, а его концентрация снижалась примерно на 10% каждые 12 ч (рис. 3и). В то же время в присутствии клеток гранулы его содержание снижается более резко – на 20% уже через 2 ч, при этом в дальнейшем снижение замедляется. Причина такой динамики заключается в том, что клетки гранулы способны захватывать серотонин из окружающей среды и активно метаболизировать его (Alyoshina et al., 2022). В обоих случаях серотонин достаточно стабилен при 37°C в течение большого количества часов, а статистически значимое снижение концентрации (более чем на четверть) происходит только к 48 ч культивирования.

Набор из 14 маркерных генов яичников оказался удобным инструментом для экспериментального изучения состояния ткани яичника и клеток гранулы. Этот молекулярно-генетический подход оказался не только проще в исполнении, но и информативнее традиционного морфометрического анализа. Проведенный кластерный анализ разбил используемые маркерные гены на четыре группы, которые соответствуют кластерам преантральных/кумуляных, антральных/муральных, лютеинизированных и пролиферирующих клеток гранулы, выявленным в результате анализа транскриптомов единичных клеток яичника (Morris et al., 2022). Такая кластеризация маркерных генов может помочь использовать меньшее количество генов на первом этапе крупных скрининговых исследований. С помощью этого набора мы показали, что андростендион не только положительно влияет на маркеры функциональной активности клеток гранулы в культуре, что подтверждает ранее полученные данные (Hamel et al., 2005), но и ингибирует их дифференцировку в клетки кумулюса. Механизм такого эффекта андростендиона объясняется использованием этого гормона клетками гранулы в качестве субстрата для синтеза эстрадиола, к которому эти клетки чувствительны благодаря экспрессии рецепторов к эстрогенам (Liu et al., 2017).

Серотонин является нейромедиатором и гормоном, для которого известно участие в регуляции работы женской репродуктивной системы (Dubé et al., 2007; Nikishin et al., 2021). Используя разработанную модель первичной культуры клеток гранулы в сочетании с анализом экспрессии разработанном наборе маркерных генов, мы показали, что серотонин влияет на экспрессию ге-

нов, характеризующих дифференцировку клеток гранулы в состояние клеток кумулюса. Среди них было обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии мРНК гиалуронансинтазы 2 (Has2), которая кодирует ключевой белок, ответственный за синтез гиалуроновой кислоты (гиалуронана), основного компонента внеклеточного матрикса ооцит-кумуляного комплекса (Chen et al., 1993). Простагландинсинтаза 2 (Pgs2), также известная как циклооксигеназа 2 (Cox2), является одним из факторов, ответственных за чувствительность клеток кумулюса к гормональным сигналам, а также этот белок необходим для нормальной овуляции и дальнейшего раннего развития эмбриона (Lim et al., 1997). Кроме того, в ответ на серотонин в клетках гранулы повышается уровень экспрессии регулятора клеточного цикла циклина D1. Было показано, что циклин D1 экспрессируется на более высоком уровне в клетках кумулюса, чем в пристеночных, муральных клетках гранулы (Wigglesworth et al., 2015), и даже может служить количественным показателем при оценке компетентных для дальнейшего развития ооцит-кумуляных комплексов (Xiong et al., 2019).

Наблюдаемые эффекты могут быть опосредованы работой компонентов серотонинергической системы, экспрессия которых показана для клеток гранулы – рецепторов HTR1D, HTR2A и HTR7 или транспортером SERT. Антагонистические эффекты серотонина и андростендиона могут быть вызваны пересечением молекулярных сигнальных путей (Xiang et al., 2022), или могут быть связаны с взаимодействиями на уровне мембранных рецепторов или внутриклеточной передачи в сигнальных путях (Tang et al., 2019; Voskaert et al., 2021).

Полученные данные согласуются с представлением об эволюционно консервативной роли серотонина как фактора созревания ооцитов. Можно предположить, что серотонин, который способен накапливаться в созревающих ооцитах (Nikishin et al., 2019), является поддерживающим агентом, необходимым для функционирования клеток кумулюса. Обобщая, можно заключить, что серотонин и андростендион оказывают антагонистическое действие на функциональное состояние клеток гранулы мыши в первичной культуре *in vitro*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Часть работы, в которой производился подбор оптимальных условий получения первичной культуры клеток гранулы, поддержана Государственным зада-

нием № 0088-2021-0009 для Д.А. Никишина, Н.М. Алёшиной, Л.А. Мальченко и Ю.О. Никишиной. Исследование роли серотонина было поддержано грантом РНФ № 22-74-10009 для Д.А. Никишина, Н.М. Алёшиной, Ю.О. Никишиной, В.В. Кондукторовой, и А.Ю. Евстифеевой.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными до и после экспериментальных вмешательств соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Д.А. Никишин и Ю.О. Никишина придумали и разработали эксперименты. Н.М. Алёшина, Л.А. Мальченко, В.П. Русанова, Ю.О. Никишина и В.В. Кондукторова поставили эксперименты и провели анализ. А.Ю. Евстифеева провела кластерный анализ. Н.М. Алёшина написала черновую версию статьи, Д.А. Никишин редактировал статью и готовил к публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alam M.H., Miyano T.* Interaction between growing oocytes and granulosa cells *in vitro* // *Reprod. Med. Biol.* 2020. V. 19. № 1. P. 13–23.
- Alyoshina N.M., Tkachenko M.D., Malchenko L.A. et al.* Uptake and metabolism of serotonin by granulosa cells form a functional barrier in the mouse ovary // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 23.
- Amireault P., Dubé F.* Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. // *Biol. Reprod.* 2005. V. 73. № 2. P. 358–365.
- Bao B., Garverick H.A., Smith G.W. et al.* Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. // *Biol. Reprod.* 1997. V. 56. № 5. P. 1158–1168.
- Bockaert J., Bécamel C., Chaumont-Dubel S. et al.* Novel and atypical pathways for serotonin signaling // *Fac. Rev.* 2021. V. 10.
- Bódis J., Sulyok E., Kószegi T. et al.* Serum and follicular fluid levels of serotonin, kisspeptin, and brain-derived neurotrophic factor in patients undergoing *in vitro* fertilization: an observational study // *J. International Medical Research.* 2020. V. 48. № 4. P. 030006051987933.
- Buznikov G.A.* Preneuronal transmitters as regulators of embryogenesis. Current state of problem // *Russ. J. Dev. Biol.* 2007. V. 38. № 4. P. 213–220.
- Chen L., Russell C.T., Larsen W.J.* Functional significance of cumulus expansion in the mouse: Roles for the pre-ovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass // *Mol. Reprod. Dev.* 1993. V. 34. № 1. P. 87–93.
- Corredor A., Flickinger G.L.* Hormonal regulation of progesterone secretion by cultured mouse granulosa cells // *Biol. Reprod.* 1983. V. 29. № 5. P. 1142–1146.
- Dubé F., Amireault C.* Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos // *Life Sci.* 2007. V. 81. № 25–26. P. 1627–1637.
- Fang L., Chang H.-M., Cheng J.-C. et al.* Growth differentiation factor-8 decreases StAR expression through ALK5-mediated Smad3 and ERK1/2 signaling pathways in luteinized human granulosa cells // *Endocrinology.* 2015. P. en20151461.
- Galas J.F.* Primary culture of ovarian cells for research on cell interactions in the hormonal control of steroidogenesis // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 806. P. 227–249.
- Graveleau C., Paust H.J., Schmidt-Grimminger D. et al.* Presence of a 5-HT7 receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000. V. 85. № 3. P. 1277–1286.
- Grzesiak M., Knapczyk-Stwora K., Duda M. et al.* Elevated level of 17 β -estradiol is associated with overexpression of FSHR, CYP19A1, and CTNNB1 genes in porcine ovarian follicles after prenatal and neonatal flutamide exposure // *Theriogenology.* 2012. V. 78. № 9. P. 2050–2060.
- Hamel M., Vanselow J., Nicola E.S. et al.* Androstenedione increases cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid transcripts in nonluteinizing bovine granulosa cells // *Mol. Reprod. Dev.* 2005. V. 70. № 2. P. 175–183.
- Han Y., Xia G., Tsang B.K.* Regulation of cyclin D2 expression and degradation by follicle-stimulating hormone during rat granulosa cell proliferation *in vitro* // *Biol. Reprod.* 2013. V. 88. № 3. P. 57.
- Kim A.R., Nodel M.R., Pavlenko T.A. et al.* Tear fluid catecholamines as biomarkers of the Parkinson's disease: A clinical and experimental study // *Acta Naturae.* 2019. V. 11. № 4. P. 99–103.
- KleinJan G., Buckle T., van Willigen D. et al.* Fluorescent lectins for local *in vivo* visualization of peripheral nerves // *Molecules.* 2014. V. 19. № 7. P. 9876–9892.
- Koppan M., Bodis J., Verzar Z. et al.* Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system // *Endocrine.* 2004. V. 24. № 2. P. 155–159.
- Lee L., Asada H., Kizuka F. et al.* Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats // *Endocrinology.* 2013. V. 154. № 1. P. 458–470.
- Lim H., Paria B.C., Das S.K. et al.* Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice // *Cell.* 1997. V. 91. № 2. P. 197–208.
- Liu W., Xin Q., Wang X. et al.* Estrogen receptors in granulosa cells govern meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes in mammals // *Cell Death Dis.* 2017. V. 8. № 3. P. e2662.
- Morris M.E., Meinsohn M.-C., Chauvin M. et al.* A single-cell atlas of the cycling murine ovary // *Elife.* 2022. V. 11.
- Nikishin D.A., Khramova Y.V., Bagayeva T.S. et al.* Expression of components of the serotonergic system in follic-

- ulogenesis and preimplantation development in mice // Russ. J. Dev. Biol. 2018a. V. 49. № 3. P. 184–192.
- Nikishin D.A., Filatov M.A., Kiseleva M.V. et al. Selection of stable expressed reference genes in native and vitrified/thawed human ovarian tissue for analysis by qRT-PCR and Western blot // J. Assist. Reprod. Genet. 2018b. V. 35. № 10. P. 1851–1860.
- Nikishin D.A., Alyoshina N.M., Semenova M.L. et al. Analysis of expression and functional activity of aromatic L-amino acid decarboxylase (DDC) and serotonin transporter (SERT) as potential sources of serotonin in mouse ovary // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 12. P. 3070.
- Nikishin D.A., Khranova Y.V., Alyoshina N.M. et al. Oocyte-mediated effect of serotonin on the functional status of granulosa cells // Russ. J. Dev. Biol. 2021. V. 52. № 2. P. 97–104.
- Niswender G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone // Reproduction. 2002. V. 123. № 3. P. 333–339.
- Qian J., Zhu R., Yan R. et al. Isolation of mouse ovarian follicles for single-cell RNA-seq and *in vitro* culture // STAR Protoc. 2022. V. 3. № 3. P. 101537.
- Qin X., Li J., Wang S. et al. Serotonin/HTR1E signaling blocks chronic stress-promoted progression of ovarian cancer // Theranostics. 2021. V. 11. № 14. P. 6950–6965.
- Rapoport R., Sklan D., Wolfenson D. et al. Antioxidant capacity is correlated with steroidogenic status of the corpus luteum during the bovine estrous cycle // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1380. № 1. P. 133–140.
- Sèdes L., Leclerc A., Moindjie H. et al. Anti-Müllerian hormone recruits BMPR-IA in immature granulosa cells // PLoS One. 2013. V. 8. № 11. P. 81551.
- Sheng Y., Wang L., Liu X.S.J.S. et al. A serotonin receptor antagonist induces oocyte maturation in both frogs and mice: evidence that the same G protein protein is responsible for maintaining meiosis arrest in both species // J. Cell. Physiol. 2005. V. 202. № 3. P. 777–786.
- Szeliga A., Rudnicka E., Maciejewska-Jeske M. et al. Neuroendocrine determinants of polycystic ovary syndrome // International J. Environmental Research and Public Health. 2022. V. 19. № 5. P. 3089.
- Tanaka E., Baba N., Toshida K. et al. Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor // Life Sci. 1993. V. 53. № 7. P. 563–570.
- Tang Z.R., Zhang R., Lian Z.X. et al. Estrogen-receptor expression and function in female reproductive disease // Cells. 2019. V. 8. № 10. P. 1123.
- Terranova P.F., Uilenbroek J.T., Saville L. et al. Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles *in vitro*: effects of experimentally induced atresia // J. Endocrinol. 1990. V. 125. № 3. P. 433–438.
- Wigglesworth K., Lee K.B., Emori C. et al. Transcriptomic diversification of developing cumulus and mural granulosa cells in mouse ovarian follicles // Biol. Reprod. 2015. V. 92. № 1. P. 23–24.
- Xiang G. et al. Control of Gαq signaling dynamics and GPCR cross-talk by GRKs // Sci. Adv. 2022. V. 8. № 47. P. 3363.
- Xiong X.R., Lan D.L., Li J. et al. Identification of differential abundances of mRNA transcript in cumulus cells and CCND1 associated with yak oocyte developmental competence // Anim. Reprod. Sci. 2019. V. 208. P. 106135.
- Zhen Y.-H., Wang L., Riaz H. et al. Knockdown of CEBPβ by RNAi in porcine granulosa cells resulted in S phase cell cycle arrest and decreased progesterone and estradiol synthesis // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2014. V. 143. P. 90–98.

Analysis of the Ovarian Marker Genes Expression Revealed the Antagonistic Effects of Serotonin and Androstenedione on the Functional State of Mouse Granulosa Cells in Primary Culture

N. M. Alyoshina¹, V. R. Rousanova², L. A. Malchenko¹, Yu. V. Khranova², Yu. O. Nikishina¹, V. V. Konduktorova², A. Y. Evstifeeva², and D. A. Nikishin^{1, 2, *}

¹Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

²Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Moscow, Russia

*e-mail: d.nikishin@idbras.ru

Primary culture of granulosa cells is a prerequisite for a complete study of the normal functioning of the ovary and its pathologies. In this work, we selected the optimal protocol for obtaining a primary culture of mouse granulosa cells in the most functionally active state and revealed the effects of androstenedione and serotonin on the expression of ovarian markers that reflect the functional status of granulosa cells. The morpho-functional analysis of the ovary after PMSG stimulation revealed that 48 hours after PMSG stimulation is the optimal time for obtaining granulosa cells in the most active functional state. Using the set of 14 ovarian functional state marker genes we reveal that androstenedione inhibits cumulus and immature granulosa markers but stimulates genes characteristic of the mature state of granulosa. At the same time, granulosa cells express serotonergic receptors and transporter SERT. The ovarian marker genes expression analysis revealed that serotonin affects the expression of genes characterizing the differentiation of granulosa cells towards cumulus cells. Summarizing, we can conclude that serotonin and androstenedione have an antagonistic effect on the functional state of mouse granulosa cells in primary culture *in vitro*.

Keywords: granulosa, cumulus, primary culture, ovary, marker genes, PMSG, serotonin, androstenedione, LCA

ЭКСПРЕССИЯ ГОМОЛОГА *ENGRAILED* У ЛИЧИНОК И ЮВЕНИЛЕЙ АННЕЛИДЫ *ALITTA VIRENS* РАСКРЫВАЕТ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СЕГМЕНТОВ ИЗ ЗОНЫ РОСТА

© 2023 г. А. И. Кайров^а, В. В. Козин^{а, *}

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

*e-mail: v.kozin@spbu.ru

Поступила в редакцию 15.01.2023 г.

После доработки 03.05.2023 г.

Принята к публикации 04.05.2023 г.

Эволюционное происхождение сегментации до сих пор остается загадкой для исследователей. У членистоногих одним из важнейших и наиболее консервативных участников генетической программы сегментации является ген *engrailed*. Ортологи этого гена были выявлены у аннелид, однако их роль неоднозначна: если у одних видов их экспрессия предшествует разделению тела на сегменты, то у других – нет. Мы изучили экспрессию *engrailed* у нереидной полихеты *Alitta virens* в ходе метаморфоза и формирования первых постларвальных сегментов. Полученные данные свидетельствуют в пользу возможной вовлеченности этого гена в процесс формирования сегментов из зоны роста у *A. virens*. На личиночных стадиях *engrailed* экспрессируется в нейроэктодермальных клетках, в зоне роста, а также в метамерно расположенных рядах эпидермальных клеток на передней границе каждого сегмента. При переходе от метатрохофоры к стадии нектохеты кольцевой домен экспрессии в зоне роста расширяется, а затем разделяется на два. Со временем расстояние между этими кольцевыми доменами увеличивается, что объясняется ростом зачатка первого постларвального сегмента. Формирование следующих постларвальных сегментов происходит сходным путем. Обобщив полученные нами результаты и имеющиеся в литературе данные, мы сопоставили паттерны экспрессии *engrailed* у аннелид и членистоногих. Наш анализ свидетельствует об отсутствии консерватизма в паттернировании сегментов, последовательно развивающихся из зоны роста у первичноротых. Мы предполагаем, что у *A. virens* удлинение переднезадней оси происходит одновременно со спецификацией нового сегмента. Эти особенности отличаются от известных моделей работы зоны роста и указывают на возможность существования специфичного для нереид механизма сегментации.

Ключевые слова: сегментация, Annelida, Nereididae, личиночное развитие, метаморфоз, элонгация оси, ген полярности сегментов *engrailed*, паттерн экспрессии

DOI: 10.31857/S0475145023030035, **EDN:** ZRAFGE

ВВЕДЕНИЕ

Сегментированными считают три группы билатерально-симметричных животных: членистоногие, хордовые и аннелиды. Однако до сих пор нет единого мнения по поводу происхождения сегментации, которая могла возникнуть либо у общего предка всех билатерий, либо эволюционировать в разных таксонах независимо (Chirpan, 2018, 2020a).

Среди членистоногих процесс становления сегментации наиболее изучен у *Drosophila melanogaster* (Chirpan, 2020b). В результате сложных взаимодействий между генами материнского эффекта и зиготическими генами происходит единовременное паттернирование бластодермы на метамерные участки, на границах которых активируется экспрессия “генов полярности сегмен-

тов”: *wingless (wnt1)* и *engrailed (en)*. Они отвечают за создание системы координат внутри сегмента и являются “маркерами” сегментации. Однако дрозофила обладает сильно модифицированным развитием: она имеет длинную зародышевую полосу, лишенную зоны роста. Эти особенности существенно затрудняют сравнительное изучение механизмов развития сегментированного плана строения.

Более подходящими объектами для эволюционного анализа феномена сегментации признаны насекомые с короткой зародышевой полоской, одним из представителей которых является жук *Tribolium castaneum*. Несмотря на различия в молекулярно-генетических механизмах сегментации у насекомых, гены *wingless* и *engrailed* у триболиума выполняют ту же функцию, что и у дрозо-

фили. Более того, “гены полярности сегментов” являются наиболее консервативными регуляторами метамеризации тела у всех членистоногих — паттерны их экспрессии с периодичностью в один сегмент отмечены у насекомых, ракообразных, хелицеровых и многоножек (Patel et al., 1989a; Damen, 2002; Hughes, Kaufman, 2002).

Гомологи “генов полярности сегментов” были выявлены и у представителей кольчатых червей. Была охарактеризована экспрессия *wingless* и *engrailed* у нереидных полихет (Prud’homme et al., 2003; Steinmetz et al., 2011; Козин и др., 2019a), а также у *Capitella teleta*, *Hydroides elegans*, *Chaetopterus* sp., *Pristina leidyi*, *Helobdella* sp. (Patel et al., 1989b; Bely, Wray, 2001; Seaver et al., 2001; Seaver, Kaneshige, 2006). Паттерны экспрессии этих генов у нереид *Platynereis dumerilii* и *Alitta virens* позволяют предположить их участие в создании метамерного плана строения: *engrailed* экспрессируется в ряду клеток на передней границе сегмента, а *wingless* — на задней границе, что соответствует распределению продуктов генов-ортологов в парасегментах у насекомых. Однако у других аннелид отсутствует привязка экспрессии *wingless* и *engrailed* к межсегментным границам, что ставит под сомнение их участие в разметке всего тела на метамерные области (Seaver, Kaneshige, 2006).

Кроме того, экспрессия *engrailed* у аннелид была описана либо на личиночных стадиях, либо в ходе регенерации или анаморфного роста (т.е. последовательного появления сегментов из зоны роста) взрослых червей, но не была охарактеризована при переходе от личиночного к постларвальному развитию (т.е. в конце метаморфоза и при появлении первых постларвальных сегментов). Чтобы прояснить молекулярно-генетические основы последовательного формирования сегментов из зоны роста и определить, насколько эволюционно консервативен при этом паттерн экспрессии *engrailed*, мы изучили динамику распределения мРНК этого гена при метаморфозе и у молодых ювенильных особей беломорской полихеты *A. virens*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Половозрелых особей *A. virens* отлавливали в окрестностях Морской Биологической Станции (МБС) СПбГУ (губа Чупа, Кандалакшский залив Белого моря). Искусственное оплодотворение и содержание эмбриональной культуры производили по описанной ранее методике (Дондуа, 1975). Эмбрионы и ранние личиночные стадии культивировали при 14°C, на стадии ранней нектохеты (180 часов после оплодотворения, ч.п.о.) температуру поднимали до 20°C.

Развитие беломорских *A. virens* в естественных и лабораторных условиях было описано в работах Дондуа (1975) и Свешникова (1978). Эмбриогенез

характеризуется гетероквадрантным спиральным дроблением и эпиболической гастрულიей. В конце вторых суток после оплодотворения появляется округлая плавающая лецитотрофная личинка трохофора (рис. 1а). Ресничный шнур прототрох опоясывает тело личинки по экватору, отделяя эписферу (переднюю половину) от гипосферы (задней половины). В гипосфере расположены зачаток передней кишки (стомодеум) и незамкнутый ресничный венчик телотрох, который отграничивает область будущего пигидия. При использованных нами температурных условиях стадия трохофоры длится приблизительно с 44 до 90 ч.п.о. Трохофора плавно преобразуется в метатрохофору (рис. 1б), у которой вытягивается гипосфера и появляются метамерно расположенные структуры — пучки щетинок и ресничные шнуры паратрохи. На заднем конце поздней метатрохофоры развиваются две лопасти пигидия, между которыми внутрь впячивается зачаток задней кишки. Стадия метатрохофоры длится приблизительно с 91 до 170 ч.п.о. После появления функционирующих конечностей (трех пар параподий) и закладки головных придатков (антенн и перистомиальных усиков) наступает стадия нектохеты (рис. 1в). В строении нектохеты выделяют переднюю терминальную область (простомииум), несущий перистомиальные усики скрытый (нулевой) сегмент, три щетинконосных сегмента, зону роста и пигидий. Нектохеты поначалу обитают в планктоне, а затем оседают на дно. Постепенно у нектохет увеличивается область пигидия, а в передней ее части за счет клеток зоны роста формируется первый постларвальный сегмент. Переход от личинки к ювенильной особи (рис. 1г) происходит асинхронно, но не ранее 300 ч.п.о. Ювенильные черви с четырьмя щетинконосными сегментами начинают питаться и из предпигидиальной зоны роста образуются новые постларвальные сегменты.

Личинок и ювенилей фиксировали в 4% формальдегиде на 1.75× PBS/0.1% Tween-20 на ночь при 4°C с последующей отмывкой в PBS/0.1% Tween-20 и дегидратацией в 100% метаноле. Для работы отбирали следующие стадии: поздняя метатрохофора (156 ч.п.о.), ранняя нектохета (180 ч.п.о.), поздняя нектохета (210 ч.п.о.), ювениль с формирующимся четвертым сегментом (300 ч.п.о.), ювениль с полностью сформированным четвертым сегментом (330 ч.п.о.), пятисегментная ювениль (420 ч.п.о.). Фиксации хранили при –20°C.

Для гибридизации *in situ* использовали от 50 до 100 объектов каждой стадии. Гибридизацию *in situ* производили согласно описанному ранее протоколу (Shalaeva et al., 2021). Инкубация с мечеными диоксигенином РНК-зондами продолжалась 48 ч; окрашивание в ВСIP/NBT шло от 20 до 40 ч.

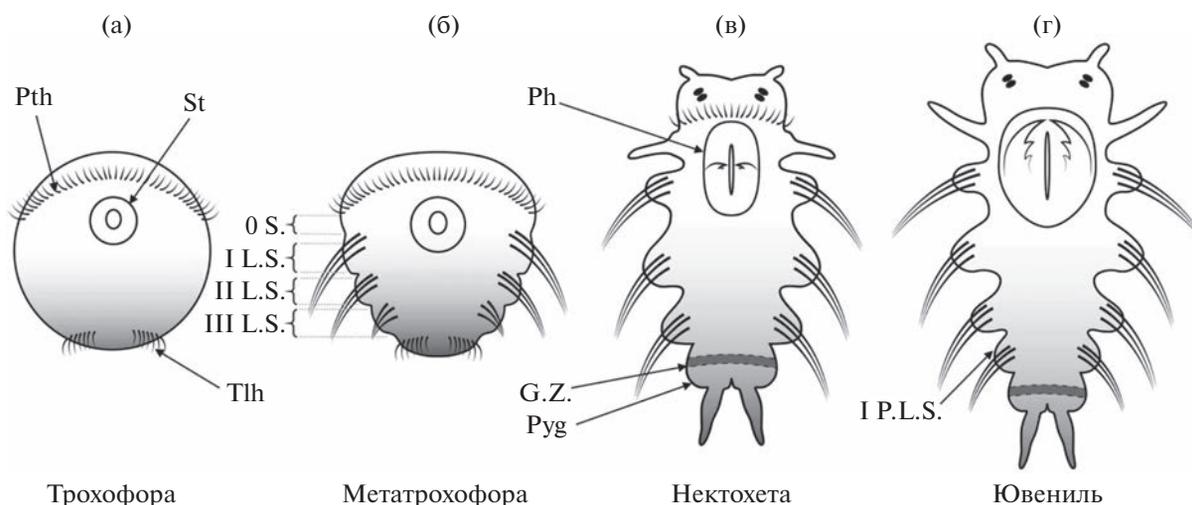


Рис. 1. Стадии постэмбрионального развития *Alitta virens*. Относительные размеры тела соблюдены, передний конец направлен вверх. (а) Трохофора. (б) Метатрохофора. (в) Нектохета. (г) Ювенильная особь с четырьмя щетинконосными сегментами. Pth – прототрох, St – стомодеум, Tlh – телотрох, Ph – глотка, G.Z. – зона роста, Pyg – пигидий, I, II, III L.S. – первый, второй и третий ларвальный сегмент, 0 S. – нулевой сегмент, I P.L.S. – первый постларвальный сегмент.

Для визуализации результатов хромогенной гибридизации *in situ* методом дифференциального интерференционного контраста (DIC) использовали микроскоп Axio Imager D1 (Carl Zeiss), оснащенный цифровой фотокамерой AxioCam ICc5 (Carl Zeiss). Обработку изображений проводили в программе ImageJ. Схемы создавали в программах Adobe Illustrator и Microsoft PowerPoint.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На стадии поздней метатрохофоры мРНК *engrailed* экспрессируется на вентральной стороне тела личинки: в отдельных клетках нейроэктодермы и в поверхностных эпидермальных клетках ближе к латеральным сторонам. Эпидермальные домены экспрессии образуют короткие, метамерно расположенные полоски, прилежащие к передней границе сегментов и не достигающие до середины тела (рис. 2а, 2а', 3а). Метамерные полосы экспрессии отмечены во всех сегментах: как в трех щетинконосных, так и в нулевом сегменте (непосредственно кзади от прототроха). Также точечный сигнал выявляется в поверхностных и глубинных клетках нейроэктодермы; паттерн экспрессии при этом является билатерально-симметричным (рис. 2а, 3а). В области пигидия мРНК *engrailed* экспрессируется в кольце клеток, расположенных между задней бороздой третьего сегмента и телотрохом. Этот задний кольцевой домен экспрессии включает как поверхностные, так и лежащие в глубине клетки, которые все вместе соответствуют локализации будущей зоны роста (см. Обсуждение). Кроме того, мРНК *engrailed* выявляется в четырех группах близкорасполо-

женных клеток на эписфере ближе к дорсальной стороне тела, а также в клетках глотки (рис. 2а, 2а').

На стадии ранней нектохеты паттерн экспрессии остается схожим с таковым у поздней метатрохофоры: метамерные домены экспрессии на вентролатеральных сторонах тела сохраняются, как и экспрессия в эписфере и нейроэктодерме (рис. 2б). Самое важное изменение паттерна происходит в пигидии: кольцевой домен экспрессии расширяется в переднезаднем направлении (рис. 2б', 3б) и охватывает на поверхности не менее двух рядов клеток (вместо одного поверхностного ряда клеток на стадии поздней метатрохофоры). Именно в этот момент происходит закладка молекулярной границы будущего первого постларвального сегмента.

На стадии поздней нектохеты экспрессия мРНК *engrailed* в области пигидия представлена двумя кольцевыми доменами: один расположен кзади от борозды третьего сегмента, а другой находится в более каудальном положении (рис. 2в, 2в', 3в). При этом метамерные домены экспрессии на территории ларвальных сегментов исчезают. После обособления четвертого сегмента, когда уже образована борозда, отделяющая его от пигидия, один домен экспрессии находится на передней границе четвертого сегмента, а другой – на переднем крае пигидия, т.е. кзади от последней борозды (рис. 2г, 3г). На более поздних стадиях мРНК *engrailed* экспрессируется в группе поверхностных вентролатеральных клеток на передней морфологической границе пигидия и непосредственно на территории пигидия в более заднем положении по отношению к первой группе клеток (рис. 2д, 3д). Эти метамерные домены, по-види-

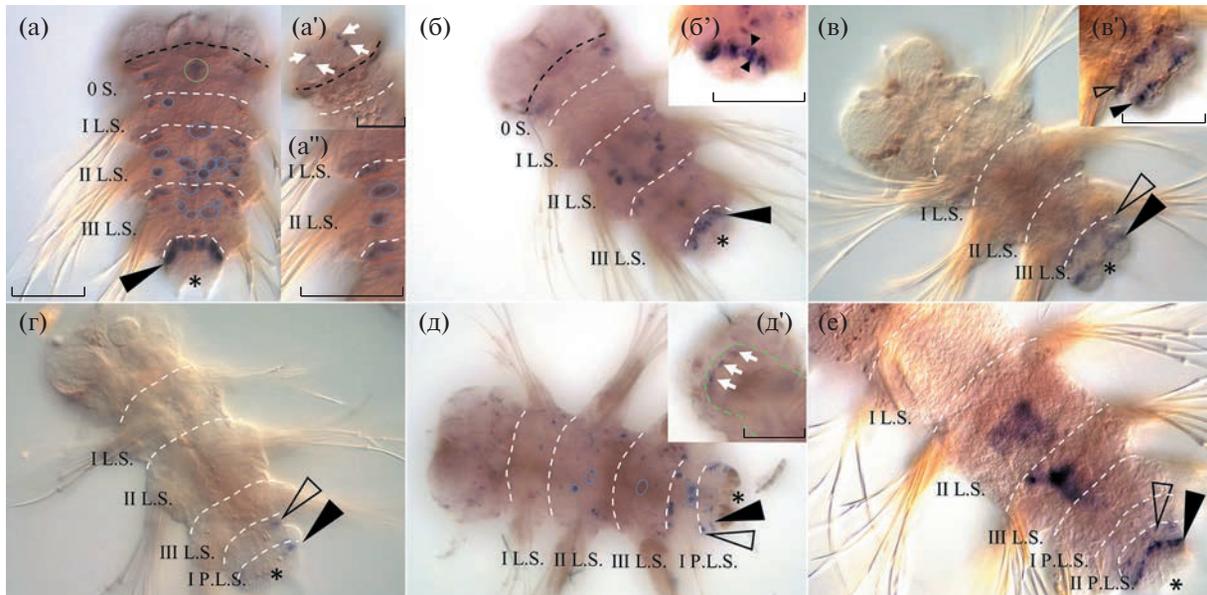


Рис. 2. Экспрессия *engrailed* в ларвальном и постларвальном развитии *A. virens*. На всех фотографиях вид с вентральной стороны, если не указано обратное. Звездочка – задний конец тела и пигидий, черный наконечник стрелки – передняя граница пигидия и приуроченный к ней домен экспрессии, контурный наконечник стрелки – передняя граница формирующегося постларвального сегмента, белые пунктирные линии – границы сегментов, черный пунктир – положение прототроха. Метамерные полосы экспрессии, приуроченные к передней границе сегмента, подчеркнуты красной линией. I, II, III L.S. – щетинконосные ларвальные сегменты, P.L.S. – постларвальные сегменты, 0 S. – нулевой сегмент. (а) Поздняя метатрохофора, 156 ч.п.о. Экспрессия *engrailed* выявлена в отдельных нейроэктодермальных клетках (обведено синим контуром), метамерных вентролатеральных рядах эпидермальных клеток (красные линии), а также на переднем крае глотки (обведено зеленым контуром). (а') Передний конец тела, вид с дорсальной стороны. В составе эписферы (кпереди от черной пунктирной линии) видны 4 кластера лежащих вплотную друг к другу клеток (белые стрелки), экспрессирующих *engrailed*. (а'') Крупный план вентролатерального участка туловища, на котором видны два метамерных домена экспрессии (красный контур). (б) Ранняя нектохета, 180 ч.п.о. Кольцевой домен экспрессии *engrailed* на границе пигидия состоит из двух рядов поверхностных клеток. (б') Крупный план заднего конца тела, наконечники стрелок указывают на два соседних ряда *engrailed*+ клеток. (в) Поздняя нектохета, 200 ч.п.о. Экспрессия в нейроэктодермальных клетках пропадает; на территории пигидия есть два отдельных ряда клеток, экспрессирующих *engrailed* (наконечники стрелок). (в') Крупный план заднего конца тела. (г) Стадия обособления первого постларвального сегмента, 300 ч.п.о. (д) Ювениль с полностью сформированным четвертым сегментом, 330 ч.п.о. Изображение получено путем совмещения серии фотографий одного объекта в разных фокусах. (д') Увеличенное изображение переднего конца тела. Видны *engrailed*+ клетки (белые стрелки) на переднем крае глотки (зеленая пунктирная линия). (е) Ювениль с 5 сегментами, 420 ч.п.о. Вид с дорсальной стороны. мРНК *engrailed* выявляется в двух поперечных полосах клеток в пигидии – происходит закладка границы шестого сегмента. Темно-синее окрашивание в центре тела – неспецифический фон в пищевых частицах в полости кишки. Масштабный отрезок – 50 мкм.

тому, маркируют зачаток формирующегося пятого (второго постларвального) сегмента. Аналогичная картина наблюдается и при закладке шестого сегмента, территория которого ограничена спереди и сзади непрерывными поперечными полосами *Engrailed*-положительных клеток (рис. 2е). У четырехсегментных червей экспрессия (которая практически отсутствовала на стадии поздней нектохеты) вновь выявляется в клетках нейроэктодермы ларвальных сегментов. Кроме того, у ювенилей появляется экспрессия мРНК *engrailed* в клетках переднего края глотки (рис. 2д').

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе впервые была описана экспрессия гена *engrailed* при переходе к постларвальному развитию у полихет. Полученные данные позволя-

ют предполагать участие продукта этого гена в паттернировании зачатков сегментов у *A. virens*. Анализ сведений об экспрессии регуляторных генов, динамике клеточной пролиферации и дифференцировке сегментарных органов у *A. virens* и у близкородственного вида *P. dumerilii* позволяет охарактеризовать особенности развития сегментов у представителей семейства Nereididae (рис. 1). К таким особенностям относится следующее: почти одновременная и относительно ранняя спецификация всех личиночных сегментов еще в эмбриогенезе (Prud'homme et al., 2003; Steinmetz et al., 2011; Kozin et al., 2016); формирование метамерной соматической мускулатуры и конечностей у планктонной личинки (Fischer et al., 2010; Balavoine, 2014; Козин, Костюченко, 2016); появление локальной области клеточной пролиферации в предпигидиальной зоне роста на стадии нектохеты,

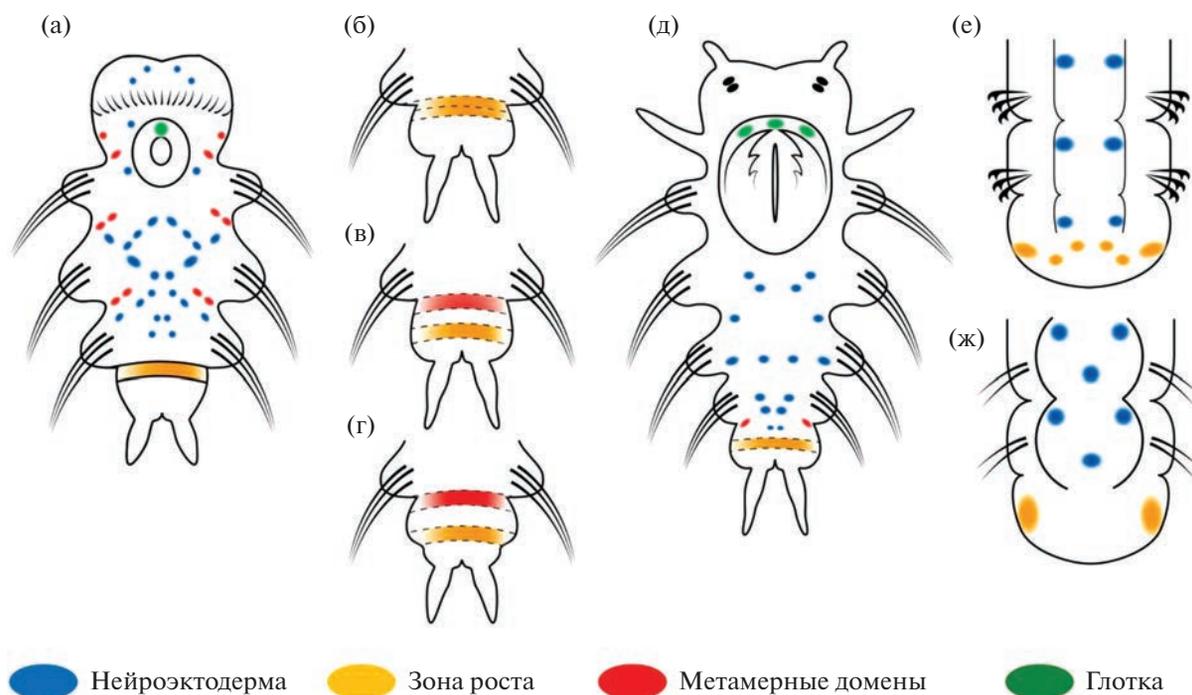


Рис. 3. Паттерны экспрессии *engrailed* в ходе анаморфного роста у аннелид. Домены экспрессии обозначены цветной заливкой: красный цвет – метамерные эпидермальные домены, синий – нейроэктодермальные клетки, желтый – область зоны роста, зеленый – клетки глотки. Передний конец тела направлен вверх. (а–д) *A. virens*: (а) – поздняя метатрохофора, (б–г) – задний конец тела нектохеты при формировании зачатка первого постларвального сегмента, (д) – ювенильная особь. (е) Задний конец тела пресноводной олигохеты *Pristina leidy* (по Bely, Wray, 2001). (ж) Задний конец тела седентарной полихеты *Capitella teleta* (по Seaver, Kaneshige, 2006).

т.е. задолго до оседания личинки (Gazave et al., 2013; Козин и др., 20196); начало формирования постларвального сегмента в виде одного ряда *Engrailed*-положительных клеток, которые соответствуют передней границе сегмента; последующий рост зачатка сегмента в длину кпереди от пигидия. У нереид *engrailed* экспрессируется у заднего конца тела, начиная со стадии протрохофоры (Prud'homme et al., 2003; Steinmetz et al., 2011). Мы предполагаем, что этот задний поперечный домен активности *engrailed*, расположенный кпереди от телотроха, маркирует молекулярную границу, вдоль которой формируется зона роста. Данная область пространственно соответствует экспрессии маркеров мультипотентности, таких как *Vasa* и *Nanos* (Kozin, Kostyuchenko, 2015; Козин и др., 20196; Kostyuchenko, 2022). При расширении и последующем разделении этого домена на две полосы экспрессии *Engrailed* у нектохет *A. virens* происходит активное разрастание пигидия (рис. 3а–3г). Однако в его пределах уже определена передняя граница будущего четвертого сегмента, а задняя часть сегмента, вероятно, продолжает формироваться за счет пролиферации *Engrailed*-негативных клеток (Козин и др., 20196). Это указывает на то, что у *A. virens* накопление клеточного материала будущего сегмента и его спецификация происходят одновременно, а не последовательно.

Поскольку у разных аннелид характер экспрессии *engrailed* сильно отличается (рис. 3), выявленные нами особенности паттернирования сегментов нереид могут иметь различную эволюционную трактовку. Гипотетически, раннее паттернирование зачатка сегмента с участием *engrailed* может являться анцестральной чертой аннелид. На это указывает метамерный (с периодичностью в один сегмент) паттерн экспрессии *engrailed*, появляющийся еще до морфологического обособления сегментов, а также экспрессия этого гена в зоне роста большинства исследованных аннелид (рис. 3). Однако ни у кого из них, кроме нереид, *engrailed* образует протяженные домены экспрессии в виде полос или колец, которые расположены метамерно и отражают одинаковое позиционное значение (т.е. маркируют переднюю границу по окружности всего сегмента – и вентрально, и дорсально, и латерально). В основном, экспрессию *engrailed* у аннелид выявляли в сериальных органах – нефридиях, ганглиях ЦНС, щетинконосных мешках (Seaver et al., 2001; Prud'homme et al., 2003; Seaver, Kaneshige, 2006) (рис. 3). Поэтому можно предположить, что изначально у предка аннелид *engrailed* принимал участие в спецификации различных метамерно расположенных структур. В филогенетической линии, ведущей к нереидам, этот ген мог быть кооптирован в генную регуляторную сеть, управляющую созданием и разметкой морфогенеза.

нетического поля всего сегмента. В этом случае особенности сегментации нереид (ранняя спецификация всех личиночных сегментов еще в эмбриогенезе; ускоренное формирование сегментарных органов у планктонной личинки) возникли в эволюции вторично.

Вероятно, предпосылкой к совершенствованию механизмов сегментации, которые обеспечили акселерацию развития сегментированных личинок нереид, было накопление в яйце значительных запасов желтка, обеспечившее переход к лецитотрофии. Эволюционный переход от планктотрофии к лецитотрофии связан с гетерохронными изменениями, заключающимися в более поздней дифференцировке пищеварительных органов и более раннем появлении дефинитивных (ювенильных) признаков, к которым относится и сегментация. В крайнем случае подобной гетерохронии свободноживущая личинка исчезает, а все сегменты дифференцируются еще в эмбриогенезе, как это происходит у пиявок (Куо, 2017). Дальнейшие исследования молекулярно-генетической регуляции формирования сегментов аннелид помогут определить, какой из описанных сценариев более справедлив.

Еще одной интересной особенностью нереид является наличие мРНК *engrailed* в клетках нейроэктодермы. У многих животных *engrailed* необходим для правильного формирования нервной системы. У позвоночных показано совместное участие *engrailed* и *FGF8* в функционировании истмусового организатора (isthmus organizer) на границе среднего и заднего мозга (Omi, Nakamura, 2015), а также в спецификации некоторых групп нейронов (Ekker et al., 1992). У насекомых и ракообразных *engrailed* экспрессируется в ганглиях брюшной нервной цепочки (Patel et al., 1989a). Для кузнечика *Schistocerca americana* показана роль этого гена в определении судьбы нейробластов срединной линии: после запуска транскрипции *engrailed* нейробласты начинают продуцировать глиальные предшественники вместо нейральных (Condron et al., 1994). У иглокожих транскрипты *engrailed* выявляются в радиальной нервной системе у ювенильных животных (Vugne et al., 2005). У аннелид *A. virens*, *P. dumerilii*, *Chaetopterus* sp., *C. teleta* и *P. leidyi* *engrailed* также экспрессируется в нейральных и нейроэктодермальных клетках (Bely, Wray, 2001; Seaver et al., 2001; Seaver, Kaneshige, 2006; Steinmetz et al., 2011). Таким образом, одной из возможных анцестральных функций *engrailed* можно считать участие в нейральной дифференцировке.

Широкомасштабный сравнительный анализ паттернов экспрессии *engrailed* (Vellutini, Hejnal, 2016) показал, что у многих животных его активность приурочена к областям, где формируются перетяжки между различными органами и структурами, как, например, перешеек (isthmus rhombencephali) между задним и средним мозгом у позвоночных, граница между отделами тела личинок брахиопод и полухордовых, край раковинной железы

моллюсков и т.д. Обобщая известные гипотезы, можно заключить, что разметка пограничных территорий между морфологически обособленными частями тела также могла являться анцестральной функцией *engrailed*. По всей видимости, экспрессия *engrailed* не была изначально связана с закладкой сегментов. Мы предполагаем, что в ходе эволюции *engrailed* неоднократно вовлекался в процессы развития сегментированного плана строения. Когда произошло это эволюционное событие у аннелид остается невыясненным. Это могло случиться у общего предка всех аннелид или же только в филогенетической линии, ведущей к нереидным полихетам.

Приведенные нами оригинальные и литературные данные свидетельствуют о том, что характер развития постларвальных сегментов у *A. virens* не соответствует обеим существующим моделям функционирования зоны роста (зоны добавления сегментов, SAZ) — и телобластической, и диффузной. Это обстоятельство ставит вопрос о наличии у нереид уникального механизма анаморфного роста. По имеющимся данным пока невозможно предложить новую модель формирования сегментов из зоны роста, однако стоит провести сравнительный анализ уже установленных закономерностей сегментации разных животных.

Отличием от телобластической SAZ, характерной для зародышей поясковых аннелид и некоторых ракообразных из класса Malacostraca, является отсутствие в постларвальном развитии беспоясковых аннелид телобластов и стереотипного паттерна деления их потомков (Zattara, 2020). Кроме того, представление о телобластах, как о мультипотентных стволовых клетках (Balavoine, 2014; Chipman, 2020a) не позволяет интерпретировать таким образом SAZ нереид (Niwa et al., 2013), поскольку экспрессия “генов полярности сегментов” в зоне роста (*engrailed* у *A. virens* и других аннелид (рис. 3), *wnt1* и *hh* у *Perinereis nuntia*) предполагает гораздо более ограниченные потенции ее клеток. Модель диффузной SAZ применима к зоне роста большинства членистоногих и зародышам позвоночных (в отношении пресомитной мезодермы и хвостовой почки). Эта модель предусматривает циклические изменения активности генов (осцилляции экспрессии генов “pair-rule” и Notch сигналинга) в обширной популяции клеток (Williams, Nagy, 2017; Diaz-Cuadros et al., 2021) (рис. 4), чего не наблюдается у аннелид. И у членистоногих, и у позвоночных молекулярные маркеры полярности сегментов/сомитов начинают экспрессироваться вдоль новых границ только после спецификации всей территории метамера, тогда как у *A. virens* экспрессия *engrailed* маркирует переднюю границу зачатка задолго до завершения наработки клеточного материала сегмента и его спецификации. Таким образом, мы приходим к заключению о неприменимости описанных выше моделей к постэмбриональному периоду онтогенеза аннелид.

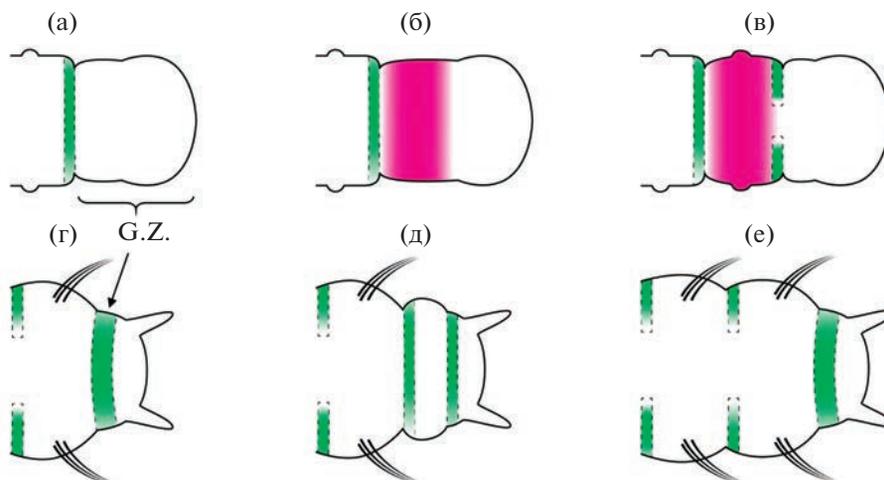


Рис. 4. Схема последовательного образования сегментов у членистоногих (а–в) (по Williams, Nagy, 2017) и аннелиды *A. virens* (г–е). Зеленая заливка – области экспрессии *engrailed*, пурпурный – область спецификации нового сегмента, G.Z. – зона роста. (а) Накопление клеточного материала в зоне роста (область кзади от последней полосы экспрессии *engrailed*). (б) Спецификация парасегмента в передней части зоны роста вследствие осциллирующей экспрессии генов “pair-rule” и Notch сигналинга. (в) Обособление сегмента, связанное с окончательным определением границ (закладка новой полосы экспрессии *engrailed*), и начало морфогенезов (формирование зачатков конечностей и межсегментных борозд). (г) Расширение кольцевого домена экспрессии *engrailed* в зоне роста является первым этапом закладки нового сегмента, когда, по-видимому, устанавливается молекулярный профиль клеток на его передней границе. (д) Накопление клеточного материала за счет пролиферации ведет к обособлению двух доменов экспрессии *engrailed*, которые отделяют сегментарный зачаток от предшествующего сегмента (спереди) и от пидигия (сзади). Механизмы спецификации сегментарного зачатка аннелид остаются неизвестными. (е) Морфогенез, рост и дифференцировка нового сегмента сопровождаются постепенным сокращением домена экспрессии *engrailed* вдоль межсегментной борозды.

Поскольку вопрос о единстве эволюционного происхождения сегментов аннелид и членистоногих до конца не решен, следует рассмотреть закономерности их развития с учетом представленных данных. Паттерны экспрессии *engrailed* у нереид и членистоногих сходны тем, что последовательное появление полос экспрессии происходит до морфологического обособления сегментов. С помощью функциональных экспериментов для членистоногих доказано участие *engrailed* в процессах паттернирования и морфогенеза сегментов (Gustavson et al., 1996; Lim, Choe, 2020). Можно предположить, что *engrailed* выполняет сходные функции и у *A. virens*. Однако соотношение процессов удлинения оси (создания клеточного материала), спецификации и поляризации сегментов, а также вовлеченные в это гены, по-видимому, сильно отличаются у аннелид и членистоногих (Balavoine, 2014).

У членистоногих с терминальным ростом сначала образуется материал парасегментов (рис. 4а), который подвергается спецификации (рис. 4б), а потом окончательно устанавливаются границы, маркированные полосами экспрессии “генов полярности сегментов” (рис. 4в) (Williams, Nagy, 2017). При этом экспрессия *engrailed* в зоне роста отсутствует, но транскрипты этого гена выявляются в клетках на передних границах парасегментов, соответствующих задним границам дефинитивных сегментов. Кроме насекомых, экспрессия *engrailed* приурочена к задней границе сегментов у многоножек, ракообразных, хелицерных, они-

хофор и тихоходок (Patel et al., 1989a; Damen, 2002; Hughes, Kaufman, 2002; Gabriel, Goldstein, 2007; Janssen, 2017; Lim, Choe, 2020). Таким образом, в отличие от членистоногих, у *A. virens* консервативный “пограничный” паттерн *engrailed* возникает еще до полной детерминации зачатка сегмента (рис. 4). Мы предполагаем, что у *A. virens* сначала происходит спецификация передней границы сегмента, а затем задней, что сопровождается наработкой клеточного материала соответствующего сегмента. Это говорит о кардинальных различиях в механизмах сегментации нереид и метамерных Ecdysozoa.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эволюционное происхождение таких комплексных признаков, как сегментация, является принципиально важным и нерешенным вопросом биологии. В настоящее время анализ сегментированного плана строения происходит на уровне сравнения молекулярно-генетических и клеточных механизмов развития сегментов в разных таксонах. Этот анализ существенно ограничен недостатком детальных описательных и функциональных исследований сегментации у беспоясковых кольчатых червей. Изучив один из наиболее консервативных генов-маркеров сегментации *engrailed*, мы сопоставили паттерны экспрессии его ортологов у аннелид и членистоногих, а также проанализировали применимость существующих моделей

SAZ к аннелидам. Это позволило нам заключить, что образование сегментов из зоны роста в постларвальном развитии нереид обладает рядом особенностей. Мы предполагаем, что спецификация сегмента *A. virens* идет параллельно с удлинением переднезадней оси, так как сначала определяется передняя граница сегмента (маркером которой служит экспрессия мРНК *engrailed*), далее следует достраивание его задних территорий, а затем появляется окончательная задняя граница (борозда между сегментом и пигидием). Анализ закономерностей экспрессии *engrailed* у билатерий позволяет предположить, что анцестральной ролью этого гена следует считать регуляцию нейральной дифференцировки и создание пограничных территорий. Вовлечение *engrailed* в процессы паттернирования зачатков сегментов у нереид (а возможно и у всех аннелид), членистоногих и хордовых, по-видимому, происходило независимо. Дальнейшие исследования должны определить, какие закономерности работы *engrailed* и других генов, паттернирующих сегменты, были унаследованы нереидами от общего предка кольчатых червей, а какие возникли в эволюции позднее. Это позволит провести полноценное сравнение функционирования генетического репертуара сегментированных животных и реконструировать эволюционную историю сегментации более достоверно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данное исследование выполнено на базе Морской Биологической Станции (УНБ “Беломорская”) СПбГУ, РЦ ММ, РЦ РМиКТ и РЦ КМ СПбГУ. Выражаем благодарность Роману Петровичу Костюченко за предоставленную плазмиду с фрагментом кДНК *engrailed A. virens* и обсуждение текста рукописи. Благодарим Надежду Андреевну Филиппову за помощь в создании иллюстраций.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнялась при поддержке гранта РФФ № 21-74-00055, <https://rscf.ru/project/21-74-00055/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В отношении объектов исследования соблюдались применимые этические нормы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дондуа А.К. Влияние актиномицина Д и сибиромидина на эмбриональное и личиночное развитие *Nereis virens* (Sars.) // Онтогенез. 1975. Т. 6. № 5. С. 475–484.

Козин В.В., Борисенко И.Е., Костюченко Р.П. Участие канонического сигнального пути Wnt в определении полярности тела и клеточной идентичности у Metazoa: новые данные о развитии губок и аннелид // Изв. РАН. Сер. биол. 2019а. № 1. С. 19–30.

Козин В.В., Костюченко Р.П. Эволюционный консерватизм и вариабельность развития мезодермы у Spiralia: неповторимый паттерн нереидных полихет // Изв. РАН. Сер. биол. 2016. № 3. С. 265–275.

Козин В.В., Шалаева А.Ю., Филиппова Н.А., Костюченко Р.П. Как строится тело личинки полихет? История ларвального развития и метаморфоза *Alitta virens* (Annelida: Nereididae) // Труды VII Международной научно-практической конференции “Морские исследования и образование (MARESEDU-2018)” Том IV (IV). Тверь: ООО “ПолиПРЕСС”, 2019б. С. 81–85.

Свешников В.А. Морфология личинок полихет. М.: Наука, 1978. 152 с.

Balavoine G. Segment formation in Annelids: patterns, processes and evolution // Int. J. Dev. Biol. 2014. V. 58. P. 469–483.

Bely A.E., Wray G.A. Evolution of regeneration and fission in annelids: insights from engrailed- and orthodenticle-class gene expression // Development. 2001. V. 128. № 14. P. 2781–2791.

Byrne M. et al. Engrailed is expressed in larval development and in the radial nervous system of *Patiriella* sea stars // Dev. Genes Evol. 2005. V. 215. № 12. P. 608–617.

Chipman A.D. The evolution and development of segmented body plans // Evolutionary Developmental Biology / Eds. Nuno de la Rosa L., Muller G. Springer, Cham. 2018. P. 1–10.

Chipman A.D. (ed.) Cellular Processes in Segmentation. CRC Press, 2020a. 299 p.

Chipman A.D. The evolution of the gene regulatory networks patterning the *Drosophila* Blastoderm // Current Topics in Developmental Biology. 2020b. V. 139. P. 297–324.

Condron B.C., Patel N.H., Zinn K. Engrailed controls glial/neuronal cell fate decisions at the midline of the central nervous system // Neuron. 1994. V. 13. № 3. P. 541–554.

Damen W.G.M. Parasegmental organization of the spider // Development. 2002. V. 129. № 5. P. 1239–1250.

Diaz-Cuadros M., Pourquoi O., El-Sherif E. Patterning with clocks and genetic cascades: Segmentation and regionalization of vertebrate versus insect body plans // PLoS Genet. 2021. V. 17. № 10. P. e1009812.

Ekker M. et al. Coordinate embryonic expression of three zebrafish engrailed genes // Development. 1992. V. 116. № 4. P. 1001–1010.

Gabriel W.N., Goldstein B. Segmental expression of Pax3/7 and Engrailed homologs in tardigrade development // Dev. Genes Evol. 2007. V. 217. № 6. P. 421–433.

Gazave E., Béhague J., Laplane L., Guillou A., Préau L., Demilly A., Balavoine G., Vervoort M. Posterior elongation in the annelid *Platynereis dumerilii* involves stem cells molecularly related to primordial germ cells // Dev. Biol. 2013. V. 382. № 1. P. 246–267.

Gustavson E. et al. The *Drosophila* engrailed and invected genes: partners in regulation, expression and function // Genetics. 1996. V. 142. № 3. P. 893–906.

- Fischer A.H., Henrich T., Arendt D. The normal development of *Platynereis dumerilii* (Nereididae, Annelida) // *Front Zool.* 2010. V. 7. № 1. P. 31.
- Hughes C.L., Kaufman T.C. Exploring myriapod segmentation: the expression patterns of even-skipped, engrailed, and wingless in a Centipede // *Developmental Biology.* 2002. V. 247. № 1. P. 47–61.
- Janssen R. A molecular view of onychophoran segmentation // *Arthropod Structure & Development.* 2017. V. 46. № 3. P. 341–353.
- Kostyuchenko R.P. Nanos is expressed in somatic and germline tissue during larval and post-larval development of the Annelid *Alitta virens* // *Genes.* 2022. V. 13. № 2. P. 270.
- Kozin V.V., Kostyuchenko R.P. Vasa, PL10, and Piwi gene expression during caudal regeneration of the polychaete annelid *Alitta virens* // *Dev. Genes Evol.* 2015. V. 225. № 3. P. 129–138.
- Kozin V.V., Filimonova D.A., Kupriashova E.E., Kostyuchenko R.P. Mesoderm patterning and morphogenesis in the polychaete *Alitta virens* (Spiralia, Annelida): Expression of mesodermal markers *Twist*, *Mox*, *Evx* and functional role for MAP kinase signaling // *Mech. Dev.* 2016. V. 140. P. 1–11.
- Kuo D.-H. The polychaete-to-clitellate transition: An EvoDevo perspective // *Developmental Biology.* 2017. V. 427. № 2. P. 230–240.
- Lim J., Choe C.P. Functional analysis of engrailed in *Trichoplax* segmentation // *Mechanisms of Development.* 2020. V. 161. P. 103594.
- Omi M., Nakamura H. Engrailed and tectum development // *Develop. Growth Differ.* 2015. V. 57. № 2. P. 135–145.
- Patel N.H., Kornberg T.B., Goodman C.S. Expression of engrailed during segmentation in grasshopper and crayfish // *Trends in Genetics.* 1989a. V. 107. № 2. P. 201–212.
- Patel N.H. et al. Expression of engrailed proteins in Arthropods, Annelids, and Chordates // *Cell.* 1989b. V. 58. № 5. P. 955–968.
- Prud'homme B. et al. Arthropod-like expression patterns of engrailed and wingless in the annelid *Platynereis dumerilii* suggest a role in segment formation // *Current Biology.* 2003. V. 13. № 21. P. 1876–1881.
- Seaver E.C. et al. The spatial and temporal expression of Ch-en, the engrailed gene in the polychaete *Chaetopterus*, does not support a role in body axis segmentation // *Developmental Biology.* 2001. V. 236. № 1. P. 195–209.
- Seaver E.C., Kaneshige L.M. Expression of 'segmentation' genes during larval and juvenile development in the polychaetes *Capitella* sp. I and *H. elegans* // *Developmental Biology.* 2006. V. 289. № 1. P. 179–194.
- Shalaeva A.Y., Kostyuchenko R.P., Kozin V.V. Structural and functional characterization of the FGF signaling pathway in regeneration of the polychaete worm *Alitta virens* (Annelida, Errantia) // *Genes.* 2021. V. 12. № 6. P. 788.
- Steinmetz P.R.H., Kostyuchenko R.P., Fischer A., Arendt D. The segmental pattern of otx, gbx, and Hox genes in the annelid *Platynereis dumerilii* // *Evol. Dev.* 2011. V. 13. № 1. P. 72–79.
- Vellutini B.C., Hejnal A. Expression of segment polarity genes in brachiopods supports a non-segmental ancestral role of engrailed for bilaterians // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 1. P. 32387.
- Williams T.A., Nagy L.M. Linking gene regulation to cell behaviors in the posterior growth zone of sequentially segmenting arthropods // *Arthropod Structure & Development.* 2017. V. 46. № 3. P. 380–394.
- Zattara E. Axial regeneration in segmented animals a post-embryonic reboot of the segmentation process // *Cellular Processes in Segmentation 2020.* P. 255–292.

Expression of the *engrailed* Homologue in Larvae and Juveniles of the Annelid *Alitta virens* Characterizes the Formation of Segments from the Growth Zone

A. I. Kairov¹ and V. V. Kozin^{1, *}

¹Department of Embryology, St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: v.kozin@spbu.ru

The evolutionary origin of segmentation remains to be a mystery. In arthropods, the *engrailed* gene is recognized as one of the most important and conservative members of the segmentation developmental program. Orthologues of this gene have been identified in annelids, but their role is interpreted ambiguously, because in some species their expression precedes subdivision of the body into segments, but in others it does not. Here we studied the expression of *engrailed* in the nereid polychaete *Alitta virens* during metamorphosis and development of the first postlarval segments. Our data support the possible involvement of this gene in the process of segment formation from the growth zone in *A. virens*. At the larval stages, *engrailed* is expressed in neuroectodermal cells, in the growth zone, as well as in metameric epidermal cell rows at the anterior boundary of each segment. Upon transition from the metatrochophore to the nectochaete stage, the circular expression domain in the growth zone expands and then resolves into two serial domains. Over time, the distance between these circular domains increases indicating the growth of the first postlarval segment anlage. Formation of subsequent postlarval segments occurs in a similar way. Analyzing our results and literature data, we compared *engrailed* expression patterns in annelids and arthropods. Our work indicates an absence of conservation in patterning of sequentially developing segments from the growth zone in protostomes. We suggest that in *A. virens* the anteroposterior axis elongation occurs simultaneously with the specification of a new segment. These features differ from the known models of the growth zone and indicate the possibility that nereids have a specific mechanism of segmentation.

Keywords: segmentation, Annelida, Nereididae, larval development, metamorphosis, axis elongation, segment polarity gene *engrailed*, expression pattern

РЕЗКОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ И АКТИВНОСТИ ПРОТЕАСОМ В ОНТОГЕНЕЗЕ ГОРТАНИ СВЯЗАНО С РАЗВИТИЕМ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА

© 2023 г. И. В. Кондакова^{а, *}, Е. А. Сиденко^{а, с}, Т. М. Астахова^б, Г. В. Какурина^{а, с},
Е. Е. Середа^{а, с}, О. В. Черемисина^а, Е. Л. Чойнзонов^{а, с}, Н. П. Шарова^б

^аНаучно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН,
Томск 634050 Россия

^бФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва 119334 Россия

^сФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск 634050 Россия

*e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru

Поступила в редакцию 03.11.2022 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 08.05.2023 г.

Протеасомы, важнейшие участники катаболизма белков, поддерживают протеостаз и обеспечивают регуляцию клеточных процессов в онтогенезе. Отклонения в функционировании протеасом связаны с развитием различных патологий, в том числе ряда онкологических заболеваний. В настоящей работе изучены изменения экспрессии генов субъединиц и активности протеасом в ткани рака гортани и эпителии больных хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани, которые рассматриваются как облигатный предрак. Также исследована активность циркулирующих протеасом в тех же группах больных. Уровень экспрессии генов оценивали при помощи количественной обратной-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени. Модифицирован метод оценки химотрипсинподобной (ХТП) и каспазаподобной (КП) активностей протеасом для анализа малых объемов биопсийных образцов. Показано увеличение уровня экспрессии генов протеасом (*PSMB6*, *PSMB7*, *PSMB5* и *PSMB4*) в тканях плоскоклеточного рака гортани по сравнению с предопухолевыми образцами. Также выявлено увеличение ХТП и КП активностей внутриклеточных протеасом в злокачественном эпителии гортани по сравнению с условно-нормальной тканью и с эпителием больных хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани. В циркулирующих протеасомах наблюдалось повышение ХТП активности. Проведение ROC-анализа (Receiver Operating Characteristic) выявило связь экспрессии мРНК *PSMB5* и ХТП активности тканевых протеасом с развитием рака гортани у больных хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани. В перспективе возможно использование этих показателей для разработки способа прогноза перехода предрака гортани в рак.

Ключевые слова: экспрессия генов субъединиц протеасом, химотрипсинподобная активность протеасом, каспазаподобная активность протеасом, рак гортани, хронические гиперпластические заболевания гортани

DOI: 10.31857/S0475145023030047, **EDN:** ZRFHYM

ВВЕДЕНИЕ

Нормальный онтогенез характеризуется сбалансированной активностью внутриклеточных и внеклеточных протеасом в тканях для поддержания динамического равновесия белкового состава (Зайкова и др., 2013; Дьяконов, Цимоха, 2019). Протеасомы являются важнейшими участниками катаболизма белков и не только обеспечивают нормальный белковый обмен, но и образуют регуляторные белки и пептиды. Неудивительно, что наиболее значительные изменения в протеасомном пуле происходят в перинатальный период и первый месяц постнатального развития, что связано с

формированием органов и развитием адаптивных процессов (Karova et al., 2013; Karov et al., 2022).

Протеасомы представлены различными формами, отличающимися структурой и механизмами распознавания и утилизации белков. Присоединение 19S регуляторных частиц с одной или с двух сторон к 20S коровой субчастице приводит к образованию 26S протеасомы, осуществляющей, главным образом, АТФ- и убиквитин-зависимый протеолиз большинства клеточных белков (Budenholzer et al., 2017). 20S протеасома состоит из двух внешних колец, также называемых α -кольцами, которые образованы семью различными α -субъединица-

ми и служат “якорными станциями” для регуляторных частиц 19S. Каждое из двух внутренних β -колец образовано семью различными β -субъединицами. Три из этих β -субъединиц ($\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$, кодируемые генами *PSMB6*, *PSMB7* и *PSMB5*, соответственно) проявляют специфическую субстратную каталитическую активность: каспазаподобную (КП), трипсинподобную и химотрипсинподобную (ХТП) соответственно (Sahu, Glickman, 2021). Кроме субъединиц, обеспечивающих функциональную активность протеасом, в поддержании их структуры принимает участие субъединица $\beta 7$, кодируемая геном *PSMB4*. Установлено, что $\beta 7$ регулирует сборку протеасомы, и изменение в работе *PSMB4* может нарушить каталитическую активность всех трех протеолитических субъединиц (Lee et al., 2014).

Отклонения от нормального онтогенеза возникают при развитии различных патологических состояний и характеризуются дисбалансом в структуре и функции протеасом. Так, развитие онкологической патологии приводит к увеличению активности протеасом в опухолевой ткани по сравнению с соответствующей нормальной тканью, что обусловлено высоким уровнем метаболизма и интенсивностью таких процессов, как пролиферативная активность, инвазивный рост, метастазирование. Протеасомы принимают участие в реализации и контроле таких важнейших процессов как транскрипция, апоптоз, сигнальная трансдукция, которые играют важную роль злокачественной трансформации и дальнейшей опухолевой прогрессии (Kondakova et al., 2020; Abbas, Larisch, 2021; Jiang et al., 2021). Увеличение ХТП активности протеасом характерно для онкологических заболеваний различной локализации: рака щитовидной железы, эндометрия, яичников, молочной железы, прямой кишки (Sharova et al., 2011; Спирина и др., 2012; Kondakova et al., 2012; Erokhov et al., 2021). Повышенная экспрессия *PSMB4* характерна для многих типов рака, таких как рак молочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома, рак яичников и рак предстательной железы (Lee et al., 2014; Wang et al., 2018). Недавние исследования показали, что *PSMB4* активируется во многих опухолях и участвует в процессе развития рака, что делает его потенциальным онкогеном и геном-драйвером рака (Lee et al., 2014). Показано, что развитие злокачественных опухолей приводит к появлению циркулирующих протеасом в сыворотке крови вследствие секреции, распада опухолевых клеток или в составе микровезикул (Wada et al., 1993; Шашова и др., 2015; Choi et al., 2021).

Одним из вариантов отклонения от нормального онтогенеза является развитие рака гортани из предопухолевых заболеваний. Плоскоклеточный рак гортани (ПРГ) является одной из наиболее распространенных патологий среди органов

головы и шеи, преимущественно обнаруживается у мужского населения. В 2020 г. по данным мировой статистики число впервые выявленных случаев новообразований гортани составило более 180 тысяч человек, из которых летальных исходов около 100 тысяч (Siegel et al., 2020). За последнее десятилетие в лечении рака гортани были достигнуты большие успехи, однако, несмотря на относительную доступность и простоту обследования гортани в условиях современного развития эндоскопической техники, диагностические ошибки на догоспитальном этапе продолжают составлять большой процент. Так, рак *in situ* выявляется только в 2.3–6% случаев, I стадия процесса – в 23.9%, а III–IV стадии заболевания составляют 55–60% от первично выявленных опухолей гортани (Ciolfan et al., 2017; Obid et al., 2019; Nocini et al., 2020). Развитие рака гортани происходит на основе фоновых диффузных изменений ткани гортани в виде дистрофий, атрофий, хронического воспаления, которые приводят к структурно-функциональной дезорганизации слизистой оболочки гортани. Эти процессы создают фон для последующих очаговых гиперпластических и диспластических изменений, которые совершенно обоснованно можно трактовать как предопухолевые (Нажмудинов и др., 2018).

Дисплазия гортани может прогрессировать до инвазивной карциномы в зависимости от многих клинических, патологических и молекулярных факторов, поэтому выявление молекулярных механизмов развития рака гортани остается актуальной проблемой биологии и медицины (Luers et al., 2014). Решение данной проблемы позволит не только понять закономерности изменения клеточных процессов на молекулярном уровне при онкогенезе, но и применить полученные знания для диагностики и выявления пациентов с высоким онкологическим риском.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение изменения экспрессии генов, кодирующих субъединицы протеасом (*PSMB4*, *PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7*) и активности внутриклеточных протеасом в развитии рака гортани с учетом промежуточной стадии – предопухолевых заболеваний гортани. В исследование вошли также циркулирующие протеасомы сыворотки крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе представлены результаты исследования 29 пациентов с морфологически верифицированным ПРГ ($T_{1-3}N_0M_0$) в возрасте от 40 до 71 года (средний возраст 59.6 ± 1.4 года), 11 пациентов с хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани (хронический гиперпластический ларингит, папиллома), средний возраст которых составил 48.1 ± 3.2 года, а также 9 пациентов с хроническими гиперпластическими заболеваниями

Таблица 1. Последовательность праймеров исследованных генов

Ген	Последовательность
<i>PSMB4</i> NM_002796.3	F 5'-CTGCTACCGTGACTAAGATGGA-3' R 5'-TGATTGGACCTCTGTAAAGTGC-3'
<i>PSMB5(isf.3)</i> NM_001144932.3	F 5'-CATCTACCAAGCCACCTACAG-3' R 5'-GATGGAGGATGGGGTCACTGT-3'
<i>PSMB6(isf.2)</i> NM_001270481.2	F 5'-GGTATGATGGTAAGGCAGTCC-3' R 5'-GAAGAAAGCATTGGCAGTGA-3'
<i>PSMB7</i> NM_002799.4	F 5'-TTGAGGTGCTGGAAGAAACA-3' R 5'-AATGCTCACCCACCTTCCAG-3'
<i>GAPDH</i> NM_001256799.2	F 5'-GGAAGTCAGGTGGAGCGA-3' R 5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'

гортани (ХГЗГ), ассоциированными с диспластическими изменениями – D (I–III) в возрасте от 36 до 70 лет (средний возраст 57 ± 4.1 года), проходивших обследование в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ. Набор материала осуществлялся при выполнении стандартной видеоларингоскопии, проводилось морфологическое исследование всех образцов. Во всех случаях опухоли имели гистологическое строение плоскоклеточной карциномы разной степени дифференцировки. Все пациенты до настоящего исследования не получали никакого специального лечения. Работа проведена в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека” с поправками 2000 г. и “Правилами клинической практики в Российской Федерации”, утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266, от 19.06.2003. Всеми пациентами было дано информированное согласие на проведение исследования.

Материалом для исследования служили образцы опухолевой ткани, эпителий гортани с гиперплазией и дисплазией и гистологически неизменная ткань, взятая на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли, а также сыворотка крови. Образцы тканей замораживали и хранили при -80°C .

Определение уровня экспрессии мРНК протеасом

Выделение РНК проводили с помощью лизирующего буфера “Лира” (Биолабмикс, Россия). Концентрацию и чистоту выделенной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, USA). Концентрация РНК составила от 20 до 400 нг/мкл, $A260/A280 = 1.95\text{--}2.50$; $A260/A230 = 1.90\text{--}2.30$. Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) по показателю RIN (RNA Integrity Number), кото-

рый составил 5.6–7.8. Уровень экспрессии генов оценивали при помощи количественной обратной-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, USA). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора реактивов ОТ М-MuLV-RH (Биолабмикс, Россия) с олиго(dT)16 праймерами. Праймеры были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (табл. 1). В качестве гена-рефери использовали ген “домашнего хозяйства” фермента GAPDH (Glyceraldehydes-3-Phosphate Dehydrogenase). Количественный анализ экспрессии проведен по методу $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ и результат выражали в условных единицах (Livak, Schmittgen, 2001). Для анализа проводили нормализацию значения ΔCT исследуемого гена со значениями референсного (ref) гена, как для изучаемой пробы, так и для калибровочной кривой. Нормализацию ΔCT исследуемого образца проводили по отношению к ΔCT калибратора, в качестве которого использовалась РНК, выделенная из неизменной ткани.

Определение активности внутриклеточных протеасом

Материалом для исследования явился эпителий гортани, полученный путем биопсии в малых количествах. Для определения активности протеасом в малых количествах (5–10 мг биопсийного материала вместо стандартных 30–50 мг образцов опухолевой ткани) был модифицирован стандартный метод определения активности протеасом. Для получения осветленных гомогенатов замороженные образцы ткани весом 5–10 мг гомогенизировали в 20 мМ Tris-HCl буфере (pH 7.5), содержащем 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотрейтола, 5 мМ MgCl_2 , 10% глицерол в соотношении 1 : 10 (вместо стандартного соотношения 1 : 6), затем добавляли 2 мМ АТФ. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10000 g и 4°C . ХТП активность про-

Таблица 2. Уровень экспрессии В-субъединиц протеасом, ХТП и КП активности протеасом в разных возрастных группах пациентов

Возраст	Активность		Уровень экспрессии, усл. ед.			
	ХТП	КП	<i>PSMB4</i>	<i>PSMB5</i>	<i>PSMB6</i>	<i>PSMB7</i>
40–59 лет	1.5 (1.0–2.0)	2.0 (1.0–4.0)	1.5 (1.0–2.0)	2.0 (1.5–4.0)	2.0 (2.0–4.0)	2.0 (1.0–2.0)
60–71 лет	2.0 (1.5–4.0)	3.0 (2.0–4.0)	2.0 (1.0–4.0)	3.0 (2.0–4.0)	4.0 (2.0–6.0)	1.0 (1.0–4.0)

теасом определяли в осветленных гомогенатах по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC (Sigma, USA), специфичного для ХТП центров протеасом. КП активность – по гидролизу Z-Leu-Leu-Glu-AMC (Sigma, USA), специфичного для КП центров протеасом. Для оценки активности примесных протеаз применяли специфический ингибитор протеасом – MG132 (Sigma, USA). Реакционная смесь содержала 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 1 мМ дитиотрейтола, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC/Z-Leu-Leu-Glu-AMC, 5 мМ MgCl₂ и 1 мМ АТФ. Реакцию начинали внесением 5 мкл осветленного гомогената вместо стандартных 1–4 мкл до 200 мкл общего объема реакционной смеси и инкубировали при 37°C в течение 20 мин. Образовавшийся продукт регистрировали на микропланшетном ридере “Cytation 1” (BioTek, USA) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. В указанных условиях проведения реакции значения активности протеасом находились на прямолинейном участке графика зависимости активности от количества осветленного гомогената. За единицу активности протеасом принимали количество фермента, при котором гидролизуется 1 нмоль флуорогенного олигопептида в течение 1 мин. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Lowry.

Определение активности циркулирующих протеасом

Пробоподготовка включала разморозку сыворотки при комнатной температуре и ее активацию добавлением 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) до конечной концентрации 1% в течение 15 мин (Ma, 2008). Для определения ХТП и КП активностей циркулирующих протеасом в сыворотке крови, использовали флуорогенные субстраты Suc-LLVY-AMC (Sigma, USA) и Z-Leu-Leu-Glu-AMC (Sigma, USA), соответственно. Для оценки активности примесных протеаз применяли специфический ингибитор протеасом – MG132 (Sigma, USA). Реакционная смесь содержала 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 1 мМ дитиотрейтола, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC/Z-Leu-Leu-Glu-AMC, 5 мМ MgCl₂ и 1 мМ АТФ. Реакцию начинали внесением 100 мкл

активированной сыворотки и проводили при 37°C в течение 20 мин. Образовавшийся продукт регистрировали на микропланшетном ридере “Cytation 1” (BioTek, USA) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Удельную активность циркулирующих протеасом выражали в единицах активности на 1 мл сыворотки.

Статистическая обработка результатов была проведена с применением пакета статистических программ STATISTICA 10. Результаты представлены в виде Me (Q1–Q3), где Me – медиана, Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили, N – количество человек. Для оценки нормальности распределения выборки использовали критерий Шапиро–Уилка. Для оценки значимости различий между независимыми выборками при распределении, отличном от нормального, использовали критерий Манна–Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0.05$. Чувствительность, специфичность и прогностическую значимость кандидатных маркеров определяли методом ROC-анализа по правилу расчета площадей под кривыми AUC (Area Under Curve).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пациенты, материал которых вошел в исследование, относились к разным возрастным группам, соответствующим широкому отрезку онтогенеза: от репродуктивного возраста до пожилых. Исследование экспрессии мРНК субъединиц протеасом и активности протеасом показало, что возрастная разница не влияла на изучаемые показатели, так как статистический анализ не выявил значимых различий ($p \leq 0.05$) между возрастными группами (табл. 2).

В табл. 3 приведены данные по экспрессии β -субъединиц протеасом у больных ПРГ по сравнению с больными с хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани, ассоциированными с дисплазией (DI-III) и без дисплазии (D0). В представленном исследовании выявлено изменение уровня экспрессии генов протеасом в тканях ПРГ по сравнению как с образцами ХГЗГ без дисплазии, так и с дисплазией эпителия, которая считается предопухолевым состоянием.

Таблица 3. Уровень экспрессии В-субъединиц протеасом в группах больных в тканях плоскоклеточного рака гортани и эпителия больных хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани, ассоциированными с дисплазией (ХГЗГ DI-III), без дисплазии (ХГЗГ D0), ME (Q1-Q3)

Группа больных	n	Уровень экспрессии, усл. ед.			
		<i>PSMB4</i>	<i>PSMB5</i>	<i>PSMB6</i>	<i>PSMB7</i>
ХГЗГ(D0)	11	0.25 (0.15–0.5)	0.5 (0.15–0.75)	0.5 (0.13–1.0)	0.25 (0.15–0.5)
ХГЗГ(DI-III)	9	0.75 (0.5–1.0)	1.0 (0.75–1.0)	1.0 (0.5–1.0)	0.5 (0.5–1.0)
ПРГ	29	2.0* (1.0–2.5)	2.0* (2.0–4.0)	4.0* (2.0–4.4)	1.0* (1.0–4.0)

Примечание: * – значимость различий по сравнению с ХГЗГ(D0) и ХГЗГ(DI-III).

Таблица 4. Химотрипсинподобная (ХТП) и каспазаподобная (КП) активности протеасом в тканях плоскоклеточного рака гортани и эпителия больных хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани, ассоциированными с дисплазией (ХГЗГ DI-III), без дисплазии (ХГЗГ D0), ME (Q1-Q3)

Группа больных	n	Активность протеасом, × 10 ⁶ ед./мг			
		ХТП	Р	КП	Р
Условно-нормальная ткань	49	70.3 (30.6–88.7)		101.2 (84.9–123.8)	
ХГЗГ(D0)	11	72.3 (50.4–88.7)		130.7 (111.6–208.3)	P1 < 0.05
ХГЗГ(DI-III)	9	81.7 (78.3–86.1)	P1 < 0.05	198.5 (117.8–205.4)	P1 < 0.05
ПРГ	29	168.7 (121.4–274.0)	P1 < 0.05 P2 < 0.05	341.7 (245.8–435.7)	P1 < 0.05 P2 < 0.05

Примечания: P1 – значимость различий больных ХГЗГ(D0), ХГЗГ(DI-III) и ПРГ по сравнению с условно-нормальной тканью; P2 – значимость различий больных ХГЗГ(D0), ХГЗГ(DI-III) с ПРГ.

Наблюдалось значимое повышение уровня экспрессии мРНК всех изучаемых β-субъединиц протеасом у пациентов с ПРГ. Так, уровень экспрессии *PSMB4* был в 8 и в 3 раза выше в опухолевых тканях гортани в сравнении с гиперпластически и диспластически измененным эпителием, *PSMB5* – в 4 и 2 раза, *PSMB6* – в 8 и 4 раза и *PSMB7* – в 4 и 2 раза соответственно.

Особый интерес представляет изучение активностей протеасом, что может свидетельствовать об их функциональном состоянии. В результате проведенного исследования выявлено увеличение ХТП и КП активностей внутриклеточных протеасом в злокачественном эпителии гортани по сравнению с условно-нормальной тканью в 2.4 и 3.4 раза, соответственно (табл. 4). В группе рака гортани ХТП и КП активности возрастают в 2.3 и 2.6 раза, соответственно, по сравнению с ХГЗГ(D0), а при сравнении с ХГЗГ(DI-III) – в 2.1 и 1.7 раза

соответственно. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что протеасомы принимают активное участие в развитии ПРГ.

На следующем этапе работы было проведено исследование активностей циркулирующих протеасом, которые присутствуют в крови пациентов. При опухолевых процессах раковые клетки могут секретировать протеасомы во внеклеточное пространство, также протеасомы могут выходить в циркуляцию при распаде опухолевых клеток. Кроме того, внеклеточные протеасомы могут появляться при разрушении микрочастиц, образованных в результате мембранного блеббинга или в составе экзосом (Choi et al., 2021).

Данные, представленные в табл. 5, демонстрируют значимые изменения активностей циркулирующих протеасом в сыворотке крови пациентов при ПРГ. ХТП и КП активности в 3.2 и 2.2 раза выше в ПРГ при сравнении с группой контроля.

Таблица 5. ХТП и КП активности циркулирующих протеасом в группах больных ХГЗГ(D0), ХГЗГ(DI-III) и ПРГ, МЕ (Q1-Q3)

Группа	n	Активность циркулирующих протеасом, × 10 ⁶ ед./мл			
		ХТП	P	КП	P
Группа контроля	10	307.3 (213.4–368.7)		837.0 (629.0–1545.7)	
ХГЗГ(D0)	11	398.3 (193.7–754.3)	P2 < 0.05	965.7 (765.7–1993.0)	
ХГЗГ(DI-III)	9	564.7 (385.3–595.3)	P2 < 0.05	1372.7 (984.7–1894.3)	
ПРГ	29	986.3 (578.3–1491.0)	P1 < 0.05	1924 (1333.0–3409.1)	P1 < 0.05

Примечания: P1 – значимость различий группы ПРГ по сравнению с группой контроля; P2 – значимость различий групп ХГЗГ(D0) и ХГЗГ(DI-III) по сравнению с ПРГ.

Также для циркулирующих форм характерно повышение ХТП активности в сыворотке крови пациентов с ПРГ по сравнению с больными ХГЗГ(D0) (в 2.5 раза) и ХГЗГ(DI-III) (в 1.8 раза).

Проведение ROC-анализа продемонстрировало перспективу определения уровней изучаемых показателей для различения больных ПРГ и ХГЗГ (D0-DIII), результаты которого представлены на рис. 1. При изучении значимости уровня экспрес-

сии субъединиц и активностей тканевых и циркулирующих протеасом для прогнозирования перехода предрака в рак было выявлено, что можно классифицировать уровень экспрессии мРНК *PSMB5* и ХТП активность протеасом в качестве достаточно сильных предикторов для определения пациента в группу онкологического риска. Так, для уровня экспрессии мРНК *PSMB5* AUC (площадь под кривой) равна 0.934 ± 0.033 , ($p < 0.05$, ДИ = 0.870–0.999), чувствительность – 79.3%, специфичность – 90%. Для ХТП активности протеасом в ткани AUC равна 0.953 ± 0.032 ($p < 0.05$, ДИ = 0.892–1.000), чувствительность 91.3%, специфичность 90%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс неопластической трансформации, который включает переход эпителия от дисплазии до злокачественных новообразований, является отклонением от нормального онтогенеза и характеризуется сложными многоступенчатыми молекулярными процессами. Ярким примером опухолевой трансформации эпителия является развитие плоскоклеточного рака гортани. Непредсказуемость биологического поведения измененной ткани и возможности ее малигнизации в значительной степени обусловлена недостаточной изученностью сложных механизмов опухолевого роста и отсутствием данных о степени вовлеченности в эти процессы молекулярных и биохимических изменений, происходящих в клетках при переходе предрака в рак. Опухолевые клетки характеризуются высоким уровнем метаболизма, связанным с неконтролируемой пролиферацией и нарушением регуляции многих клеточных процессов. Быстрый обмен белков обеспечивается их деградацией протеолитическими системами, которые играют ключевую роль в сохранности клеточного

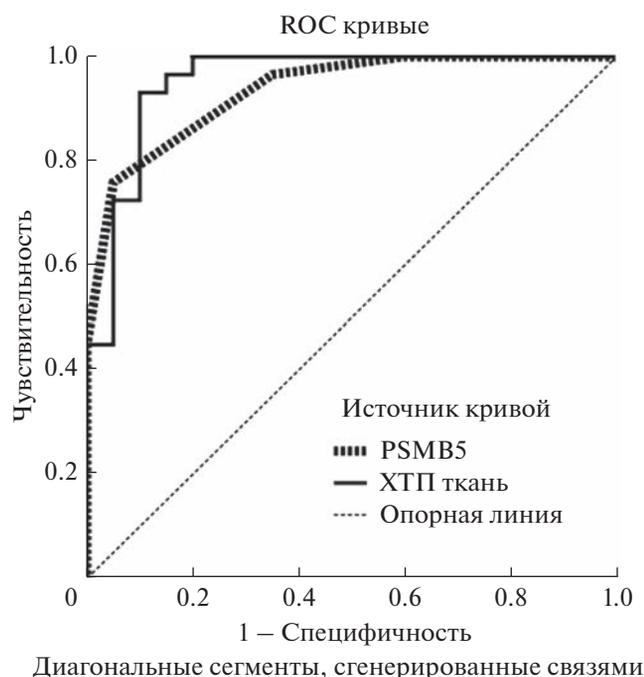


Рис. 1. ROC-кривые для определения оценки качества бинарной классификации *PSMB5*, ХТП активность протеасом в ткани предопухолевых и опухолевых заболеваний гортани.

протеома. Изучение уровня экспрессии генов протеасом и определение их функциональной активности в опухолевых и предопухолевых тканях позволяет выяснить роль изучаемых показателей в развитии рака гортани.

Для определения показателей в биопсийных образцах был модифицирован метод анализа ХТП и КП активностей протеасом для малых объемов тканей. Было проведено исследование экспрессии генов субъединиц протеасом и определение ХТП и КП активностей в образцах диспластически измененных и злокачественных тканей гортани, полученных во время видеоларингоскопии. Также проведено сравнительное исследование активностей циркулирующих протеасом в тех же группах больных.

Полученные результаты свидетельствуют о повышении уровня экспрессии мРНК β -субъединиц, ХТП и КП активностей тканевых и ХТП активности циркулирующих протеасом у пациентов с ПРГ по сравнению с эпителием больных хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани.

Следует отметить, что изменение активности протеасом в развитии ПРГ через стадию предрака имеет как сходство, так и отличие в сравнении с изменениями функционирования протеасом в раннем онтогенезе в норме. Так, ХТП активность возрастает в обоих процессах, в то время как изменение КП активности носит разнонаправленный характер. Увеличиваясь на первой и второй постнатальных неделях в процессе нормального онтогенеза ряда органов, КП активность резко падает к концу первого постнатального месяца (Kargova et al., 2013; Kargov et al., 2022). В развитии ПРГ отмечено только возрастание КП активности. Очевидно, нарезание белков после отрицательно заряженных аминокислотных остатков с помощью КП центров протеасом существенно для опухолевого процесса.

Ранее проводилось изучение уровня экспрессии β -субъединиц протеасом в ткани рака почки и показано его увеличение для опухолевых тканей по сравнению с условно-нормальными (Guo et al., 2022). Показано, что высокая экспрессия *PSMB5* наблюдалась в ткани рака молочной железы и предсказывала худшую выживаемость (Wang et al., 2017). Также ранее нами было показано увеличение ХТП активности протеасом в различных злокачественных новообразованиях по сравнению с неизменной тканью (Спирина и др., 2012; Kondakova et al., 2012). Вероятно, изменение структуры и функции протеасом играет важную роль в развитии рака.

В представленной работе методом ROC-анализа показана связь экспрессии мРНК *PSMB5*, кодирующей ХТП активность протеасом и ХТП активности тканевых протеасом с развитием рака гортани у больных хроническими заболеваниями

гортани. Эти показатели можно рассматривать в качестве кандидатных маркеров для прогноза развития рака гортани у больных предопухолевыми заболеваниями гортани, которые, в свою очередь, могут лечь в основу разработки нового перспективного способа оценки риска развития рака гортани.

ВЫВОДЫ

Таким образом, протеасомы вовлечены в процессы отклонения от нормального онтогенеза и играют важную роль в развитии рака гортани, обуславливая переход предрака в рак. Уровни показателей экспрессии мРНК субъединиц протеасом и активность протеасом в тканях и в сыворотке крови претерпевали существенные изменения в группах ПРГ по сравнению с предопухолевыми заболеваниями. Выявленные изменения в уровне субъединиц протеасом и активности протеасом в ткани рака гортани по сравнению с предопухолевыми заболеваниями могут стать основой для разработки новых прогностических маркеров для формирования групп повышенного онкологического риска.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЦКП ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН за предоставление оборудования для исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-01184-22-04 в Томском НИМЦ и в рамках Государственного задания № 0088-2021-0008 в ФГБУН Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции с биологическим материалом пациентов соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дьяконов Е.Е., Цимоха А.С. Посттрансляционные модификации протеасом и их функциональное значение // Цитология. 2019, Т. 61. № 3. С. 175–184. <https://doi.org/10.1134/S0041377119030039>
- Зайкова Ю.Я., Евтеева И.Н., Цимоха А.С. Протеасомы и их возможная роль во внеклеточном пространстве // Цитология. 2013. Т. 55. № 11. С. 753–760.

- Нажмудинов И.И., Серебрякова И.Ю., Магомедова К.М. и др.* Применение современных технологий в лечении предраковых заболеваний гортани // Вестник оториноларингологии. 2018. Т. 83. № 5. С. 45–48.
- Спирина Л.В., Бочкарева Н.В., Кондакова И.В. и др.* Регуляция инсулиноподобных факторов роста и NF-κB протеасомной системой при раке эндометрия // Молекулярная биология. 2012. Т. 46. № 3. С. 452–460.
- Шашова Е.Е., Колегова Е.С., Кондакова И.В., Завьялов А.А.* Внутриклеточный и циркулирующий пулы протеасом: значение при злокачественных новообразованиях различных локализаций // Сибирский онкологический журн. 2015. № 6. С. 76–82.
- Abbas R., Larisch S.* Killing by degradation: regulation of apoptosis by the ubiquitin-proteasome-system // Cells. 2021. V. 10. № 12. P. 3465. <https://doi.org/10.3390/cells10123465>
- Budenholzer L., Cheng C.L., Li Y. et al.* Proteasome structure and assembly // Mol. Biol. 2017. V. 429. № 22. P. 3500–3524. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.027>
- Choi W.H., Kim S., Park S. et al.* Concept and application of circulating proteasomes // Experimental & Molecular Medicine. 2021. V. 53. № 10. P. 1539–1546. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00692-x>
- Ciolofan M.S., Vlăescu A.N., Mogoantă C.A. et al.* Clinical, histological and immunohistochemical evaluation of larynx cancer // Curr Health Sci. J. 2017. V. 43. P. 367–375. <https://doi.org/10.12865/CHSJ.43.04.14>
- Erokhov P.A., Kulikov A.M., Karpova et al.* Proteasomes in patient rectal cancer and different intestine locations: where does proteasome pool change? // Cancers. 2021. V. 13. P. 1108. <https://doi.org/10.3390/cancers13051108>
- Guo J.-Y., Jing Z.-Q., Li X.-J. et al.* Bioinformatic analysis identifying PSMB 1/2/3/4/6/8/9/10 as prognostic indicators in clear cell renal cell carcinoma // Int. J. Med. Sci. 2022. V. 19. № 5. P. 796–812. <https://doi.org/10.7150/ijms.71152>
- Jiang T.X., Ma S., Han X. et al.* Proteasome activator PA200 maintains stability of histone marks during transcription and aging // Theranostics. 2021. V. 11. № 3. P. 1458–1472. <https://doi.org/10.7150/thno.48744>
- Karpov N.S., Erokhov P.A., Sharova N.P. et al.* How is the development of the rat's small intestine related to changes in the proteasome pool? // Rus. J. Dev. Bio. 2022. V. 53. № 1. P. 41–50.
- Karpova Ya.D., Lyupina Yu.V., Astakhova T.M. et al.* Immune proteasomes in the development of rat immune system // Bioorg. Khim. 2013. V. 39. P. 400–410. <https://doi.org/10.1134/s1068162013040092>
- Kondakova I.V., Shashova E.E., Sidenko E.A. et al.* Estrogen receptors and ubiquitin proteasome system: Mutual regulation // Biomolecules. 2020. V. 10. № 4. P. 500. <https://doi.org/10.3390/biom10040500>
- Kondakova I.V., Spirina L.V., Shashova E.E. et al.* Proteasome activity in tumors of the female reproductive system // Russian J. Bioorganic Chemistry. 2012. V. 38. № 1. P. 106–110. <https://doi.org/10.1134/s106816201201013x>
- Lee G.Y., Haverty P.M., Li L. et al.* Comparative oncogenomics identifies PSMB4 and SHMT2 as potential cancer driver genes // Cancer Research. 2014. V. 74. № 11. P. 3114–3126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2683>
- Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method // Methods. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luers J.C., Sircar K., Drebber U. et al.* The impact of laryngeal dysplasia on the development of laryngeal squamous cell carcinoma // Eur. Arch Otorhinolaryngol. 2014. V. 71. № 3. P. 539–545. <https://doi.org/10.1007/s00405-013-2670-2>
- Ma W., Kantarjian H., O'Brien S. et al.* Enzymatic activity of circulating proteasomes correlates with clinical behavior in patients with chronic lymphocytic leukemia // Cancer. 2008. V. 12. № 6. P. 1306–1312. <https://doi.org/10.1002/cncr.23301>
- Nocini R., Molteni G., Mattiuzzi C.* Updates on larynx cancer epidemiology // Chin. J. Cancer Res. 2020. V. 32. P. 18–25. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.01.03>
- Obid R., Redlich M., Tomeh C.* The treatment of laryngeal cancer // Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America. 2019. V. 31. № 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.j.coms.2018.09.001>
- Sahu I., Glickman M.H.* Structural insights into substrate recognition and processing by the 20S proteasome // Biomolecules. 2021. V. 11(2). P. 148. <https://doi.org/10.3390/biom11020148>
- Sharova N.P., Astakhova T.M., Karpova Ya.D. et al.* Changes in proteasome pool in human papillary thyroid carcinoma development // Cent. Eur. J. Biol. 2011. V. 6. № 4. P. 486–496.
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A.* Cancer statistics, 2020 // CA Cancer J. for Clinicians. 2020. V. 70. № 1. P. 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Wada M., Saito S. et al.* Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiologic significance // J. Lab. Clin. Med. 1993. V. 121. № 2. P. 215–223.
- Wang C.-Y., Li C.-Y., Hsu H.-P. et al.* PSMB5 plays a dual role in cancer development and immunosuppression // American J. Cancer Research. 2017. V. 7. № 11. P. 2103–2120.
- Wang H., He Z., Xia L. et al.* PSMB4 overexpression enhances the cell growth and viability of breast cancer cells leading to a poor prognosis // Oncol. Rep. 2018. V. 40. № 4. P. 2343–2352. Epub 2018 Jul 20. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6588>

Sharp Increase in Expression of Subunit Genes and Activity of Proteasomes in Laryngeal Ontogeny Is Associated with the Development of Squamous Cell Carcinoma

I. V. Kondakova^{1,*}, E. A. Sidenko^{1,3}, T. M. Astakhova², G. V. Kakurina^{1,3},
E. E. Sereda^{1,3}, O. V. Cheremisina¹, E. L. Choynzonov^{1,3}, and N. P. Sharova²

¹*Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia*

²*Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

³*Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia*

**e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru*

Proteasomes, the most important participants in protein catabolism, maintain proteostasis and regulate cellular processes in ontogeny. Deviations in the functioning of proteasomes are associated with the development of various pathologies, including a number of oncological diseases. In this work, we studied changes in subunit gene expression and proteasome activity in laryngeal cancer tissue and epithelium of patients with chronic hyperplastic diseases of the larynx, which are considered obligate precancer. The activity of circulating proteasomes was also studied in the same groups of patients. The level of gene expression was assessed using quantitative reverse transcriptase PCR in real time. A method for assessing chymotrypsin-like (CTL) and caspase-like (CL) activities of proteasomes has been modified for the analysis of small volumes of biopsy samples. An increase in the level of expression of the proteasome genes (*PSMB6*, *PSMB7*, *PSMB5*, and *PSMB4*) in the tissues of squamous cell carcinoma of the larynx was shown compared to pre-tumor samples. An increase in CTL and CL activities of intracellular proteasomes in the malignant epithelium of the larynx was also found in comparison with the conditionally normal tissue and with the epithelium of patients with chronic hyperplastic diseases of the larynx. An increase in chymotrypsin-like activity was observed in circulating proteasomes. ROC-analysis (Receiver operating characteristic) revealed the relationship between *PSMB5* mRNA expression and CTP activity of tissue proteasomes with the development of laryngeal cancer in patients with chronic hyperplastic diseases of the larynx. In the future, it is possible to use these indicators to develop a method for predicting the transition of precancer of the larynx to cancer.

Keywords: proteasome subunit gene expression, proteasome chymotrypsin-like activity, proteasome caspase-like activity, laryngeal cancer, chronic hyperplastic diseases of the larynx

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА НА ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ИНВАЗИОННОГО ВИДА *Gmelinoides fasciatus* (CRUSTACEA: AMPHIPODA) В ОНЕЖСКОМ ОЗЕРЕ

© 2023 г. А. И. Сидорова*

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

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

Поступила в редакцию 14.01.2023 г.

После доработки 10.05.2023 г.

Принята к публикации 11.05.2023 г.

Изучение особенностей жизненного цикла, позволяющих видам успешно адаптироваться к новым для них условиям среды — одно из актуальных направлений экологической эволюционной биологии развития (Eco-Devo). Инвазионный вид *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing 1899) (Crustacea: Amphipoda) — перспективный модельный объект для исследований в этом направлении. Этот вид способен образовывать устойчивые популяции в водоеме-реципиенте Онежское озеро. Успешной натурализации *G. fasciatus* в новых условиях на северной границе ареала европейской части России (Петрозаводская губа и Повенецкий залив Онежского озера) способствует достаточное для развития количество градусо-дней (2269–2626 за период конец мая—начало октября). Таким образом, в условиях 62° с.ш. (Петрозаводская губа) — 63° с.ш. (Кумса-губа Повенецкого залива) Онежского озера температурный фактор не лимитирует развитие популяции амфиподы. Эти температурные условия определяют характерный для локальной популяции *G. fasciatus* одногодичный жизненный цикл с одновременным присутствием генераций предыдущего года и текущего года. По-видимому, именно пластичность жизненного цикла обеспечивает *G. fasciatus* возможность успешного вселения в водоемы-реципиенты.

Ключевые слова: жизненный цикл, пластичность жизненного цикла, Crustacea, Amphipoda адаптация, *Gmelinoides fasciatus*, инвазионный вид, градусо-дни, температурный фактор, популяционные показатели, Онежское озеро

DOI: 10.31857/S0475145023030072, EDN: ZSCRHP

ВВЕДЕНИЕ

Температура — один из важнейших экологических факторов. В прямой зависимости от температуры находятся интенсивность обмена веществ водных и наземных организмов, а значит скорость их развития и роста. Температурный режим более устойчив в водоемах, чем на поверхности суши, что связано с физическими свойствами воды. Прежде всего, это высокая удельная теплоемкость, благодаря которой нагревание воды и ее охлаждение происходит значительно медленнее, чем воздушной среды (Дроздов, 2011).

В данной работе влияние температурного фактора на особенности жизненного цикла и успешность адаптации водных организмов к новой среде обитания исследовались на примере амфиподы *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing 1899). Этот вид с 2001 года регистрируется в Онежском озере как инвазионный (Березина, Панов, 2003). *G. fasciatus* является байкальским субэндемиком (Чертопруд,

2006), широко расселившимся по водоемам и водотокам европейской части России в результате широкомасштабных акклиматизационных работ, проводимых в 1960-х гг. с целью улучшения кормовой базы ихтиофауны (Нилова, 1976).

Амфипода *G. fasciatus* характеризуется более широким диапазоном термотолерантности (Protorova et al., 2011; Shatilina et al., 2011), чем другие байкальские виды амфипод (*Eulimnogammarus taacki* Gerstf., 1858, *E. marituji* Vaz., 1945). Можно предположить, что такая устойчивость может объясняться высокой активностью механизмов выведения токсических метаболитов, поддержания энергетического гомеостаза и увеличения доли анаэробного гликолиза (Аксенов-Грибанов, Лубяга, 2012).

Для популяции видов-вселенцев важно изучать критерии их успешной инвазии в новых условиях — такие, как особенности жизненного цикла, сроки созревания и продолжительность

жизни (Алимов и др., 2004). Биология вида *G. fasciatus* до сих пор изучалась в оз. Байкал (Бекман, 1962), Ладожском озере (Панов, 1986; Барков, 2006; Курашов, 2011), оз. Отрадном (Нилова, 1972), Братском водохранилище (Калматынов, Томилов, 2001), оз. Арахлей (Матафонов и др., 2005; Матафонов, 2020) и Невской губе Финского залива Балтийского моря (Berezina, Panov, 2004). Однако, для Онежского озера имеются сведения о количественных характеристиках популяции данного вида (Березина, Панов, 2003; Кухарев и др., 2008). Специальных работ, посвященных детальному изучению особенностей жизненного цикла *G. fasciatus*, в данном водоеме ранее не проводилось.

В задачу работы входило изучение влияния температурного фактора на жизненный цикл инвазионного вида *G. fasciatus* в условиях водоема-реципиента Онежского озера на северной границе ареала в Европейской части России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Местообитание объекта исследования

Онежское озеро (рис. 1а) расположено в зоне Европейского севера России и является вторым по величине пресноводным озером Европы. В естественном состоянии площадь зеркала составляла 9720 км², из которых 250 км² приходилось на 1500 островов. Протяженность озера с севера на юг составляет 248 км, с запада на восток — 96 км. (Филатов, 2010).

Петрозаводская губа (рис. 1б) — один из наиболее крупных заливов Онежского озера, составляющий 1.3% площади озера (Сабылина, Рыжак, 2007). Длина ее составляет 19 км, средняя ширина — 7, площадь водной поверхности около 125 км², средняя глубина — 18.2 м (Малинина, Солнцева, 1972). Контур берегов сравнительно плавные, рельеф дна характеризуется слабой расчлененностью. Область с глубинами 20–25 м занимает центральную часть губы. Отделяющие губу от открытой части озера Ивановские острова и мелководная зона у побережья г. Петрозаводска образует естественный порог, ограничивающий водообмен с центральным плесом (Охлопкова, 1972). К литоральной зоне относится 20.8% от общей площади Петрозаводской губы, она представляет собой участок шириной в 400–450 м, со сравнительно большими уклонами дна (0.022 м/км), равномерно тянущийся вдоль всей береговой линии (Кириллова, 1975).

Кумса-губа (рис. 1в), расположенная в восточной части Большой губы Повенецкого залива, узкая, вытянутая в северо-западном направлении. Ее берега в вершине низкие, ближе к выходу в озеро переходят в высокие, которые хорошо защищают эту часть водоема от ветрового воздей-

ствия (Фрейндлинг, 1974). Площадь Кумса-губы составляет 1.2 км². Средняя глубина — 7 м, при максимальной глубине 17 м, расположенной ближе к выходу из губы. В губе хорошо развита водная растительность, которая занимает 30% (38 га) ее площади. Флористический состав представлен 31 видом. Доминирующими являются группировки тростника, составляющие 25% общего покрытия, рдестов 18, хвоща и кубышки по 11%. Полоса зарослей шириной в 15–50 м окаймляет почти все берега губы (Клюкина, 1974). Кумса-губа хорошо защищена от ветров, волновые процессы в ней развиты ограниченно и перемешивание вод, а, следовательно, взмучивание и перенос верхнего слоя осадков выражены слабо. Все эти факторы способствуют накоплению в донных отложениях органического вещества (Васильева, 1992).

Методы исследования макрозообентоса

Для изучения жизненного цикла амфипод на литорали Петрозаводской губы гидробиологический материал собирали с конца мая по начало октября 2010 г., на двух точках (П1 и П2), каждые 10 дней, в трех повторностях (рис. 1а, 1б). Станция П1 представляет собой песчано-каменистый биотоп с зарослями макрофитов и затишными условиями. Мониторинговая станция П2 — каменистый, прибойный биотоп.

В 2011 г. гидробиологический материал был собран в Кумса-губе Повенецкого залива Онежского озера на двух точках К1 и К2 (рис. 1а, 1в), в двух повторностях, каждые 10 дней. Станция К1 характеризуется илистым биотопом открытого типа с зарослями макрофитов. Мониторинговая станция К2 представляет собой затишной илистый биотоп с зарослями высшей водной растительности.

Непосредственно в местах отбора проб производились визуальные наблюдения (степень волнения), отмечались погодные условия. Далее измерялась температура воды, при помощи электронного термометра с точностью 0.1°C.

Отбор и обработку проб осуществляли в соответствии с руководствами по сбору пресноводного бентоса (Винберг, Лаврентьева, 1984). Использовали трубчатый металлический пробоотборник Панова-Павлова (Панов, Павлов, 1986), с площадью захвата 0.07 м² и высотой 0.65 м. Цилиндр опускали на дно и вращательными движениями заглубляли в грунт на 5–7 см таким образом, чтобы верхний край цилиндра находился над поверхностью воды. Ограниченный цилиндром объем воды взмучивался, и тщательное сачком. При этом содержимое сачка периодически переносили в емкость с водой. Затем осматривали камни, находящиеся на дне и растения. Животных с камней

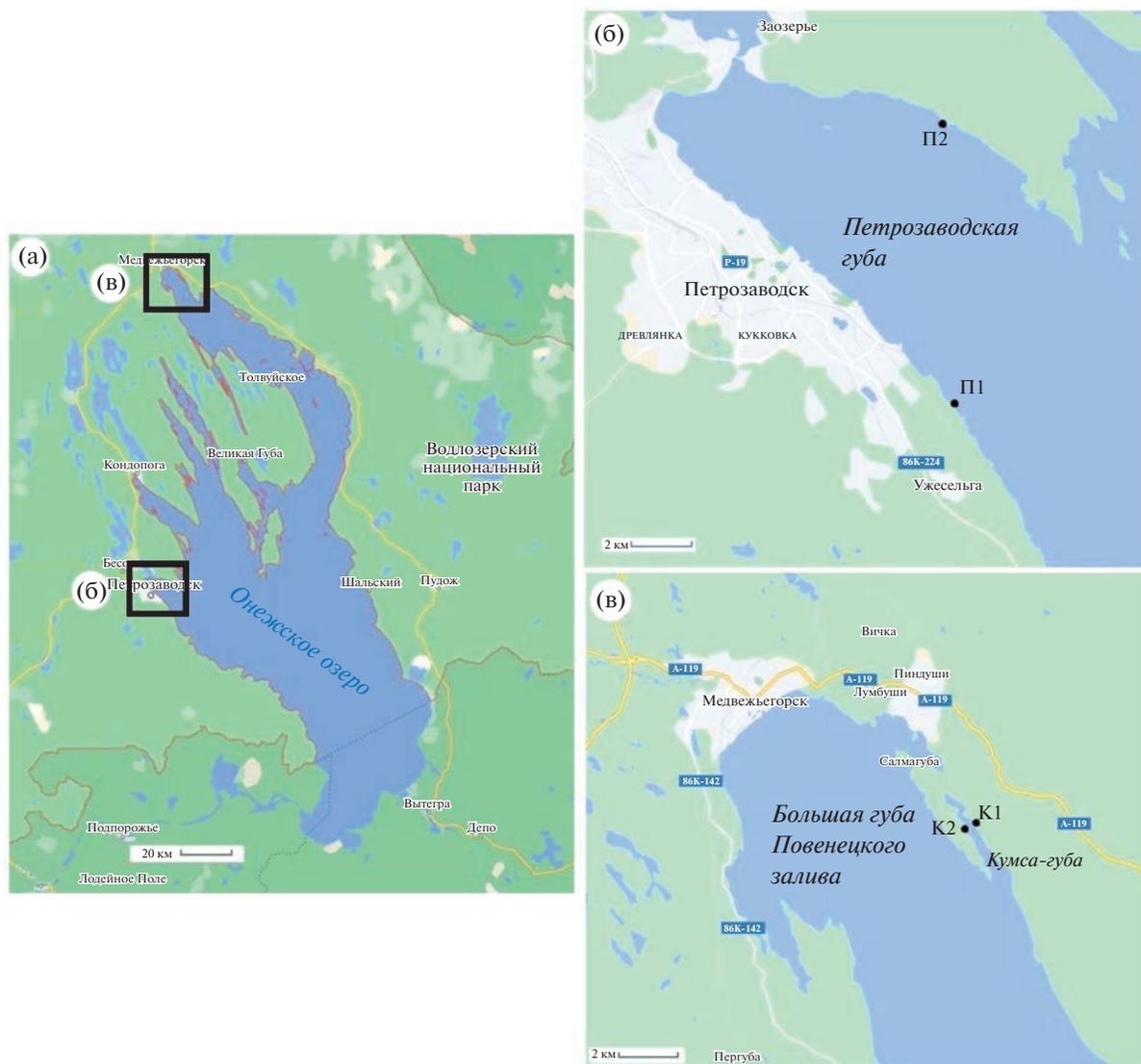


Рис. 1. Расположение мониторинговых станций в Петрозаводской губе и Повенецком заливе Онежского озера. (а) Карта региона, области расположения мониторинговых станций (б и в) выделены рамками. (б) Мониторинговые станции в Петрозаводской губе. (в) Мониторинговые станции в Кумса-губе Повенецкого залива Онежского озера.

также переносили в пробу. Сборы проводили на глубине до 0.4 м, в 2–3-х точках, находящихся на расстоянии примерно 5 м друг от друга.

Таксономический анализ организмов макрозообентоса производился с помощью микроскопа Микмед-6 (ЛОМО, Россия), в соответствии с определителем (Алексеев, Цалолихин, 2016). В лаборатории рачков измеряли под стереомикроскопом МСП-2(2) (ЛОМО, Россия) с точностью 0.1 мм. Взвешивание особей *G. fasciatus* производили после сушки на фильтровальной бумаге с точностью 0.0001 г, используя лабораторные аналитические весы ВЛ-124В (ГОСМЕТР, Россия).

Всего с мая по сентябрь 2010 и с мая по октябрь 2011 гг. было отобрано 146 проб макрозообентоса. Было измерено и взвешено 5728 экземпляров амфипод (за длину тела принято расстояние от ро-

струма до основания тельсона). В соответствии с ранее опубликованной методикой (Матафонов, 2003; Курашов, 2011), при изучении жизненного цикла популяции *G. fasciatus* в Онежском озере особей объединяли в следующие размерные группы (р.г.): а) с длиной меньше 1.5 мм – I группа; б) от 1.6 до 3.0 мм – II; в) от 3.1 до 5.0 мм – III; г) от 5.1 до 7.0 мм – IV; д) от 7.1 до 9.0 мм – V и е) свыше 9.1 – VI размерная группа.

Продолжительность жизни амфипод рассчитывали по уравнению Берталанфи (Алимов, 1981; Курашов, 2011):

$$t_{\max} = \frac{-\ln \left[\left(1 - \frac{l_{\max}}{l_{\infty}} \right) \right]}{k},$$

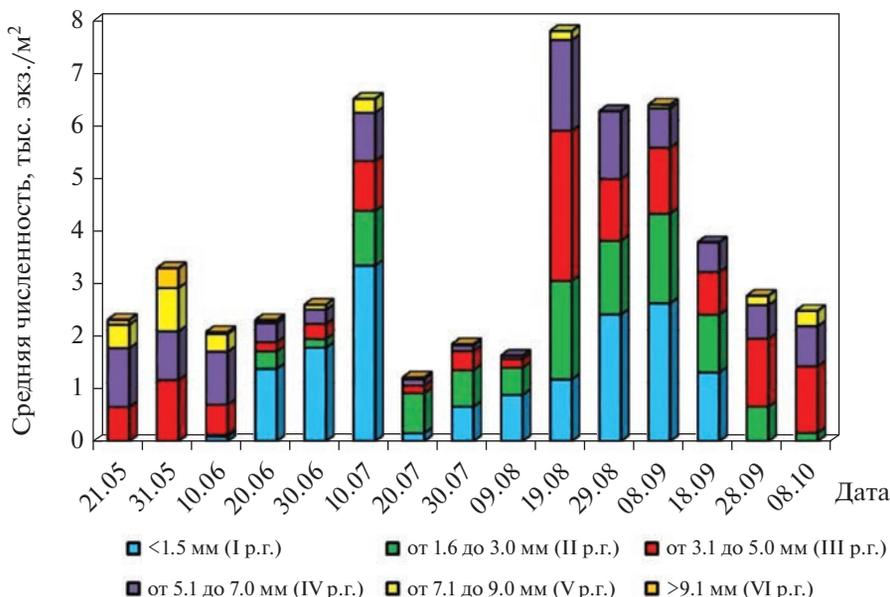


Рис. 2. Средняя численность (тыс. экз./м²) размерных групп на станции П1 в Петрозаводской губе Онежского озера. Цветная кодировка обозначает размерные группы.

где t_{\max} — максимальная продолжительность жизни *G. fasciatus*, годы; l_{\max} — наибольшая длина самцов или самок в пробах из озера; k и L_{∞} — параметры уравнения Бергаланфи.

Статистическую обработку данных выполняли согласно опубликованной методике (Ивантер, Коросов, 2010) в лицензированном пакете Microsoft Office Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сезонная динамика популяционных показателей *G. fasciatus* в Петрозаводской губе Онежского озера

Средняя численность амфиподы в Петрозаводской губе на станции П1 составила 3454 экз./м², средняя биомасса — 7.7 г/м², при максимальных показателях — 13500 экз./м² и 38.7 г/м² соответственно. Максимальные значения численности и биомассы были отмечены в середине августа. На мониторинговой станции П2 средняя численность рачков составила 7000 экз./м², при средней биомассе — 4.0 г/м².

Станция П1 в Петрозаводской губе является репрезентативной станцией, поскольку популяционные показатели, такие как, средняя численность (3.44 ± 0.44 тыс. экз./м²) и биомасса (7.67 ± 1.31 г/м²) находятся в пределах варьирования популяционных показателей на литорали всего Онежского озера (Березина, Панов, 2003; Кухарев и др., 2008). Так, наименьшая численность (1.16 ± 0.85 тыс. экз./м²) и биомасса (0.64 ± 0.44 г/м²) отмечена в заливе Большое Онего (Кухарев и др., 2008). Максималь-

ные показатели численности зафиксированы в заливе Малое Онего, а именно, 12.38 ± 6.36 тыс. экз./м². Наибольшая биомасса зарегистрирована в северной части Повенецкого залива и достигала 9.34 ± 2.85 г/м².

Динамика размерно-возрастной структуры *G. fasciatus* в Петрозаводской губе Онежского озера

В мае на станции П1 в популяции *G. fasciatus* доминировали старшие возрастные группы, т.е. размерные группы (р.г.) III и IV (особи прошлогодней генерации). Молодые рачки отсутствовали (рис. 2).

В начале июня было зарегистрировано появление молоди размерной группы I новой генерации. Массовый вымет молоди (50–65% от общей численности всех возрастов) был отмечен в конце июня — начале июля. В июле численность р.г. I начала уменьшаться, доминирующей стала р.г. II (60% от численности популяции). Все возрастные группы популяции представлены в середине июля, с преобладанием р.г. II, III и IV.

Второй вымет молоди размерной группы I (53–40% от численности популяции) отмечается с конца августа до середины сентября. В конце сентября молодые особи менее 1.5 мм не встречались, что свидетельствует о завершении размножения *G. fasciatus*. В этот период доминировали рачки размером от 3.1 до 5 мм.

Динамика популяционных показателей и возрастная структура в целом совпадали с таковыми на двух станциях залива. В отличие от П1, на мо-

Таблица 1. Особенности жизненного цикла *G. fasciatus* в Петрозаводской губе Онежского озера

Месяц	Дата	Станция П1		Станция П2		Особенности жизненного цикла
		T, °C	Σ гр.-дн.	T, °C	Σ гр.-дн.	
V	21.05.	3.9	212	4	201.5	Прошлогодня генерация, копулирующие пары
	31.05.	9.3		9		
VI	10.06.	11.3	420	12	430	Начало вымета молоди новой генерации
	20.06.	13.9		15		
	30.06.	16.4		16		
VII	10.07.	22.6	667	23.7	690	Первый массовый вымет молоди новой генерации
	20.07.	21.2		21		
	30.07.	23		24.3		
VIII	09.08.	21.1	540	17.7	450	Размножение самок прошлогодней генерации и подросшей молоди новой генерации; второй массовый вымет молоди
	19.08.	15.3		13.3		
	29.08.	14		14		
IX	08.09.	12.6	330	13.7	347	Завершение размножения
	18.09.	11		11		
	28.09.	10		10		
X	08.10.	5.7	180	5	150	Рост рачков
Итого	131 день		2349		2269	

Примечание: T, °C – температура воды на станции; Σ гр.-дн. – сумма градусо-дней.

ниторинговой станции П2 первая немногочисленная молодь (с длиной тела менее 1.5 мм) была зарегистрирована уже в конце мая.

Продолжительность жизни G. fasciatus в Петрозаводской губе Онежского озера

Продолжительность жизни в условиях Онежского озера, рассчитанная по уравнению Бергланфи (Алимов, 1981; Курашов, 2011) на станции П1 для самцов и самок составила 1.21 и 1.28 года, при максимальных размерах тела 11.5 и 9.5 мм соответственно. Рассчитанная нами продолжительность жизни бокоплава *G. fasciatus* на станции П1 Онежского озера близка к этому показателю для рачков из Ладожского озера. Согласно литературным данным (Курашов, 2011), самцы в Ладожском озере живут 0.93 года, самки – 1.13 года.

На станции П2 вычисленная максимальная продолжительность жизни *G. fasciatus* для самцов достигает 1.52 года; для самок – 1.28 года. При расчетах использовали максимальные значения размеров самцов (11.2 мм) и самок (9.5 мм).

Сезонная динамика температуры воды и жизненный цикл G. fasciatus в Петрозаводской губе Онежского озера

Важным фактором, обеспечивающим сезонную динамику рачков, является температура воды. На станции П1 в Петрозаводской губе вид *G. fasciatus* успевает пройти все важные фазы жизненного цикла, что обеспечивается необходимым количеством градусо-дней. В условиях мониторинговой станции П1 количество градусо-дней в период с конца мая по начало октября составило 2349. В течение летнего периода (июнь–август) количество градусо-дней составляло 1627 гр.-дн. (табл. 1).

Температурные условия на мониторинговой станции П2 незначительно отличались от условий станции П1: количество градусо-дней было немного меньше, 2269. Эти отличия объясняются взятием гидробиологических проб на двух станциях в течение одного дня. Основные фазы развития рачков *G. fasciatus* на мониторинговой станции П2 совпадают с фазами развития на станции П1. Таким образом, в Онежском озере на станциях П1 и П2 Петрозаводской губы темпера-

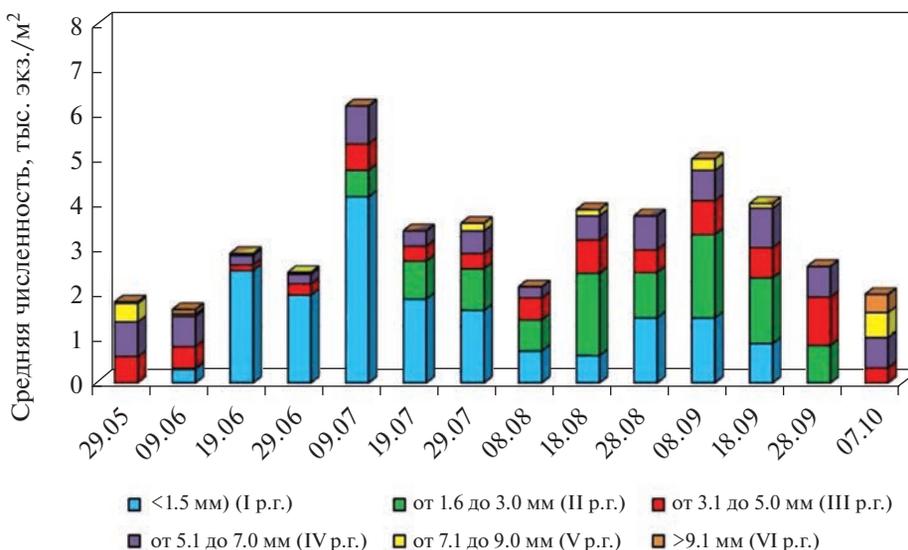


Рис. 3. Численность размерных групп (тыс. экз./м²) на станции К1 Кумса-губы Повенецкого залива Онежского озера. Цветная кодировка обозначает размерные группы.

турный фактор не лимитирует развитие популяции *G. fasciatus*.

Согласно ранее опубликованным данным (Panov, Verezhina, 2002), для отрождения двух выметов молоди у двух последующих генераций рачков *G. fasciatus* в летний сезон необходимо 1500–2000 гр.-дн. (оз. Ладожское, оз. Псковско-Чудское, оз. Отрадное). Для успешного завершения эмбрионального развития *G. fasciatus* требуется 248 градусо-дней. Для достижения половозрелости молоди новой генерации необходимо от 600 до 770 гр.-дн. (Матафонов, 2003; Курашов, 2011). Наблюдаемые нами значения градусо-дней в условиях Петрозаводской губы Онежского озера укладываются в эти диапазоны, достаточные для развития двух поколений новорожденных рачков до взрослых особей.

В Петрозаводской губе амфипода *G. fasciatus* имеет одногодичный жизненный цикл с генерациями прошлого и последующего годов.

Таким образом, на обеих станциях, затишной П1 и открытой для волн П2 Петрозаводской губы Онежского озера с песчано-каменистым типом биотопа, вид-вселенец *G. fasciatus* успешно натурализовался в новых условиях 62° с.ш. А это означает, что чужеродный вид способен образовывать устойчивые популяции в новом ареале (Алимов и др., 2004).

Сезонная динамика популяционных показателей *G. fasciatus* в Кумса-губе Повенецкого залива Онежского озера

Средняя численность *G. fasciatus* на станции К1 составила 2970 экз./м², при средней биомассе

5.6 г/м. На мониторинговой станции К2 средняя численность *G. fasciatus* составила 2236 экз./м², при средней биомассе – 3.5 г/м².

Сезонная динамика популяционных показателей на станции К2 близка к динамике таковых на станциях Петрозаводской губы и станции К1. Для сезонной динамики популяционных показателей Кумса-губы характерны два пика численности (в июле и августе), а также одновременное присутствие генераций прошлого и текущего года. Такая же сезонная динамика была характерна и для станций наблюдения Петрозаводской губы. Таким образом, в условиях 63° с.ш. температура воды не лимитирует развитие амфиподы *G. fasciatus*.

Динамика размерно-возрастной структуры *G. fasciatus* в Кумса-губе Повенецкого залива Онежского озера

Размерно-возрастная структура популяции *G. fasciatus* в Кумса-губе на мониторинговой станции К1 в начале периода исследования была представлена прошлогодней генерацией, размерными группами III, IV, V и VI. Молодые рачки начинали появляться только с начала июня. Это свидетельствует о том, что процесс размножения начинался в мае (рис. 3).

Со второй половины июня доля рачков с длиной тела менее 1.5 мм была максимальной и достигала 80–85% от общего числа всех размерных групп. В июле и августе происходило постепенное снижение числа молодых рачков I р.г. (с 65 до 15%), наряду с увеличением количества особей II р.г. (с 15 до 50%).

Таблица 2. Особенности жизненного цикла *G. fasciatus* в Повенецком заливе Онежского озера

Месяц	Дата	Станция К1		Станция К2		Особенности жизненного цикла
		T, °C	Σ гр.-дн.	T, °C	Σ гр.-дн.	
V	29.05.	10.5	326	12.5	387.5	Генерация прошлого года, копулирующие пары
VI	09.06.	19.5	441	22	523	Начало вымета молоди первого поколения
	19.06.	15		16.5		
	29.06.	11.5		16		
VII	09.07.	22	660	24	720	Первый массовый вымет молоди
	19.07.	20		22		
	29.07.	24		26		
VIII	08.08.	17	500	17	500	Размножение самок прошлого года и подросшей молоди; второй массовый вымет молоди
	18.08.	16		16		
	28.08.	17		17		
IX	08.09.	14	365	16	395	Завершение размножения
	18.09.	13		13.5		
	28.09.	9.5		10		
X	07.10.	10	100	10	100	Рост рачков
Итого	131 день		2391		2626	

Примечание: T, °C – температура воды на станции; Σ гр.-дн. – сумма градусо-дней.

В первой половине сентября были отмечены рачки всех размерных групп. В конце сентября, рачки с длиной тела менее 1.5 мм уже не обнаруживались, что указывает на завершение размножения амфиподы в условиях Повенецкого залива. Таким образом, на северной границе ареала в европейской части России (Кумса-губа Повенецкого залива) размерно-возрастная структура популяции *G. fasciatus* была сходна с таковой в Петрозаводской губе Онежского озера.

Продолжительность жизни G. fasciatus в Кумса-губе Онежского озера

Продолжительность жизни рачков в Кумса-губе на станции К1 была близка к показателям Петрозаводской губы. Для самцов продолжительность жизни составила 1.21 год, для самок – 1.13, при максимальных размерах 11.5 и 9.6 мм соответственно.

На станции наблюдения К2 максимальные размеры рачков *G. fasciatus* составили 11.5 мм (самцы) и 9.4 мм (самки). Продолжительность жизни, рассчитанная с применением уравнения Бергланфи (Алимов, 1981; Курашов, 2011), составила для самцов 1.21 года, а для самок – 1.46 года.

Сезонная динамика температуры воды и жизненный цикл G. fasciatus в Кумса-губе Повенецкого залива Онежского озера

В этом заливе, более северном по сравнению с другими изученными местообитаниями, количество градусо-дней в период исследования на станции К1 составило 2391 (табл. 2). Это значение было близким к значениям, полученным для Петрозаводской губы (2269–2349). Несмотря на значительное расстояние между двумя заливами (120 км), сходство температурных условий можно объяснить морфологическими особенностями Кумса-губы. Этот узкий залив имеет небольшую площадь (1.2 км²) среднюю глубину 7 м, при максимальной 17 м и достаточно хорошо прогревается. Максимальное количество градусо-дней, 2626, было зарегистрировано на мониторинговой станции К2. Это связано не только с затишными условиями, но и с особенностями морфологии залива (узкая форма и высокая степень прогревания воды в литоральной зоне).

G. fasciatus в Кумса-губе проходит все основные стадии развития. Таким образом, имеющееся на северной границе ареала вида количество градусо-дней не лимитирует развитие данного вида амфипод.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данные по популяционным показателям (численность и биомасса) инвазионного вида в условиях Онежского озера сопоставимы с аналогичными данными, полученными для других водоемов, что служит дополнительным доказательством натурализации вида *G. fasciatus* в Онежском озере. Так, в естественном ареале (озеро Байкал) численность *G. fasciatus* варьировала в пределах 10000–20000 экз./м², при биомассе 63–100 г/м² (Бекман, 1962). В приобретенном ареале, Ладожском озере, в 2004–2005 гг. численность *G. fasciatus* составила 936–3141 экз./м², при биомассе 4.2–10.3 г/м² (Барков, 2006). В 2009 г. численность изменялась от 8 до 7160 экз./м², при биомассе – 0.024–15.3 г/м² (Курашов и др., 2011).

Амфипода *G. fasciatus* является термофильным видом. Так, рачок был зарегистрирован в ряде теплых и горячих источников Байкальского региона (Золотой ключ, Гусихинский, Верхняя Заимка) (Тахтеев и др., 2010). В Новосибирском водохранилище была отмечена успешная адаптация *G. fasciatus* к высокому температурам (Визер, 2006). Хотя этот вид встречается от уреза воды до затопленного русла р. Оби, основные скопления рачков ограничены верхними горизонтами литорали с глубинами до 0.5 м и песчаными грунтами, где температура воды достигает 30°C, что превышает неблагоприятные (более 22.2°C) и близко к летальной температуре (31.2°C) этого вида (Визер, 2006). В условиях эксперимента при температуре 25°C статистически достоверная гибель рачков наступает через 1 ч экспозиции, а доля погибших особей составляет 3 (±2.1)%. На окончание экспериментов (2 сут) доля погибших особей составляет 32 (±6)% (Тимофеев и др., 2008).

В “хронических” экспериментах по температурному избиранию (Вербицкий, 2012) бокоплав *G. fasciatus* с литорали Рыбинского водохранилища предпочитали температуру в диапазоне 18.8–23.2°C, а средняя конечная избираемая температура составляла 21.1 ± 1.5°C. Независимо от температурной предыстории, при длительном нахождении в условиях линейного температурного градиента *G. fasciatus* демонстрировали колебания значений термопреферендума с периодом 5–6 сут и с амплитудой ±3.0–8.0°C. В ходе исследования сезонной динамики избираемых температур выявлены гендерные различия в термоизбирательном поведении. У самок отмечена более быстрая, чем у самцов, реакция на изменение температуры среды обитания – они избирали конечную температуру уже через сутки после помещения в установку. Самки предпочитали температуру 25–26°C, у самцов выход на конечную избираемую температуру шел с перерегулированием – через сутки они избирали температуру, на 2.0°C превышающую конечную избираемую температуру и только че-

рез 2-е сут перемещались в более низкую температуру, при которой и оставались до конца тестирования (Вербицкий, 2012).

Продолжительность жизненного цикла *G. fasciatus* в разных водоемах варьирует от 1 года в хорошо прогреваемых мелководных водоемах (таких, как Невская губа) (Березина, 2005) до 3 лет в холодноводных (оз. Байкал) (Бекман, 1962). Интересно, что при низкой температуре воды жизненный цикл удлиняется, в основном, из-за замедления роста и созревания рачков (Бекман, 1962).

В Онежском озере наши наблюдения проводились в Петрозаводской губе и Кумса-губе Повецего залива. Кумса-губа расположена на 120 км севернее Петрозаводской губы, но она узкая и быстро прогреваемая. С большой долей вероятности можно утверждать, что в различных частях Онежского озера сроки начала размножения *G. fasciatus* могут незначительно отличаться. К примеру, сроки начала размножения и прохождения различных стадий жизненного цикла могут наступать раньше на литорали южной части водоема и в местообитаниях с изрезанной береговой линией.

Для развития новорожденных рачков *G. fasciatus* до взрослого организма необходимо 1000–1250 градусо-дней (около 55–65 дней с температурой воды 18.5°C). Так как высокие температуры влияют на темпы развитие рачка, число генераций за сезон может варьировать от 1 до 3. Одна генерация наблюдается в водных экосистемах с числом градусо-дней менее 1200 в течение лета (литораль оз. Байкал). Две генерации отмечаются в местообитании с 1500–2000 градусо-днями (Ладожское озеро, Псковско-Чудское озеро, оз. Отрадное) и 3 генерации – в местах с более чем 2200 градусо-дней в течение сезона (водохранилища верхней Волги) (Panov, Berezina, 2002).

Было описано 4 типа жизненного цикла *G. fasciatus* (табл. 3), различающихся по продолжительности жизни амфиподы и количеству генераций за сезон (Panov, Berezina, 2002). В озере Байкал наблюдается первый тип – трехгодичный жизненный цикл с одной генерацией за сезон, молодь развивается до взрослых особей в течение 17–18 мес. (Бекман, 1962). Жизненный цикл второго типа – одногодичный жизненный цикл с двумя генерациями за сезон и с 2–3-мя выметами молоди – отмечается в озерах и водохранилищах бассейна Байкала: Братском водохранилище, оз. Арахлей (Матафонов и др., 2005; Матафонов, 2020). Третий тип – одногодичный жизненный цикл с двумя пиками численности летом и 6–8-ю выметами молоди – был зарегистрирован в Ладожском озере и оз. Отрадное, эстуарии Невы (Нилова, 1976; Berezina, Panov, 2004). Четвертый тип – одногодичный жизненный цикл с тремя пиками численности летом и 8–10-ю выметами

Таблица 3. Особенности жизненного цикла и размножения *G. fasciatus* в различных водоемах

Водоем	Особенности жизненного цикла и размножения	Источник
Байкал (Посольский Сор)	Яйценозные самки появляются ранней весной, еще подо льдом (март). Массовая откладка яиц происходит в мае. Вымет молоди в июне. К августу размножение заканчивается, исчезает все родительское поколение. Одногодичный жизненный цикл	Бекман, 1962
Байкал, исток Ангары (открытое побережье)	В начале июня нет ни одной яйценозной особи (220 градусо-дней). Появление молоди возможно только в конце июля. Потенциальная длительность жизни – до трех лет	Бекман, 1962
Оз. Оградное	Яйценозные самки встречаются с конца апреля (до полного распаления льда) до глубокой осени. Вымет молоди происходит в конце мая–начале июня. Появление 6–8 выметов. Два пика размножения: конец мая–первая половина июня и середина августа. В августе размножение идет более интенсивно, чем в мае–июне	Нилова, 1976
Ладожское озеро	Вымет молоди в мае–начале июня. Не менее двух генераций	Panov, 1986
	Период размножения начинается в апреле. Первые молодые особи появляются в начале мая. В конце августа–начале сентября период размножения заканчивается. Отмирание зимующего поколения происходит к середине августа, в октябре популяция представлена в основном взрослыми особями текущего года. Возможно появление 5–6 выметов при двух генерациях: зимующей и летней. Одногодичный жизненный цикл; продолжительность жизни не превышает 12–14 месяцев	Барков, Курашов, 2011
Братское водохранилище, Балаганск	Размножение началось в подледный период. Яйценозные самки встречаются с 18 апреля до 25 сентября, с опущенными оостегитами – до 10 октября. Вымет молоди 20–26 июня. Отрождение 5 выметов от 2-х поколений. Продолжительность жизни от 2.5–3 до 11 месяцев	Камалтынов, Томилов, 2001
Оз. Арахлей	В марте размножающиеся самки отсутствуют. Период размножения начинается в апреле, к концу апреля происходит откладка яиц. Первые молодые особи появляются в начале июня. В конце августа–начале сентября период размножения заканчивается, исчезают особи родительского поколения. Возможно появление 3–5 выметов при 2-х генерациях. Одногодичный жизненный цикл	Матафонов и др., 2005
	Вымет молоди в июне, отмирание большей части поколения предыдущего года в июле–августе, достижение к декабрю большей частью поколения текущего года размеров, характерных для начала июня. Продолжительность жизненного цикла большинства особей <i>G. fasciatus</i> не превышала 13 месяцев	Матафонов, 2020
Невская губа Финского залива Балтийского моря	Яйценозные самки появляются в апреле, молодь – в мае. Массовый вымет с 11 июня по 2 июля (1 пик) и с середины августа до начала сентября (2 пик). Завершение периода размножения в конце сентября–начале октября. Одногодичный жизненный цикл	Berezina, Panov, 2004

молоди у самок — описан в водохранилище верхней Волги (Panov, Berezina, 2002).

Таким образом, судя по литературным и нашим собственным данным, жизненный цикл амфиподы *G. fasciatus* крайне пластичен. Его особенности в значительной степени определяются локальными температурными условиями водоема. С другой стороны, этот вид обладает высокими адаптивными способностями. Несмотря на то, что *G. fasciatus* был описан как термофильный вид, он успешно вселяется в северные водоемы. Судя по всему, в число механизмов, обеспечивающих термотолерантность, входят и поведенческие (активное избирание температуры). Однако механизмы, обеспечивающие термотолерантность и пластичность жизненного цикла *G. fasciatus* еще только предстоит исследовать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря полученным данным удалось реконструировать общую схему жизненного цикла *G. fasciatus* в Онежском озере. Период размножения начинается в начале мая, так как к концу мая многие самки успевают отложить яйца. В это же время встречается большое количество копулирующих пар. Первые молодые особи появляются в начале июня. В июне, июле и августе в популяции *G. fasciatus* отмечается наибольший спектр размеров рачков. В течение лета происходит вымирание особей прошлогодних генераций, которые постепенно замещаются отродившейся молодью. В конце сентября молодые особи менее 1.5 мм не встречаются, что свидетельствует о завершении размножения *G. fasciatus*. К весне следующего года основная часть поколения предыдущего года готова к размножению — рачки успевают достигнуть размеров половозрелых особей.

Таким образом, вид-вселенец *G. fasciatus* способен образовывать устойчивые популяции в новых для себя условиях, благодаря чему успешно натурализовался в Онежском озере. Удалось показать, что в условиях 62° с.ш. (Петрозаводская губа Онежского озера) — 63° с.ш. (Кумса-губа Повенецкого залива Онежского озера) температурный фактор не лимитирует развитие *G. fasciatus*. Дополнительным доказательством успешной акклиматизации вида *G. fasciatus* в Онежском озере служат данные по численности и биомассе вида, сопоставимые с показателями этого вида в других водоемах. Успешная натурализация *G. fasciatus* в новых условиях на северной границе ареала европейской части России (Петрозаводская губа и Повенецкий залив Онежского озера) объясняется достаточным количеством градусо-дней (2269—2626 с конца мая по начало октября). Эти температурные условия определяют характерный для популяции *G. fasciatus* Онежского озера одногодичный жизненный цикл с одновременным при-

сутствием генераций предыдущего года и текущего года. Наши данные указывают на то, что именно пластичность жизненного цикла может обеспечивать *G. fasciatus* успешное вселение в водоемы-реципиенты, значительно отличающиеся друг от друга температурным режимом.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Работа полностью выполнена одним автором А.И. Сидоровой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аксенов-Грибанов Д.В., Лубяга Ю.А. Влияние повышенной температуры окружающей среды на активность ферментов антиоксидантной системы и анаэробного гликолиза у эндемичных байкальских видов амфипод *Eulimno gammarusmaritujii*, *E. maackii* и *Gmelinoides fasciatus* // J. Stress Physiology & Biochemistry. 2012. V. 8. № 4. P. 322–329.
- Алексеев В.А., Цалолыхин С.Я. (ред.) Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России. Т. 2. Зообентос // М.; СПб.: Товарищество научных изданий КМК. 2016. 457 с.
- Алимов А.Ф. Функциональная экология пресноводных двустворчатых моллюсков. Наука, Тр. Зоол. Ин-та АН СССР. Т. 96. 1981. 248 с.
- Алимов А.Ф., Богутская Н.Г., Орлова М.И. и др. (ред.) Биологические инвазии в водных и наземных экосистемах. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. 436 с.
- Барков Д.В. Экология и биология байкальского вселенца *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) и его роль в экосистеме Ладожского озера: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2006. 26 с.
- Бекман М.Ю. Экология и продукция *Micrurupuspos solisii* Sow. и *Gmelinoides fasciatus* Stebb. // Труды Лим-

- нологического института Сибирского отделения АН СССР. 1962. Т. 2. Ч. 1. С. 141–155.
- Березина Н.А. Сезонная динамика структуры и плодовитость популяции байкальского бокоплава (*Gmelinoides fasciatus*, Amphipoda, Crustacea) в зарослевой зоне Невской губы // Зоологический журн. 2005. Т. 84. № 4. С. 411–419.
- Березина Н.А., Панов В.Е. Вселение байкальской амфиподы *Gmelinoides fasciatus* (Amphipoda, Crustacea) в Онежское озеро // Зоологический журн. 2003. Т. 82. № 6. С. 731–734.
- Васильева Е.П. Современное состояние донных отложений Большой губы Повенецкого залива Онежского озера // Большая губа Повенецкого залива Онежского озера. Петрозаводск. Карельский научный центр. Институт водных проблем Севера, 1992. С. 34–40.
- Вербицкий В.Б. Температурный оптимум, предпочтений и термотолерантность пресноводных ракообразных (Cladocera, Isopoda, Amphipoda): Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Борок, 2012. 48 с.
- Визер А.М. Аклиматизация байкальских гаммарид и дальневосточных мизид в Новосибирском водохранилище: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск, 2006. 22 с.
- Винберг Г.Г., Лаврентьева Г.М. (ред.) Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах. Зообентос и его продукция. Л.: ГосНИОРХ, 1984. 52 с.
- Дроздов В.В. Общая экология. Учебное пособие. СПб.: РГГМУ, 2011. 412 с.
- Ивантер Э.В., Коросов А.В. Элементарная биометрия. Петрозаводск, 2010. 104 с.
- Камалтынов Р.М., Томилов А.А. Динамика популяции *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) (Crustacea, Amphipoda) в Братском водохранилище // Природные ресурсы Забайкалья и проблемы природопользования. Материалы научной конференции 10–15 сентября 2001 г. Чита, 2001. С. 490–491.
- Кириллова В.А. Морфометрическая характеристика литоральной зоны Онежского озера // Литоральная зона Онежского озера. Наука. Ленинградское отд. Л. 1975. С. 15–21.
- Клюкина Е.А. Видовой состав, биомасса и химический состав высшей водной растительности губ Повенецкого залива Онежского озера // Охрана и использование водных ресурсов Карелии. Петрозаводск, 1974. С. 151–168.
- Курашов Е.А. (ред.) Литоральная зона Ладожского озера. СПб.: Нестор-История, 2011. 416 с.
- Кухарев В.И., Полякова Т.Н., Рябинкин А.В. Распространение байкальской амфиподы *Gmelinoides fasciatus* (Amphipoda, Crustacea) в Онежском озере // Зоологический журн. 2008. Т. 87. № 10. С. 1270–1273.
- Малинина Т.И., Солнцева Н.О. Сейши Онежского озера // Динамика водных масс Онежского озера. Л., 1972.
- Матафонов Д.В. Сравнительная экология бокоплавов: *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) и *Gammarus lacustris* (Sars, 1863) в Ивано-Арахлейских озерах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Улан-Удэ. 2003. 20 с.
- Матафонов Д.В., Итигилова М.Ц., Камалтынов Р.М. и др. Байкальский эндемик *Gmelinoides fasciatus* (Mecynopodidae, Gammaridae, Amphipoda) в озере Арахлей // Зоологический журн. 2005. Т. 84. № 3. С. 321–329.
- Матафонов П.В. Жизненный цикл бокоплавов *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) и *Gammarus lacustris* (Sars, 1863) в озере Арахлей в экстремально мало-водную фазу гидрологического цикла // Амурский зоологический журн. 2020. Т. 12. № 1. С. 16–25.
- Нилова О.И. Некоторые черты экологии и биологии *Gmelinoides fasciatus* Stebb., акклиматизированных в озере Отградное Ленинградской области // Изв. Гос. научн.-исслед. ин-та озern. и речн. хоз-ва. 1976. Т. 110. С. 10–15.
- Охлопкова А.Н. Течение Онежского озера // Динамика водных масс Онежского озера. Л., 1972.
- Панов В.Е., Павлов А.М. Методика количественного учета водных беспозвоночных в зарослях камыша и тростника // Гидробиологический журн. 1986. Т. 22. № 6. С. 87–88.
- Сабылина А.В., Рыжаков А.В. Онежское озеро и его притоки. Общая характеристика // Состояние водных объектов Республики Карелия по результатам мониторинга 1998–2006 гг. Петрозаводск, 2007. С. 29–40.
- Тахтеев В.В., Плешанов А.С., Егорова И.Н. и др. Основные особенности и формирование водной и наземной биоты термальных и минеральных источников Байкальского региона // Известия Иркутского государственного университета. Серия “Биология. Экология”. 2010. Т. 3. № 1. С. 33–37.
- Тимофеев М.А., Шатилина Ж.М., Бедулина Д.С. и др. Сравнительное исследование клеточных механизмов терморезистентности у байкальского и палеарктического видов эврибионтных амфипод // Сибирский экологический журн. 2008. № 1. С. 23–29.
- Филатов Н.Н. (ред.) Онежское озеро. Атлас. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010. С. 151.
- Фрейндлинг В.А. Физико-географическая характеристика северной части Повенецкого залива Онежского озера // Охрана и использование водных ресурсов Карелии. Петрозаводск, 1974. С. 4–12.
- Чертопруд М.В. Фауна бокоплавов (Crustacea, Amphipoda) Московской области // Биология внутренних вод. 2006. № 4. С. 17–21.
- Berezina N.A., Panov V.E. Distribution, population structure and salinity tolerance of the invasive amphipod *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) in the Neva Estuary (Gulf of Finland, Baltic Sea) // Hydrobiologia. 2004. V. 514. P. 199–206.
- Panov V.E. Establishment of the Baikalian endemic amphipod *Gmelinoides fasciatus* in Lake Ladoga. Hydrobiologia. 1996. V. 322. P. 187–192.
- Panov V.E., Berezina N.A. Invasion history, biology and impacts of the Baikalian amphipod *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.) // Invasive Aquatic Species of Europe / Eds.:

Leppäkoski E., Olenin S., Gollasch S. Dordrecht: Kluwer Publisher, 2002. P. 96–103.

Protopopova M.V., Takhteev V.V., Shatilina Zh.M. et al. Small HSPs molecular weights as new indication to the hypothesis of segregated status of thermophilic relict *Gmelinoides fasciatus* among Baikal and Palearctic am-

phipods // J. Stress Physiology & Biochemistry. 2011. V. 7. № 2. P. 175–182.

Shatilina Z.M., Riss H.W., Protopopova M.V. et al. The role of the heat shock proteins (HSP70 and sHSP) for the thermotolerance of freshwater amphipods from contrasting habitats // J. Thermal Biology. 2011. V. 36. I. 2. P. 142–149.

Influence of Temperature on the Life Cycle of Invasive Species *Gmelinoides fasciatus* (Crustacea: Amphipoda) in Lake Onego

A. I. Sidorova*

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

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

The invasive species *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing 1899) (Crustacea: Amphipoda) is able to successfully form stable populations in the recipient reservoir Lake Onego. In conditions of latitudes 62° N (Petrozavodsk Bay)—63° N (Kumsa area of the Povenets Bay) of Lake Onego, the temperature factor does not limit the development of the amphipod population. Successful naturalization of *G. fasciatus* under new conditions on the northern border of the range of the European part of Russia (Petrozavodsk Bay and Povenets Bay of Lake Onego) is explained by a sufficient number of degree-days (2269–2626 for the period end of May—beginning of October), which determine the one-year life cycle with generations previous year and current year.

Keywords: invasive species, *Gmelinoides fasciatus*, life cycle, degree-days, temperature factor, population indicators, Lake Onego

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГАМК- И НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР СУБФОРНИКАЛЬНОГО ОРГАНА КРЫС-САМЦОВ ПОРОДЫ ВИСТАР В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

© 2023 г. В. А. Разенкова^а, *, Д. Э. Коржевский^а

^аФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376 Россия

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

Поступила в редакцию 12.12.2022 г.

После доработки 05.04.2023 г.

Принята к публикации 08.05.2023 г.

Субфорникальный орган (СФО) – один из циркумвентрикулярных (расположенных вблизи третьего желудочка) органов нервной системы млекопитающих, отвечающий за поддержание энергетического и водно-солевого баланса организма. Несмотря на растущий интерес к исследованию физиологических функций СФО, организация и взаимодействие его тканевых компонентов остаются малоизученными. В связи с этим, целью настоящего исследования стало изучение ГАМК- и нитроксидаергической систем СФО с применением методов иммуногистохимии. Исследование выполнено на 7-дневных, 14-дневных и половозрелых (4–6 мес.) самцах крыс породы Вистар. Полученные данные позволили охарактеризовать изменения активности ГАМК- и нитроксидаергической систем СФО в ходе развития. Гистохимический профиль экспрессии NO-синтазы изменяется в ходе первых двух недель постнатального развития, и во взрослом возрасте можно выделить три субпопуляции нитроксидаергических клеток, различающихся по интенсивности реакции и тканевой локализации. Обнаруженная морфологическая гетерогенность нитроксидаергических клеток в СФО может отражать функциональную специализацию различных нейронов.

Ключевые слова: гамма-аминомасляная кислота, оксид азота, головной мозг, субфорникальный орган, развитие, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0475145023030060, **EDN:** ZRXTJY

ВВЕДЕНИЕ

Субфорникальный орган (СФО) представляет собой компактное клеточное скопление, расположенное вблизи третьего желудочка между столбами свода конечного мозга млекопитающих, и относится к циркумвентрикулярным органам нервной системы. Обильная васкуляризация и наличие в пределах СФО сети фенестрированных капилляров позволяет этому органу регулировать энергетический и водно-солевой баланс организма (Pulman et al., 2006). Интерес исследователей к СФО обусловлен его ролью в обеспечении важных физиологических функций, таких как регуляция работы ренин-ангиотензиновой системы, и водно-солевого обмена (Hicks et al., 2021). В последнее время особое внимание уделяется СФО в контексте восприимчивости его нейрональной популяции к коронавирусной инфекции. Наличие на мембранах клеток СФО ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2), который связывают HCoV-NL63, SARS-CoV и SARS-CoV-2 при адсорбции на мембране, делает эти клетки чувствительными к инфицированию вирусом (Ong et al., 2022). Од-

нако, в вопросах развития и организации клеточного состава СФО остается одним из самых малоизученных структур ЦНС.

Наличие ГАМК-ергических нейронов в СФО было показано с использованием иммуногистохимического (ИГХ) маркирования ГАМК (Honda et al., 2001). Предполагается, что эти клетки в основном модулируют активность других нейронов в пределах СФО. Не подвергается сомнению и присутствие в составе СФО нитроксидаергических нейронов (Krstic et al., 1995). NO-содержащие нейроны СФО, проецирующие на медианное преоптическое ядро, могут участвовать в регуляции чувства жажды (Augustine et al., 2019). Несмотря на это, пространственная организация и взаимодействия этих тканевых компонентов СФО, а также их становление в процессе развития изучены недостаточно. Одним из возможных подходов, позволяющих заполнить эти пробелы, может служить иммуногистохимическое исследование с использованием специфических маркерных белков. В связи с этим, целью настоящего исследования стало изучение ГАМК- и нитрок-

сидергической систем СФО в раннем постнатальном онтогенезе с применением методов иммуногистохимии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на парафиновых срезах головного мозга самцов крыс породы Вистар трех возрастных групп, соответствующих разным периодам развития: 7-е сутки постнатального развития (P7) – неонатальный период; 14-е сутки постнатального развития (P14) – неполовозрелый (инфантильный) период; половозрелые животные (4–6 мес.) (всего $n = 9$) (Sengupta, 2013). При содержании и умерщвлении животных соблюдали основные принципы Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.) и “Правила надлежащей лабораторной практики” (приказ № 199н от 01.04.2016 г. Минздрава России). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ ИЭМ (заключение № 1/22 от 18.02.2022). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде и заливали в парафин по общепринятой методике. Изготавливали фронтальные срезы толщиной 5 мкм и наклеивали их на предметные стекла “Superfrost Ultra Plus” (Menzel Gläser, Германия). После депарафинирования и регидратации препаратов проводили тепловое демаскирование антигена в модифицированном цитратном буфере (S1700, Agilent, США) в течение 22 мин. Ингибирование эндогенной пероксидазы осуществляли путем обработки срезов 3%-ным водным раствором перекиси водорода в течение 10 мин.

Для выявления ГАМК- и нитроксидаергических структур головного мозга использовали поликлональные кроличьи антитела к GAD67 (E10260, Spring BioScience, США) и NO-синтазе (NOS) (E3934, Spring BioScience, США) в разведении 1 : 600 и 1 : 500 соответственно. Инкубацию в первичных антителах проводили в течение трех суток при температуре 27.5°C. В качестве вторичных реагентов использовали набор UltraVision Quanto Detection System HRP (TL-060-QHL, Thermo Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген 3'3'-диаминобензидин из набора DAB+ (Agilent, США). Часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином. В качестве положительного контроля антигена при иммуногистохимическом выявлении ГАМК- и нитроксидаергических структур были использованы препараты мозжечка крысы, для клеток которого хорошо известно распределение этих белков (Greif et al., 1991; Blanco et al., 2010). Для постановки отрицательного контроля антител на один из срезов обрабатываемой серии препаратов вместо раствора первичных антител наносили рас-

твор для разведения антител Antibody Diluent (Spring Bioscience, США).

Анализ и фотографирование препаратов проводили с использованием микроскопа Leica DM750 и камеры ICC50 (Leica, Германия). Обработку изображений проводили в программах LAS EZ и Adobe Photoshop Elements 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате иммуногистохимической реакции на GAD67 и NOS в субфорникальном органе крыс всех возрастов отчетливо выявлялись ГАМК-ергические и нитроксидаергические структуры (рис. 1). Предварительное исследование препаратов не выявило индивидуальных различий в локализации исследуемых белков в СФО между особями одной стадии развития.

ГАМК-ергические структуры в субфорникальном органе 7-дневных крыс представляют собой тела и отростки ГАМК-ергических клеток. Популяция клеток немногочисленна, клетки располагаются преимущественно в латеральных частях СФО и вблизи покрывающих орган клеток. Отростки GAD67-положительных клеток можно проследить на некотором расстоянии в толще нейропила. Поскольку известно, что GAD67 характеризуется преимущественной локализацией в перикарионе и синаптических терминалях интернейронов (Esclapez et al., 1994), его наличие в отростках клеток у крыс P7 может говорить о сниженной скорости транспорта фермента на этом сроке. Доказательство этого наблюдения может быть получено путем визуализации внутриклеточного транспорта с использованием мультитонной микроскопии. Благодаря особенности визуализации ГАМК-ергических клеток на этом сроке (а именно присутствием выявляемого фермента в волокнах нейронов) было показано, что отростки этих нейронов могут не только примыкать к клеткам эпендимного слоя (рис. 1б), но также проходить сквозь ряды таницитов и доходить до просвета желудочка (рис. 2а). Отдельные отростки и терминали также могут оплетать кровеносные сосуды СФО, в частности, септальные вены – крупные тонкостенные сосуды, являющиеся важными элементами кровоснабжения СФО и впадающие в систему большой вены Галена (Hicks et al., 2021). СФО 7-дневных крыс отличается высокоинтенсивной реакцией на антитела к NOS. Фермент локализован в цитоплазме и отростках большого количества иммунопозитивных клеток, распределенных равномерно в пределах органа. Клетки крупные, характеризуются круглым или овальным телом, от которого отходит один или два крупных неветвящихся отростка. Следует отметить, что для NOS-содержащих клеток СФО характерна неравномерная интенсивность иммуногистохимической реакции: нейроны

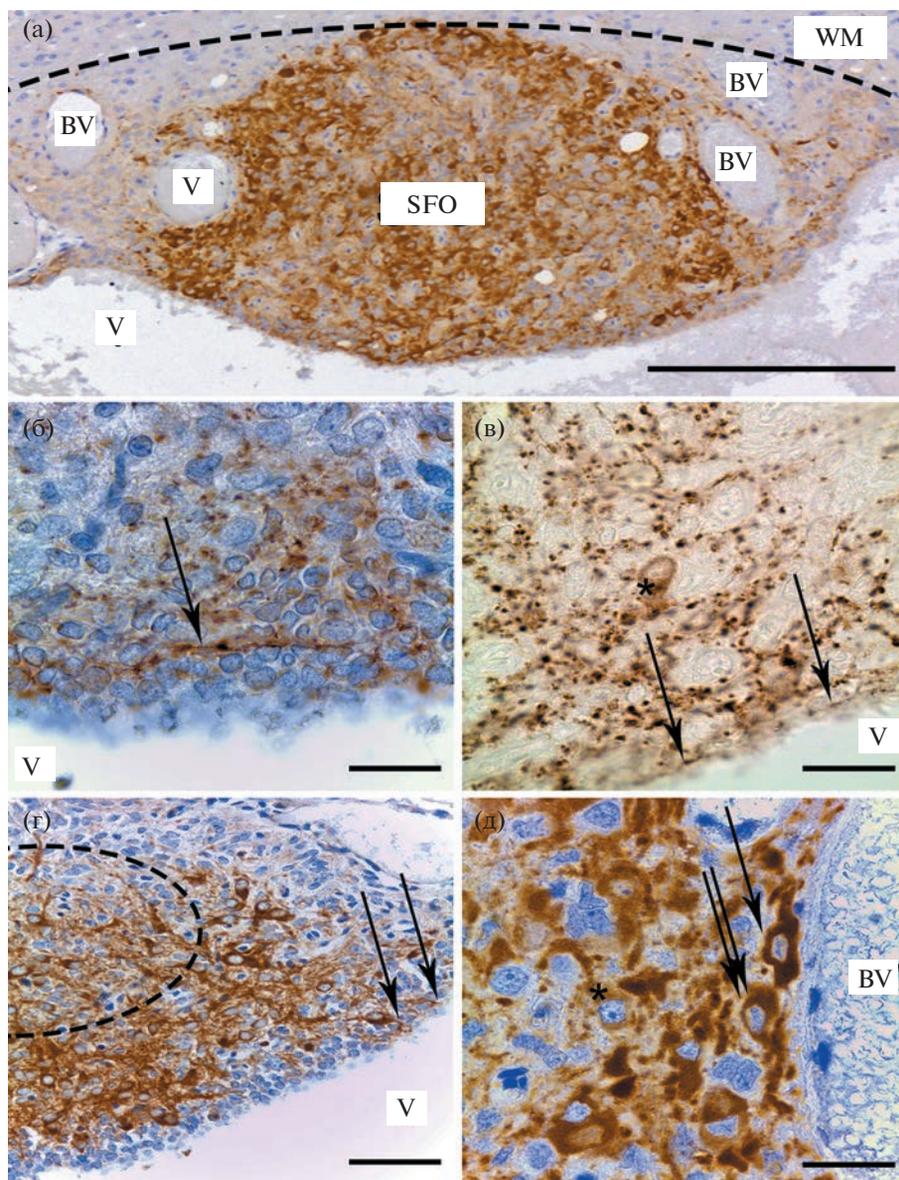


Рис. 1. Общая картина распределения ГАМК- и нитроксидергических структур в субфорникальном органе. Иммуногистохимическая реакция на GAD67 (б, в) и NO-синтазу (а, г, д). (а) Половозрелое животное, общий вид нитроксидергических структур в субфорникальном органе. Пунктирная линия отделяет субфорникальный орган от прилежащее белого вещества; (б) 7-е сутки постнатального развития, вентральная область. Стрелка указывает на GAD67-содержащее волокно; (в) половозрелое животное, вентральная область. Стрелки указывают на ГАМК-ергические терминалы в эпендимном слое, звездочка – GAD67-положительная клетка; (г) 7-е сутки постнатального развития. Стрелки указывают на волокна в субэпендимном слое, пунктир ограничивает зону со слабой реакцией на NOS; (д) половозрелое животное, большое увеличение. Стрелка указывает на интенсивноокрашенную клетку, двойная стрелка – клетка с реакцией средней интенсивности, звездочка – слабоокрашенная клетка. SFO – субфорникальный орган, WM – белое вещество, BV – кровеносные сосуды, V – полость желудочка. Масштабный отрезок равен 200 мкм (а), 50 мкм (г), 20 мкм (б, в, д).

с наиболее интенсивной реакцией расположены в латеральных частях, в субэпендимной зоне и вокруг септальных вен, а более слабоокрашенные клетки сконцентрированы в основном в медиальной части СФО (рис. 1г, рис. 2б).

К концу второй недели постнатального развития в СФО наблюдается равномерное распре-

деление ГАМК-ергических синаптических терминалей, а отростки GAD67-положительных клеток уже нельзя проследить на всей протяженности видимых отростков. Контакт ГАМК-ергических терминалей с эпендимным пластом и непосредственно с ликвором на этом сроке сохраняется. У крыс P14 большинство клеток СФО синтезирует

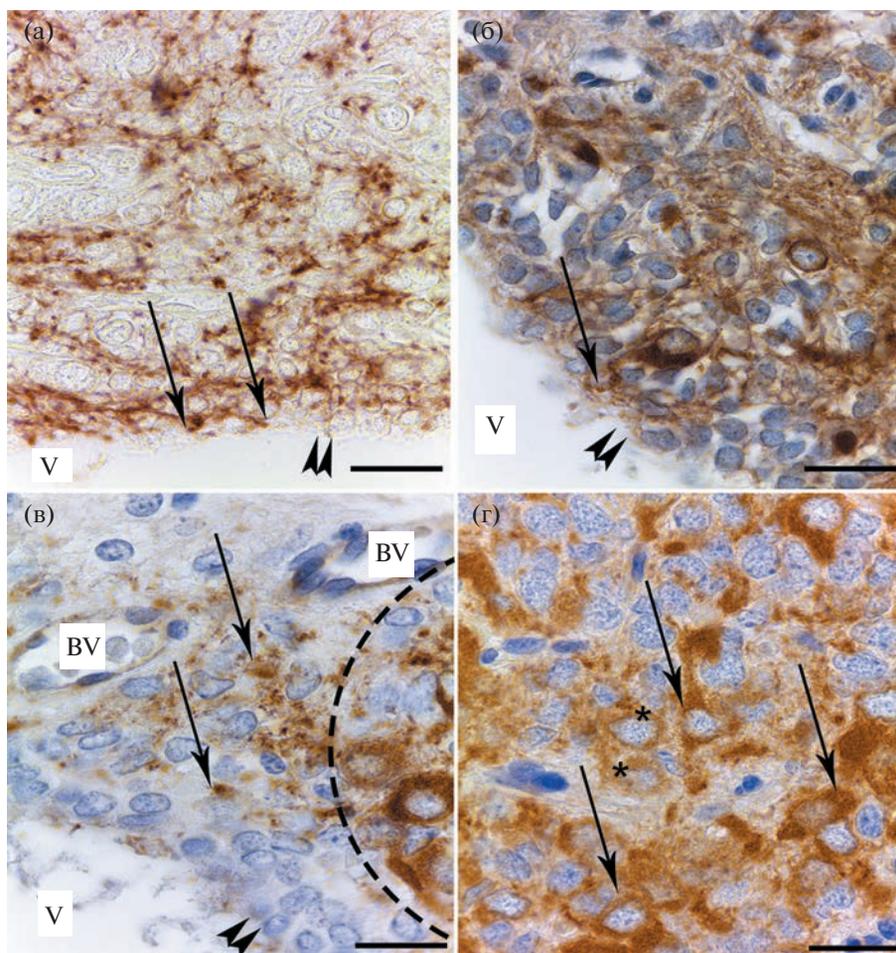


Рис. 2. Особенности распределения ГАМК- и нитроксидаергических структур в субфорникальном органе. Иммуногистохимическая реакция на GAD67 (а) и NO-синтазу (б–г). (а) 7-е сутки постнатального развития, вентральная область. Стрелка указывает на ГАМК-ергические волокна в контакте с эпэндимой и ликвором; (б) 7-е сутки постнатального развития, вентральная область. Стрелка указывает на NOS-содержащий отросток, проходящий сквозь эпэндиму; (в) 14-е сутки постнатального развития, граница латеральной и медиальной части СФО. Стрелки указывают на NOS-содержащие терминалы, пунктирная линия отделяет медиальную часть от латеральной; (г) 14-е сутки постнатального развития, медиальная часть СФО. Стрелки указывают на NOS-положительные клетки с реакцией средней интенсивности, звездочка – слабоокрашенная клетка. BV – кровеносные сосуды, V – полость желудочка. Двойная стрелка обозначает слой клеток, покрывающих орган. Масштабный отрезок 20 мкм.

NO-синтазу. В толще нейропиля можно различить NOS-положительные отростки и некрупные округлые структуры, которые могут являть собой как поперечноперерезанные волокна, так и попавшие на плоскость среза варикозности NO-содержащих клеток (рис. 2в). Отдельные отростки оплетают кровеносные сосуды. В латеральных частях органа располагаются преимущественно отростки, но не тела нитроксидаергических нейронов (см. рис. 2в). Как и на предыдущем сроке, на P14 можно выявить NOS-положительные клетки с интенсивной реакцией и клетки с реакцией средней интенсивности. В центральной части СФО впервые появляются клетки со слабой ИГХ реакцией на NOS.

У взрослых животных выявлена интенсивная ГАМК-ергическая иннервация СФО. Синапти-

ческие бутоны, содержащие GAD67 распределены равномерно по всему объему СФО с незначительным увеличением интенсивности реакции в субэпэндимной зоне, периваскулярном пространстве септальных вен и вблизи прилегающего белого вещества. Популяция ГАМК-ергических клеток СФО немногочисленна, клетки располагаются в краевых зонах органа (см. рис. 1в). Такие особенности организации СФО могут быть связаны с анатомическими особенностями этого органа, который, предположительно состоит из двух зон, отличающихся афферентными и эфферентными связями – оболочки и сердцевины (Hicks et al., 2021). Топографическое распределение нейронов и их терминалей в органе, вероятно определяет их эфферентные связи и опосредует физиологические функции. NO-синтазу на этой стадии разви-

тия содержат все или большинство нейронов СФО. Три популяции NO-положительных клеток в соответствии с различной интенсивностью их окрашивания (слабой, промежуточной, сильной) наблюдаются и у взрослых животных (рис. 1д). Наше исследование показало, что эти популяции формируются в процессе развития и различаются расположением в паренхиме СФО. Клетки с интенсивной реакцией на NO-синтазу, которые распластаны по периметру кровеносных сосудов, располагаются в дорсальной части органа и в субэпендимной зоне. Принимая во внимание это наблюдение, а также тот факт, что нейромедиатор NO-продуцирующими клетками высвобождается несинаптически (Nowaczyk et al., 2021), можно предположить, что в СФО присутствует несколько популяций функционально различных нитроксидазических нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании охарактеризованы изменения активности ГАМК- и нитроксидазической систем СФО в ходе постнатального развития крыс. Было показано, что для NO- и ГАМК-ергических терминалей характерно расположение вблизи эпендимного пласта, в контакте с ликвором и кровеносными сосудами (см. рис. 1, 2). Это позволяет им контактировать как с клетками выстилки, так и с цереброспинальной жидкостью. Наличие GAD67 в отростках клеток у крыс P7 может говорить о сниженной скорости транспорта фермента на этом сроке по сравнению с другими возрастными. Созревание NOS-положительных клеток СФО происходит постепенно в ходе постнатального развития, и во взрослом возрасте в СФО присутствуют три типа NOS-содержащих клеток. Наличие в СФО разных популяций NOS-содержащих клеток ставит вопрос об их возможной функциональной специализации, для ответа на который нужны дальнейшие исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные, национальные и институциональные (заключение № 1/22 от 18.02.2022) принципы ухода и использования животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Augustine V., Gokce S.K., Lee S. et al.* Hierarchical neural architecture underlying thirst regulation // *Nature*. 2018. V. 555. № 7695. P. 204–209. <https://doi.org/10.1038/nature25488>
- Blanco S., Molina F.J., Castro L. et al.* Study of the nitric oxide system in the rat cerebellum during aging // *BMC Neuroscience*. 2010. V. 11. P. 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-78>
- Esclapez M., Tillakaratne N.J., Kaufman D.L. et al.* Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms // *J. Neuroscience*. 1994. V. 14. № 2. P. 1834–1855. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-03-01834.1994>
- Krstic R., Nicolas D., Novier A.* Nitric oxide synthase in the subfornical organ of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*), mouse and rat // *Acta Histochemica*. 1995. V. 97. № 4. P. 429–434. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(11\)80068-1](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(11)80068-1)
- Greif K.F., Erlander M.G., Tillakaratne N.J. et al.* Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum // *Neurochemical Research*. 1991. V. 16. № 3. P. 235–242. <https://doi.org/10.1007/BF00966086>
- Hicks A.I., Kobrinsky S., Zhou S. et al.* Anatomical organization of the rat subfornical organ // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021. V. 15. № 691711. P. 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.691711>
- Honda E., Xu S.H., Ono K. et al.* Spontaneously active GABAergic interneurons in the subfornical organ of rat slice preparations // *Neuroscience Letters*. 2001. V. 306. № 1–2. P. 45–48. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01862-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01862-6)
- Nowaczyk A., Kowalska M., Nowaczyk J. et al.* Carbon monoxide and nitric oxide as examples of the youngest class of transmitters // *International J. Molecular Sciences*. 2021. V. 22. № 11. <https://doi.org/10.3390/ijms22116029>
- Ong W.Y., Satish R.L., Herr D.R.* ACE2, circumventricular organs and the hypothalamus, and COVID-19 // *Neuromolecular Medicine*. 2022. V. 24. № 4. P. 363–373. <https://doi.org/10.1007/s12017-022-08706-1>
- Pulman K.J., Fry W.M., Cottrell G.T. et al.* The subfornical organ: a central target for circulating feeding signals // *J. Neuroscience*. 2006. V. 26. № 7. P. 2022–2030. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3218-05.2006>
- Sengupta P.* The laboratory rat: relating its age with human's // *International J. Preventive Medicine*. 2013. V. 4. № 6. P. 624–630.

Structural Organization of GABA- and Nitroxidergic Systems of Subfornical Organ in Wistar Rats Postnatal Development

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

¹*Institute of Experimental Medicine, ul. Akad. Pavlova 12, Saint Petersburg, 197376 Russia*

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

The subfornical organ (SFO) is one of the circumventricular organs (CVOs) of the mammalian nervous system responsible for maintaining the energy and water and sodium balance. Despite notable interest in the SFO and its physiological functions, the organization of individual populations of SFO cells, as well as their interactions remain to be clearly established. In this study we examined GABA and nitroxidergic systems of SFO using immunohistochemical (IHC) methods. The brain of male Wistar rats at different stages of postnatal development: postnatal day 7 (P7), 14 (P14) and adult (4–6 months), was examined. The data obtained allowed us to characterize changes in the activity of the GABA- and nitroxidergic systems of the SFO during development. In adult rats, three subpopulations of nitroxidergic cells, differing in the intensity of the reaction and tissue localization, can be distinguished. The revealed morphological heterogeneity of nitroxidergic cells in SFO may reflect their diverse functional status.

Keywords: gamma-aminobutyric acid, nitric oxide, forebrain, subfornical organ, development, immunohistochemistry

ПОЛУЧЕНИЕ НУЛЕВОЙ МУТАЦИИ ГЕНА *TOOTHTRIN* МЕТОДОМ НАПРАВЛЕННОЙ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2023 г. Е. Е. Куваева^а, Д. А. Куликова^а, О. Б. Симонова^{а, *}, И. Б. Мерцалов^а

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

*e-mail: osimonova@hotmail.com

Поступила в редакцию 16.01.2023 г.

После доработки 10.05.2023 г.

Принята к публикации 13.05.2023 г.

Ген *toothrin* (*tth*) дрозофилы является родственным консервативному семейству генов *d4*, кодирующих специфические факторы транскрипции у многоклеточных животных. В предыдущих работах мы исследовали эффект сверхэкспрессии гена *tth* и охарактеризовали специфический паттерн его экспрессии в нервной системе, но мутации в гене *tth* до сих пор не были обнаружены. Нулевые мутанты необходимы для анализа функций генов и скрининга их генов-партнеров. В работе мы описываем получение первых дрозофил, нокаутных по гену *tth*, с помощью метода гомологичной рекомбинации и впервые характеризуем фенотип летальных эмбрионов, вызванный потерей функции этого гена.

Ключевые слова: нокаут гена, семейство генов *d4*, *toothrin*, *Drosophila melanogaster*

DOI: 10.31857/S0475145023030059, **EDN:** ZRSGJG

ВВЕДЕНИЕ

Ген *toothrin* (*tth*) был открыт у *D. melanogaster* как “дальний родственник” генов эволюционно консервативного семейства *d4* (*DPF – Double PHD fingers*) (Simonova et al., 2005). Гены этого семейства у млекопитающих экспрессируются в различных тканях и на разных стадиях развития. Два из них, *neuro-d4* (*Dpf1*) и *Cer-d4* (*Dpf3*), нейроспецифические, третий, *ubi-d4/Requiem* (*Dpf2*), экспрессируется во всех тканях и на одинаковом уровне, как у эмбрионов, так и у взрослых организмов (Kulikova et al., 2013). Белки семейства D4 обладают общим планом строения, включающим набор уникальных доменов: N-концевой домен 2/3, домен K \ddot{u} rppel-типа и C-концевой домен “цинковых пальцев” PHD-типа, или D4-домен. В геноме дрозофилы был найден единственный ген семейства *d4* (*Drosophila-d4*, *dd4*), кодирующий белок, содержащий все перечисленные выше структурные домены кроме домена K \ddot{u} rppel-типа (Nabigochkina et al., 2002). Позже был обнаружен родственный этому семейству ген *tth*, кодирующий последовательность аминокислот, включающую только характерный N-концевой домен 2/3. По литературным данным, домен 2/3 в клетках млекопитающих может взаимодействовать с белками сигнального пути NF- κ B, которые регулируют экспрессию генов иммунной системы, участвуют в регуляции пролиферации клеток и

апоптоза (Ishizaka et al., 2012). Однако функция гена *tth* остается не до конца исследованной.

Один из методов изучения функции гена – анализ последствий ее потери (loss-of-function). Чтобы “выключить”, или “нокаутировать”, исследуемый ген достаточно получить его делецию. Выводы касательно функций генов делают, сравнивая фенотипы нормальных и нокаутированных по исследуемому гену организмов. Нокаут генов можно выполнить различными методами. Одним из них является метод направленной гомологичной рекомбинации ДНК, когда копия исследуемого гена заменяется последовательностью маркерного гена, который затем легко удалить с помощью сайт-специфической рекомбинации (Gong, Golik, 2003). При сайт-специфической рекомбинации обмен участками ДНК происходит по конкретным коротким сайтам гомологии. В настоящее время разработана универсальная система сайт-специфической рекомбинации с использованием Cre-рекомбиназы бактериофага P1 – системы Cre-Lox. Эту систему используют для получения делеций, инверсий, вставок, транслокаций и других модификаций в хромосомной или эпизомной ДНК (Will et al., 2002). Метод подразумевает встраивание в геном модельного организма последовательности гена, кодирующего фермент Cre-рекомбиназу бактериофага P1 и ее таргетных последовательностей *loxP* (*locus of crossing-over of*

PI). Cre-рекомбиназа узнает сайты *loxP* и осуществляет по ним сайт-специфическую рекомбинацию. Система Cre-Lox бактериофага P1 очень похожа в действии и в использовании на систему FLP-FRT дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Turun et al., 2011). Система FLP-FRT представляет собой технологию сайт-направленной рекомбинации между короткими сайтами-мишенями *FRT* для распознавания их дрожжевой рекомбиназой (флипазой) FLP. С помощью этой технологии можно получать мозаичные организмы и изучать последствия потери функции гена в конкретном органе или группе клеток. Это важно в тех случаях, когда мутация исследуемого гена приводит к летальному эффекту. Для этого используют тканеспецифический промотор, который активирует рекомбиназу в конкретном органе или ткани. В силу хорошей изученности, дрозофила является удобным организмом для проведения направленной гомологичной рекомбинации с целью “выключения” функции генов (Nefedova, 2020).

В работе мы описываем получение первых нокаутных по гену *toothrin* дрозофил, что даст возможность исследовать “нулевых” мутантов с потерей функции этого гена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии дрозофил, использованные в работе

Мух всех линий поддерживали при 23–25°C на стандартной кормовой среде, содержащей манную крупу, сахар, изюм, дрожжи и пищевой агар в конечной концентрации 0.4%.

В экспериментах использовали линии дрозофил, полученные из музейных коллекций, или созданные самостоятельно. Для микроинъекций использовали эмбрионы линии y^1w^{1118} (Bloomington *Drosophila* Stock Center). Мух этой линии использовали также для проведения аналитических скрещиваний и выявления трансформантов, несущих маркерный ген, отвечающий за пигментацию глаз (*mini-white*). Мух линии y^1w^{1118} ; *FLP*, *I-SceI/TM3*, *Sb*, *Ser* (# 6935 Bloomington *Drosophila* Stock Center) использовали для мобилизации инактивирующей конструкции. Эта линия содержит конструкции $P\{70FLP\}23$ и $P\{70I-SceI\}4A$, которые под контролем промотора гена теплового шока *hsp70* индуцибельно экспрессируют флипазу FLP и эндонуклеазу I-SceI соответственно. Дрозофил линии *Df(1)260-1*, y^1/FM , *B* использовали для балансирования X-хромосомы и выведения ее в гомозиготное состояние. Мух лабораторной линии *Cy/L*; *D/Sb* (обозначена *18V*) с множественными инверсиями во второй (*SM6*, *CyO*) и третьей (*TM3*, *Sb*) хромосомах использовали для хромосомного картирования. Трансгенную линию CyO ; $p[w^+Cre]/Sco$,

содержащую конструкцию $p[w^+Cre]$, где *Cre* – ген, кодирующий сайт-специфическую Cre-рекомбиназу бактериофага *Enterobacteria phage P1*, использовали для вырезания маркерного гена *mini-white* из инактивирующей генной конструкции. Линия была любезно предоставлена д.б.н. акад. П.Г. Георгиевым (Институт биологии гена Российской академии наук). Для размножения трансформантов использовали линию со сцепленными X-хромосомами *C(1)DX*, $y^1 f^1$ (Bloomington *Drosophila* Stock Center). Мух линии дикого типа *Oregon-R* (Bloomington *Drosophila* Stock Center) использовали для выведения нокаутных мутантов на чистый генетический фон и в контрольных экспериментах.

Синтез инактивирующей конструкции и получение трансформированных дрозофил

В работе использовали плазмиду *pW25* размером 8968 п.н. (получена от Кента Голика, университет Юта; Gong, Golik, 2003), содержащую сайты рестрикции для клонирования *NotI*, *SphI*, *Acc65I*, *AscI*, *BsiWI*, сайты *loxP* для рекомбинации Cre-Lox, сайты *FRT* для рекомбинации FLP-FRT и маркерный ген w^{hs} , определяющий пигментацию глаз. В плазмиду *pW25* клонировали фрагменты ДНК, расположенные по флангам кодирующей области *tth* и названные левым (LA) и правым (RA) плечом конструкции. Фрагменты амплифицировали с помощью ПЦР из геномной ДНК дрозофил линии дикого типа *Oregon-R*. Амплифицированный фрагмент LA, длиной 5565 п.н., и фрагмент RA, длиной 4776 п.н., по отдельности клонировали в плазмиду *pGEM-Teasy* (Promega) и полностью секвенировали. Далее клонированные фрагменты вырезали из полученных плазмид с помощью эндонуклеаз рестрикции (*KpnI* и *NotI* для фрагмента LA и *AscI* с *BsiWI* для фрагмента RA) и переклонировали по соответствующим сайтам рестрикции в плазмиду *pW25*. В результате была получена инактивирующая генная конструкция *pW25tth-exc*, которую использовали в дальнейшей работе (рис. 1).

Очистку плазмидной ДНК для инъекции осуществляли по протоколу набора Амершам 27-9602-01 (GFX PCR DNA и Gel Band Purification Kit). Инъекционную иглу заполняли смесью (5–10 мкл) плазмидного вектора *pW25tth-exc* и плазмиды-хелпера *pBR322*, экспрессирующего под промотором *hsp70* транспозазу мобильного Р-элемента, в соотношении 4 : 1. Концентрация плазмидной ДНК составляла 1 мкг в 1 мкл деионизированной воды. Полученной смесью проводили микроинъекцию эмбрионов y^1w^{1118} на стадии прецеллюлярной бластодермы. Трансформантов отбирали по цвету глаз (маркер *mini-white*). Правильно прошедшую гомологичную рекомбинацию подтвер-

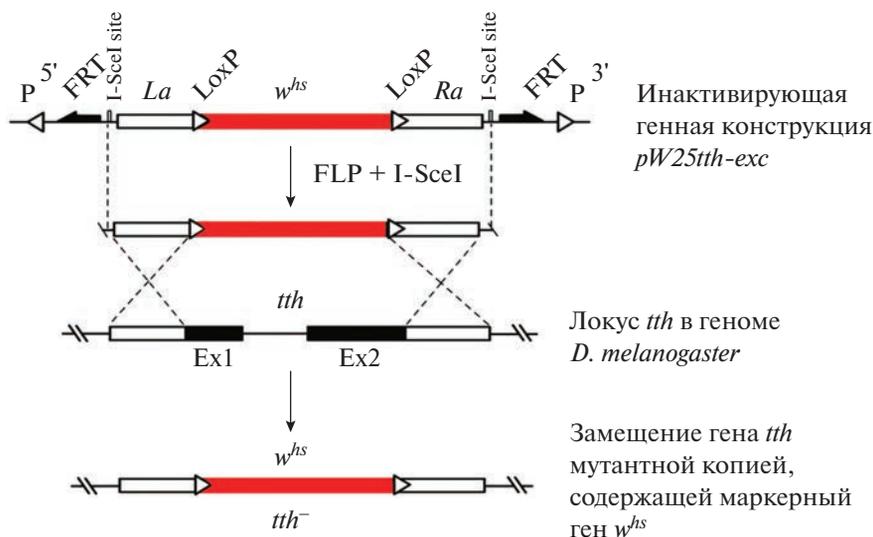


Рис. 1. Схема этапов генетической модификации локуса tth (объяснение в тексте).

ждали с помощью ПЦР-анализа геномной ДНК, используя специфические (прямой $nd3$: 5'-tcg cag ctc ttc ctg gac aa-3' и обратный $RevTth$: 5'-cag ata ctt csg ata gtt gcg-3') праймеры для гена tth (рис. 2а, 2б).

Генетические эксперименты

Индукция сайт-направленной рекомбинации.

Трансформант $y^1w^{1118}; p\{W25tth-exc\}, w^{hs}$ с инсерцией инактивирующей конструкции в хромосому II был размножен, его потомков использовали для индукции сайт-направленной рекомбинации и получения делеции гена tth . Поскольку конструкция $pW25tth-exc$, маркированная w^{hs} , встроилась во II хромосому, необходимо было ввести доминантный маркер второй хромосомы *Curly* в геном мух линии $y^1w^{1118}; FLP, I-SceI/TM3, Sb, Ser$. Для этого скрещивали самок этой линии с самцами линии *18V*. В F1 отбирали мух y^1w^{1118}/y^+w ; $Cy(L)/+$; $FLP, I-SceI/D$ с доминантным маркером во II и III хромосоме. Мух полученной линии, несущих гены рестриктазы I-SceI и рекомбиназы FLP, скрещивали с мухами $y^1w^{1118}; p\{W25tth-exc\}, w^{hs}; +/+$. Для дестабилизации конструкции $pW25tth-exc$ личинок F2 третьего возраста $y^1w^{1118}; p\{W25tth-exc\}, w^{hs}/Cy(L); FLP, I-SceI (D)/+$ инкубировали в термостате при 37°C в течение 1 ч для активизации экспрессии ферментов FLP и I-SceI. Отбирали потомков с доминантным маркером *Curly* (или *Lobe*) во II хромосоме и без маркеров в III хромосоме и массово (по 10 особей) скрещивали с самцами y^1w^{1118} . В F3 отбирали самцов $p\{W25tth-exc\}, w^{hs}(?)/Y; Cy/+; FLP, I-SceI/+$ (красные глаза w^{hs} и мутация *Curly*), такое сочетание маркеров возможно при транслокации конструкции $pW25tth-exc$

со второй на любую другую хромосому. Хромосомное картирование конструкции проводили в генетических экспериментах и подтверждали с помощью ПЦР-анализа.

Удаление маркерного гена *mini-white* из делетированного локуса tth с помощью сайт-специфической рекомбинации. Для удаления маркерного гена *mini-white* (w^{hs}), окруженного сайтами *loxP*, из района гена *toothrin* (tth) мы использовали линию мух, несущих Cre-рекомбиназу. Для этого скрещивали нокаутных самок $w^- tth^- \{w^{hs}\}$ с самцами, несущими Cre-рекомбиназу, $y^1w^1/Y; CyO p\{w^+Cre\}/Sco$. Так как Cre-рекомбиназа активируется при повышенной температуре, потомство F1 (личинки третьего возраста) инкубировали в термостате при 37°C в течение часа. После вылета имаго отбирали самцов с абрикосовым цветом глаз $w^- tth^- \{?\}; CyO p\{w^+Cre\}/+$, которых (для получения отводков) размножали в индивидуальных скрещиваниях с самками $C(1)RM/Y$, имеющими сцепленные X-хромосомы. Поскольку самцы в F1 имели "мозаичные" гаметы, вследствие случайности Cre-рекомбинации, в F2 мы получали 2 класса самцов (белоглазых и с пигментированными глазами), отбирали белоглазых (без *mini-white*) самцов, которых далее размножали в индивидуальных скрещиваниях с самками $C(1)RM/Y$.

Проверку успешного сайт-специфического вырезания маркерного гена *mini-white* в отводках, нокаутных по гену tth дрозофил, осуществляли с помощью ПЦР-анализа (рис. 2в, 2г) с использованием пары праймеров: $nd1$ (прямой праймер для гена tth : 5'-tcg aga gga gag gtg gaa ga-3' 20 нукл.) и $KotthR1$ (обратный праймер для гена tth : 5'-cag gca aag gca tcc gaa tc-3' 20 нукл.).

Выведение мутантов с нулевым аллелем *tth* на чистый генетический фон. Для выведения мутантов с нулевым аллелем *tth* на чистый генетический фон, самок дикого типа $y^+w^+tth^+$ (*Oregon-R*) скрещивали с белоглазыми нокаутными самцами $y^-w^-tth^-/Y$. Гетерозиготных самок $y^+w^+tth^+/y^-w^-tth^-$, полученных в потомстве F1, возвратно скрещивали с родительскими самцами $y^-w^-tth^-/Y$. В F2 получали красноглазых самцов родительского класса $y^+w^+tth^+/Y$ и кроссоверов $y^+w^+tth^-/Y$ (искомый рекомбинант). Наличие нулевого аллеля гена *tth* верифицировали посредством ПЦР-анализа, используя прямой *nd1* и обратный *KoTthR1* праймер. Мухи из отводок, показавших положительный ответ, были выведены в гомозиготное состояние.

Получение изогенной гомозиготной линии *tth*⁻. Для выведения мутантов *tth*⁻ в гомозиготное состояние скрещивали одного самца *tth*⁻/*Y* с самками линии *Df(1)260-1*, *y¹/FM4*, несущими балансерную инверсию *FM4* в первой хромосоме. Гетерозиготных самок F1 *FM4*, *B/w⁺tth⁻* возвратно скрещивали с родительским самцом *tth*⁻/*Y* и в потомстве F2 отбирали гемизиготных самцов *tth*⁻/*Y* и гомозиготных самок *tth*⁻.

Сбор погибших эмбрионов и приготовление препаратов их кутикулы

Особей (5 пар самцов и самок) помещали в стакан со средой на 6–8 ч для откладки яиц. Поскольку эмбриональная стадия развития длится 24 ч при 25°C, стакан с отложенными яйцами держали в термостате до полного вылупления личинок больше суток. Не вылупившихся спустя 48 ч особей считали погибшими. Для исследования фенотипа погибших эмбрионов хорион удаляли вручную, кутикулу просветляли в капле раствора Хойера с добавлением 30% молочной кислоты в течение 1 ч при 60°C (Ashburner et al., 2005).

Микроскопия

Фотографии кутикулы сделаны с помощью цифровой камеры-окуляра DCM300 для микроскопа Olympus Ah-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Создание нокаутной по гену *tth* линии мух*

Первым этапом работы стало получение направленной мутации гена *tth*. Для этого мы провели Р-элемент-зависимую трансформацию эмбрионов дрозофил генетической конструкцией *pW25tth-exc*, созданной на основе вектора *pW25* (см. Материалы и методы). Эта конструкция содержит нарушенную структуру гена *tth* (вместо

кодирующей области был встроен маркер *mini-white* (*w^{hs}*), сайты *FRT* для узнавания FLP-рекомбиназой, сайт узнавания дрожжевой рестриктазой *I-SceI*, а также сайты *loxP* (рис. 1). Было инъецировано 200 эмбрионов и получено 156 выживших взрослых мух. После аналитического индивидуального скрещивания их с мухами линии y^1w^{1118} , в F1, судя по наличию пигментации глаз, было обнаружено 5 трансформантов. Хромосомное картирование маркерного гена показало, что в 4х случаях он встроился в хромосому III, а в одном случае в хромосому II. Трансформанта $y^1w^{1118}; p\{W25\ tth-exc\}$, *w^{hs}* с конструкцией во второй хромосоме мы использовали в дальнейшей работе. Мы провели мобилизацию инактивирующей конструкции, которая под воздействием тепловой обработки (37°C, 1 ч; см. Материалы и методы) должна была вырезаться из места исходного встраивания на хромосоме II и заменить последовательность гена *tth*, расположенную на X-хромосоме, по механизму гомологичной рекомбинации по плечам RA и LA (рис. 1). В результате вместо нативного гена *tth* в районе его локализации должен был находиться маркерный ген *mini-white* (*w^{hs}*) из инактивирующей конструкции (рис. 1). Анализ транслокации конструкции на X-хромосому мы проводили в массовых аналитических скрещиваниях. Было проанализировано 2100 особей. В результате были отобраны 4 особи, в геноме которых произошло изменение хромосомной локализации маркера *mini-white* — с аутосомы на X-хромосому. Эти особи были индивидуально размножены и подвержены ПЦР-анализу со специфическими праймерами для подтверждения правильно прошедшей гомологичной рекомбинации. Оказалось, что только в одном случае (отводка T16) инактивирующая конструкция правильно встроилась в район локализации гена *tth*, заменив его копию геном *mini-white* (рис. 2а, 2б).

Таким образом, мы провели успешный нокаут гена *tth* с помощью направленной гомологичной рекомбинации. В итоге впервые были получены дрозофилы с нулевым аллелем гена *tth* — $y^-w^-tth^- \{w^+\}$. Однако эти дрозофилы несли мутации в генах *white* (*w*) и *yellow* (*y*), расположенные, так же, как и *tth*, в X-хромосоме. Для корректного изучения мутантного фенотипа необходимо было вывести новую мутацию на чистый генетический фон. Кроме того, нужно было избавиться от маркерного гена *mini-white* $\{w^+\}$ из района локализации *tth*.

Выведение мух линии $y^-w^-tth^- \{w^+\}$ на чистый генетический фон происходило в 2 этапа: с помощью сайт-специфической рекомбинации и с помощью гомологичной рекомбинации (см. Материалы и методы). На первом этапе мы с помощью системы рекомбинации Cre-Lox — удалили мар-

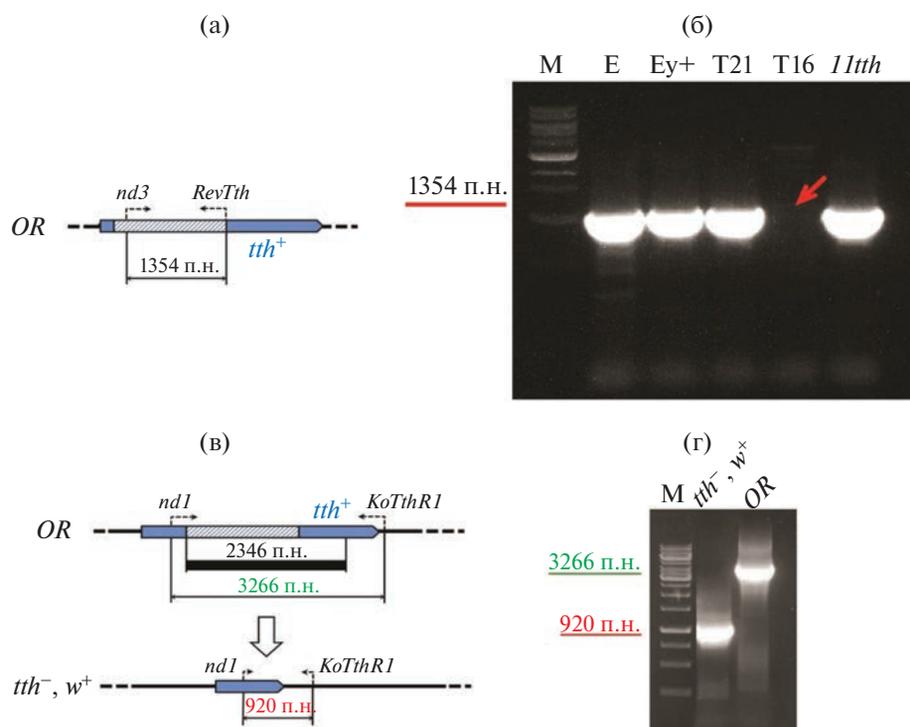


Рис. 2. Генотипирование дрозофил и анализ нокаута *tth*. (а) Схема последовательности гена *tth* у дрозофил дикого типа. Диагональными линиями обозначена открытая рамка считывания. (б) Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа с использованием пары праймеров: *nd3/RevTth* для ПЦР-анализа. *E*, *Ey+*, *T21*, *T16* – дрозофилы из анализируемых отводок. *11tth* – дрозофилы контрольной линии, содержащей инактивированную конструкцию по гену *tth* на II хромосоме. М – маркер длины фрагментов ДНК. Отводка *T16* – это нулевой мутант *tth*⁻{*w*⁻}, стрелкой показано отсутствие ПЦР-фрагмента, соответствующего гену *tth*. (в) Схема последовательности гена *tth* у мух дикого типа OR-R и у мух линии *w*⁺*tth*⁻ с указанием пар праймеров, использованных для ПЦР. Черным прямоугольником обозначен делетируемый фрагмент. (г) Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа на делецию гена *tth* в полученной отводке *w*⁺*tth*⁻ с использованием пары праймеров: *nd1/KoTthR1* (920 т.п.о. в случае делеции и 3266 т.п.о. в диком типе).

керный ген *mini-white* из нулевого аллеля *tth*. На втором этапе мы провели рекомбинацию, заменив с помощью кроссинговера мутации *w*⁻ и *u*⁻ на гены дикого типа (см. Материалы и методы). Потенциальных рекомбинантов *y*⁺*w*⁺*tth*⁻/Y отбирали по пигментации глаз. По нашим оценкам, частота рекомбинации между генами *w* и *tth* должна была составить 43.5%. То есть каждый второй красноглазый самец должен был быть потенциальным рекомбинантом. Было проанализировано четыре отводки, в двух из которых наличие нулевого аллеля гена *tth* подтвердили генотипированием с помощью ПЦР с праймерами из смежного с геном *tth* района (рис. 2в, 2г). Таким образом, мы получили линию нокаутных мух с делецией гена *tth* на чистом генетическом фоне.

Анализ фенотипа кутикулы погибших эмбрионов с нулевым аллелем гена *tth*

Для того чтобы определить, влияет ли делеция гена *tth* на выживаемость, мы проверили наличие

летальных эмбрионов в потомстве мутантных дрозофил. Было проанализировано 533 эмбриона, из которых 509 перешли на личиночную стадию развития. В контрольной линии дикого типа *Oregon-R* все эмбрионы ($N = 356$) перешли на личиночную стадию развития. Таким образом, частота эмбриональной летальности в линии *tth*⁻ составила 2.6% ($509/533 \times 100\%$), в контрольной линии – 0%. Анализ фенотипа кутикулы погибших эмбрионов показал ряд аномалий морфологического характера и нарушение формирования дорсо-вентральной оси полярности: их вентральные структуры (зубчатые полосы) формировались в латеральном положении (рис. 3). У всех погибших эмбрионов было выявлено нарушение развития челюстного аппарата, что свидетельствует о недоразвитии головного отдела (рис. 3б). Полученные результаты свидетельствуют о влиянии гена *tth* на эмбриональное развитие. Возможно, этот ген вовлечен в каскад важных процессов развития. Низкая пенетрантность эмбриональной летальности (2.6%) говорит о том, что существуют гены, способные

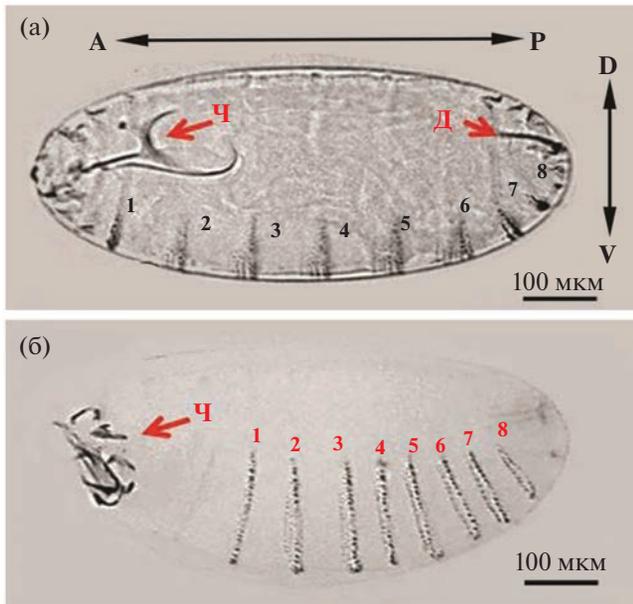


Рис. 3. Дефекты развития мутантного эмбриона *tth*⁻. (а) Дикий тип: эмбрион в вителлиновой оболочке (вид с латеральной стороны) (1–8 – абдоминальные сегменты; зубчатые полоски отражают количество и размер сегментов, Ч – челюстной аппарат, Д – дыхальца; А, Р – передняя и задняя оси полярности соответственно, V, D – вентральная и дорзальная оси полярности соответственно). (б) Мутантный эмбрион *tth*⁻ в вителлиновой оболочке, цифрами указаны зубчатые полоски, расположенные не в вентральной, как положено, а в латеральной области эмбриона. Нарушение развития головного отдела указано стрелкой. Масштабная полоска – 100 мкм.

частично заместить отсутствие белка ТТН у мутантов. Например, таким геном может быть родственный ген семейства *d4* – *dd4*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе нашей работы методом направленного внесения делеций была получена первая и единственная “нулевая” мутация гена *tth*. Этот ген кодирует белок без характерного D4-домена, но с доменом 2/3. Нулевая мутация не вызвала видимых фенотипических проявлений у взрослых особей, но в некоторой степени повлияла на выживаемость эмбрионов. Нарушение формирования головного отдела у погибших эмбрионов нулевых мутантов *tth* говорит о возможных дефектах в развитии их нервной системы, в частности, головного мозга. Известно, что некоторые гены семейства *d4* млекопитающих (*Cer-d4* и *neuro-d4*), а также ген дрозофилы *dd4* экспрессируются в нервной системе (Buchman et al., 1992; Nabirochkina et al., 2002). Кроме того, предварительный анализ экспрессии белка ТТН выявил его локализацию в оптических структурах мозга личинок и имаго дрозофилы (Kuvaeva et al., 2022). Эти данные го-

ворят об эволюционном консерватизме родственных генов семейства *d4* позвоночных и беспозвоночных животных, функция которых, по-видимому, связана с развитием нервной системы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Центру коллекций линий дрозофил Bloomington *Drosophila* Stock Center (Блумингтон, США) за предоставление ряда линий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке раздела Государственного задания ИБР РАН 2023 года № 0088-2021-0007.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Симонова О.Б., Куликова Д.А., Мерцалов И.Б. и др. Исследование суперэкспрессии нового гена *toothrin* у дрозофилы // Генетика. 2005. Т. 41. № 2. С. 196–202.
- Ashburner M., Golic K.G., Hawley R.S. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005. 1409 p.
- Buchman V.L., Ninkina N.N., Bogdanov et al. Differential splicing creates a diversity of transcripts from a neuro-specific developmentally regulated gene encoding a protein with new zinc-finger motifs // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20(21). P. 5579–5585.
- Gong W.J., Golic K.G. Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila* // PNAS. 2003. V. 100(5). P. 2556–2561.
- Ishizaka A., Mizutani T., Kobayashi K. et al. Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF-κB RelA/p50 het-

- erodimer // J. Biol. Chem. 2012. V. 287(15). P. 11924–11933.
- Kulikova D.A., Mertsalov I.B., Simonova O.B. *d4* family genes: genomic organization and expression // Russ. J. Dev. Biol. 2013. V. 44. P. 1–6.
- Kuvaeva E.E., Kulikova D.A., Simonova O.B., Mertsalov I.B. Studying the specific localization of Toothrin protein from related D4 family in *Drosophila melanogaster* // Rus. J. Dev. Biol. 2022. V. 53. № 2. P. 145–149.
- Nabirochkina E.N., Simonova O.B., Mertsalov I.B. et al. Expression pattern of *dd4*, a sole member of the *d4* family of transcription factors in *Drosophila melanogaster* // Mech. Dev. 2002. V. 114. P. 119–123.
- Nefedova L.N. *Drosophila melanogaster* as a model of developmental genetics: modern approaches and prospects // Russ. J. Dev. Biol. 2020. V. 51. P. 201–211.
- Turan S., Galla M., Ernst E. et al. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges // J. Mol. Biol. 2011. V. 407(2). P. 193–221.
- Will E., Klump H., Heffner N. et al. Unmodified Cre recombinase crosses the membrane // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30(12):e59.

Generation of a Null Mutation of the *toothrin* Gene by Targeted Homologous Recombination in *Drosophila melanogaster*

E. E. Kuvaeva¹, D. A. Kulikova¹, O. B. Simonova^{1, *}, and I. B. Mertsalov¹

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

*e-mail: osimonova@hotmail.com

Drosophila toothrin gene is related to the conserved *d4* family of genes that encode specific transcription factors. In early works, we investigated the effect of *tth* gene overexpression and characterized the specific pattern of its expression in the nervous system, but mutations in the *tth* gene have not yet been found. Null mutants are essential for analyzing gene function and screening of partner genes. Here we report the generation of the first *tth* gene knockout in *Drosophila* using a homologous recombination technique.

Keywords: *d4* gene family, *toothrin*, gene knockout, *Drosophila melanogaster*