

ISSN 0475-1450

Том 54, Номер 5

Сентябрь - Октябрь 2023



ОНТОГЕНЕЗ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 54, номер 5, 2023

ОБЗОРЫ

Роль физических процессов в онтогенезе оболочки пыльцы: гипотеза и экспериментальное подтверждение

Н. И. Габараева

283

Трансформация состояний плюрипотентности в ходе морфогенеза эпибласта мыши и человека

В. К. Абдыев, Е. В. Алеева, Е. Н. Калистратова, Е. А. Воротеляк, А. В. Васильев

306

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ксилогенез, фотосинтез и дыхание деревьев сосны обыкновенной, растущих в Восточной Сибири (Россия)

Г. Ф. Антонова, В. В. Стасова, Г. Г. Суворова, В. А. Осколков

323

Индуктор стресса эндоплазматического ретикулума дитиотреитол влияет на морфологию и подвижность культивируемых дермальных фибробластов человека и клеток фибросаркомы линии HT1080

Е. П. Турищева, Г. А. Ашнеев, М. С. Вильданова, Е. А. Смирнова

341

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Нестабильность среды обитания матери приводит к снижению устойчивости развития у *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda)

А. И. Богомолов, Ю. А. Краус, Е. Е. Воронежская

358

Паттерн экспрессии гена *foxn4* предполагает его ассоциацию с дифференцировкой нейросенсорных клеток у беломорского гидроида *Sarsia lovenii*

А. А. Ветрова, А. А. Прудковский, С. В. Кремнев

368

Contents

Vol. 54, No. 5, 2023

REVIEWS

The Role of Physical Processes in Pollen Wall Morphogenesis: Hypothesis and Experimental Confirmation

N. I. Gabarayeva

283

Transformation of Pluripotency States during Morphogenesis of Mouse and Human Epiblast

V. K. Abdyev, E. V. Alpeeva, E. N. Kalistratova, E. A. Vorotelyak, and A. V. Vasiliev

306

RESEARCH PAPERS

Xylogenesis, Photosynthesis and Respiration in Scots Pine Trees Growing in Eastern Siberia (Russia)

G. F. Antonova, V. V. Stasova, G. G. Suvorova, and V. A. Oskolkov

323

Endoplasmic Reticulum Stress Inducer Dithiothreitol Affects the Morphology and Motility of Cultured Human Dermal Fibroblasts

E. P. Turishcheva, G. A. Ashniev, M. S. Vildanova, and E. A. Smirnova

341

SHORT COMMUNICATIONS

Instability of the Mother's Environment Leads to Reduced Developmental Robustness in *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda)

A. I. Bogomolov, Y. A. Kraus, and E. E. Voronezhskaya

358

foxn4 Expression Pattern Suggests Its Association with Neurosensory Cells in the White Sea Hydrozoan *Sarsia loveni*

A. A. Vetrova, A. A. Prudkovsky, and S. V. Kremnyov

368

РОЛЬ ФИЗИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ ОБОЛОЧКИ ПЫЛЬЦЫ: ГИПОТЕЗА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ

© 2023 г. Н. И. Габараева*

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. Попова, 2, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*E-mail: 1906ng@mail.ru

Поступила в редакцию 01.02.2023 г.

После доработки 02.07.2023 г.

Принята к публикации 18.07.2023 г.

Обзор посвящен анализу и обобщению современных знаний о процессах, лежащих в основе онтогенеза оболочки мужского гаметофита. Обсуждены новые и ранее полученные данные по развитию экзины, а также выделены фазы, повторяющиеся в развитии экзины филогенетически далеких друг от друга видов растений. Хотя показано, что формирование экзины зависит от множества генов, повторяемость паттернов экзины у различных видов растений (например, колумеллятной и гранулярной экт-экзины, ламелл эндэкзины с “белыми линиями”) позволяет предположить, что эти паттерны основаны на неких небиологических принципах заполнения пространства. Механизмы, вовлеченные в развитие экзины, оставались неясными до тех пор, пока не было показано, что последовательность структур, наблюдаемая в ходе развития экзины, совпадает с последовательностью самоорганизующихся мицеллярных мезофаз. Позднее было обнаружено, что в формировании экзины участвует и другой физико-химический процесс — фазовое разделение. Чтобы подтвердить, что экзино-подобные паттерны могут генерироваться *in vitro* за счет простых физических процессов, и их формирование не требует регуляции на уровне генома, нами и другими авторами был предпринят ряд экспериментов. В обзоре обсуждены полученные в этих экспериментах данные. Несколько серий наших новых опытов по моделированию развития экзины с применением смесей поверхностно-активных веществ привели к получению структур, симулирующих основные типы экзины. Анализ образцов методом трансмиссионной электронной микроскопии показал, что эти структуры формируются за счет совместного действия фазового разделения и мицеллярной самоорганизации. Пересмотр и анализ данных по морфогенезу экзины и по моделированию ее формирования выявили, что молекулярно-генетические механизмы и физические силы работают в тандеме, со значительным вкладом физических процессов.

Ключевые слова: оболочка пыльцевого зерна, развитие пыльцы, физические силы, самоорганизация, мицеллярные мезофазы, фазовое разделение, моделирование морфогенеза

DOI: 10.31857/S0475145023050051, **EDN:** KAHONH

ВВЕДЕНИЕ

Одна из наиболее интересных черт оболочек пыльцы и спор — их широкое морфологическое и ультраструктурное разнообразие. Именно эта черта дает возможность идентифицировать ископаемые пыльцевые зерна в дисперсном состоянии и помогает проводить исследования в области палеоэкологии и изменения климата. Происхождение этого структурного многообразия было трудно объяснить. Тем не менее, еще в 1935-м г. Вудхаус (Wodehouse, 1935) использовал идеи Томпсона (Thompson, 1917) о роли механических и физических процессов в морфогенезе для интерпретации структурного многообразия пыльцы.

В наше время авторы, работающие в клеточной биологии и биологии развития, подчеркивают важ-

ность биофизических систем контроля процессов развития (Ingber, Jamieson, 1985; Ingber, 1993, 2003a, 2003b; Lecuit, Lenne, 2007; Lecuit, 2008; Lintilhac, 2014; Lintilhac et al., 2019; Stillman, Mayor, 2023). Были опубликованы обзоры, демонстрирующие роль процессов самоорганизации в биологических системах (например, Kauffman, 1993; Kurakin, 2005; Benítez, 2013; Schweisguth, Corson, 2019; Curantz, Manceau, 2021). Показано, что физические механизмы, в том числе процессы саморганизации участвуют в образовании различных паттернов и структур (Coen, Meyerowitz, 1991; Lecuit, Lenne, 2007; Lecuit, 2008; Shapiro et al., 2015; Schweisguth, Corson, 2019). Действительно, с точки зрения биофизики, морфогенез на тканевом уровне осуществляется “в результате взаимо-

действия свойств тканей и действующих на эти ткани механических сил” (Shellard, Mayor, 2023). Мандельброт (Mandelbrot, 1982, p. 162) утверждал по поводу центрального основного свойства биологической формы, что: “Характеристикам, предопределенным геометрией, незачем загромождать генетический код”. Имеется много хорошо изученных примеров самоорганизации на молекулярном уровне (Sitte, 1981), в том числе формирование нуклеосом, рибосом, полиферментных комплексов, микротрубочек, микрофиламентов, миофиламентов и других компонентов цитоскелета (например, Vignaud et al., 2012; Kadzik et al., 2020). Эти явления близки к самоорганизации в неживых системах. Геном в этом случае предоставляет начальные условия процессов развития (Regier, Hatzopoulos, 1988). Более того, сама плазматическая мембрана клетки и ее поверхностный покров – гликокаликс – также строятся путем самоорганизации. Однако роль физических сил, широко признанная в других областях биологии развития, все еще недооценивается специалистами, изучающими формирование таксон-специфичных форм оболочек пыльцевых зерен.

Идея о том, что физико-химический процесс, самоорганизация может участвовать в развитии стенки пыльцевого зерна, была впервые введена Хеслоп-Харрисоном (Heslop-Harrison, 1972) и позже развита другими авторами (Герасимова-Навашина, 1973; Sheldon, Dickinson, 1983; Dickinson, Sheldon, 1986; Габараева, 1990, Gabarayeva, 1993; van Uffelen, 1991; Hemsley et al., 1992; Blackmore et al., 2007, 2010). Хорошо известное, удивительное сходство паттернов экзины у многих неродственных видов ясно указывает, что формирование этих паттернов основано на каких-то физических закономерностях, таких как операции заполнения пространства (Scott, 1994).

Важная мысль о том, что самоорганизующиеся физико-химические взаимодействия вмешиваются в формирование паттернов в живых системах, принадлежит Д’Арси Томпсону (D’Arcy Thompson, 1917). Предположение о том, что гликокаликс, основа для будущей экзины в тетрадном периоде микроспор, является самоорганизующейся коллоидной системой (Габараева, 1990а, Gabarayeva, 1993), оказалось хорошим дополнением к предположению о коллоидно-мицеллярной природе спорополленина (Hemsley et al., 1992; Collinson et al., 1993). Наша совместная гипотеза о значительном участии процессов самоорганизации в формировании экзины (Gabarayeva, Hemsley, 2006; Hemsley, Gabarayeva, 2007) интерпретировала процесс формирования экзины как разворачивающуюся последовательность мицеллярных мезофаз с последующей аккумуляцией спорополленина.

То, что гликокаликс микроспор (=примэкзиновый матрикс по Heslop-Harrison, 1972) состоит главным образом из гликопротеинов, было показано гистохимически (Rowley, 1971, 1973; Pettitt, Jermy, 1974; Rowley, Dahl, 1977; Pettitt, 1979). Паули (Rowley, 1975) показал также присутствие в гликокаликсе липополисахаридов.

Многие гликопротеины и липополисахариды являются высокомолекулярными веществами (ВМВ), которые относятся к классу поверхностно-активных веществ – сурфактантов. Важно то, что ионы Ca^{++} в водной фазе вызывают поверхностную агрегацию гликопротеиновых молекул (Gingell, 1973), следовательно эти вещества обладают склонностью к структурообразованию и поверхностному мицеллообразованию (Bray, 1973). Гликопротеиновые растворы сочетают характеристики молекулярных растворов и коллоидов и известны как молекулярные коллоиды (МК). Последние являются основным содержимым живой клетки: большинство клеток содержат коллоиды, а не истинные растворы. Более того, сама цитоплазма является псевдоколлоидом. В этом смысле, значительная часть биологии является наукой о коллоидах. МК спонтанно образуют особые структурные системы, стабильные и обратимые, с размером частиц в коллоидном диапазоне – от 1 до 1000 нанометров (Фридрихсберг, 1995). Механизм образования мицелл является энергетически выгодным и идет путем самоорганизации (см. более детально в Hemsley, Gabarayeva, 2007). Это означает, что для генерации мицеллярных агрегатов требуется меньше энергии, чем для их распада.

Сфера мицеллярной самоорганизации “богата и замечательна” (Scriven, 1977; Ball, 1994). Благодаря самоорганизации возникают так называемые “биконтинуальные структуры”, напоминающие лабиринт. Они состоят из двух взаимопроникающих подобъемов, организованных по типу “масло-в-воде”, стабилизированных молекулами сурфактантов (см. Fig. 4С в статье Hemsley, Gabarayeva, 2007). Эти структуры подобны проламеллярным телам, из которых формируются хлоропласты (Gunning, Steer, 1986). Такие структуры предоставляют наиболее эффективный механизм упаковки в пространстве (Hemsley et al., 2004). Описано много разных форм мицеллярных структур.

Мицеллы – супрамолекулярные агрегаты, которые формируются в растворах сурфактантов при некой определенной концентрации данного вещества путем самоорганизации в результате гидрофобных взаимодействий. Главная последовательность мицеллярных мезофаз и их названия показаны на рис. 1. Некоторые характеристики мицелл обобщены Хэмли (Hamley, 2000) и – вкратце – в нашем предыдущем обзоре (Габараева, 2014). Последние две мезофазы последовательности являются жидкими кристаллами (Reinitzer, 1888;

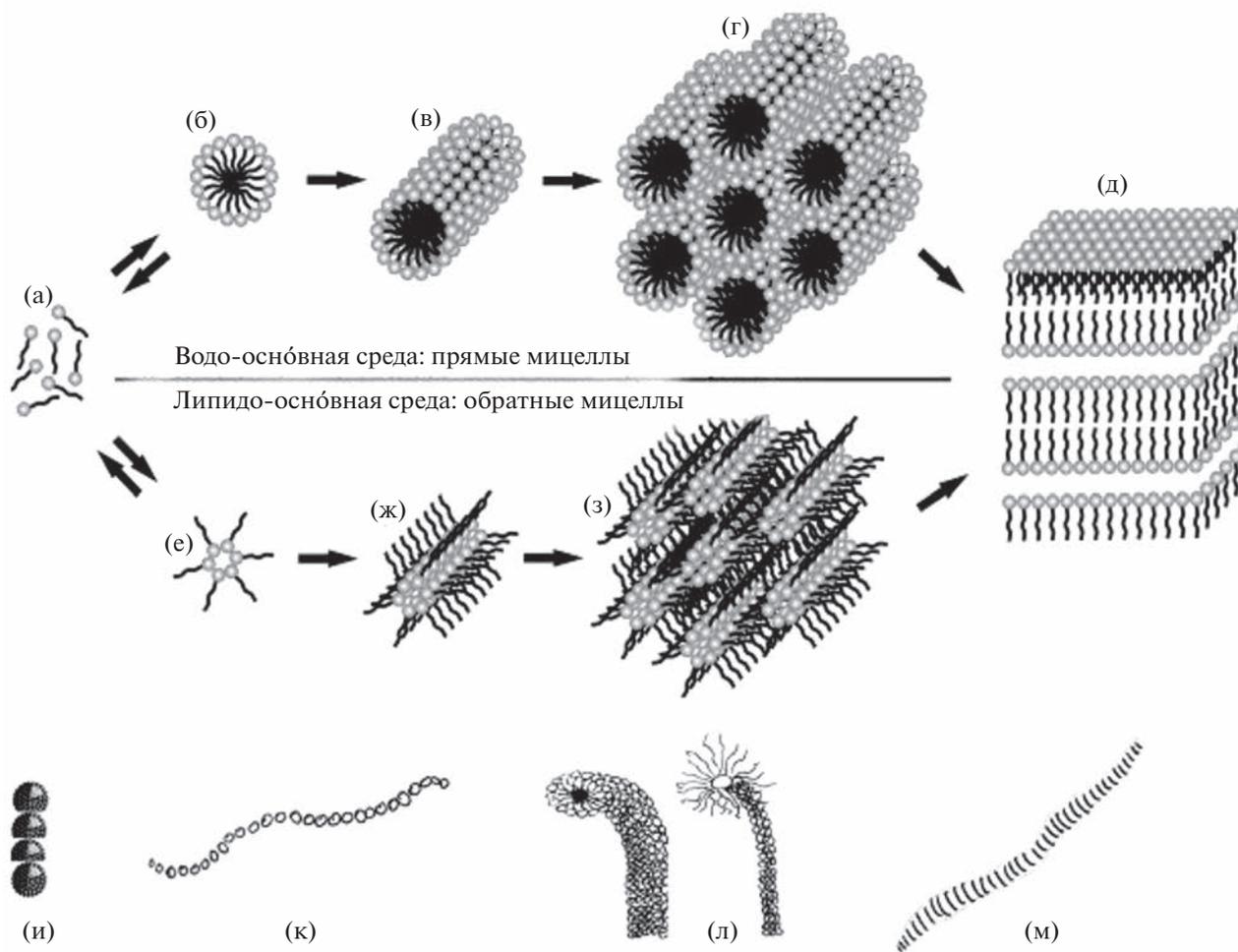


Рис. 1. Различные формы мицелл и их агрегатов (адаптировано из Hamley, 2000). (а–м) Сурфактанты в растворе (при условии возрастающих концентраций) демонстрируют последовательное прохождение мезофаз от дисперсных мономеров до ламелятной организации. Эти спонтанно-образующиеся структуры принимают слегка различную (реверсную) конфигурацию в зависимости от того, формируются ли они в водо-основной или липидо-основной среде. (а) Свободные молекулы с гидрофильной головкой и гидрофобным хвостом. (б) Сферическая мицелла (в разрезе). (в) Цилиндрическая мицелла. (г) Гексагонально-упакованные цилиндрические мицеллы. (д) Ламинатные (двуслойные) мицеллы в параллельной упаковке с зазорами между бислоями (“чистая” мезофаза). Эта последняя мезофаза является конечной независимо от состава среды. (е) Обратная (реверсная) сферическая мицелла (в разрезе). (ж) Обратная (вывернутая наизнанку) цилиндрическая мицелла. (з) Обратные гексагонально-упакованные цилиндрические мицеллы (средняя мезофаза). (и) Транзитивная мезофаза между сферическими и цилиндрическими мицеллами – колонки сферических мицелл. (к) Цепочки сферических мицелл – стринги. (л) Прямая и обратная изогнутые цилиндрические мицеллы. (м) Червеобразная мицелла (из сплюснутых сферических мицелл). На рис. 1 воспроизведены: Fig. 1a–f from the paper of Gabarayeva, Grigorjeva, 2016 “Simulation of exine patterns by self-assembly” from Permission and License number 5474710817880 of Springer Publishing Company.

Lehmann, 1904; Neto, Salinas, 2005). Был обнаружен феномен опалесценции, создаваемый жидкими кристаллами в живой (например, надкрылья жуков) и неживой (опал) природе (Reinitzer, 1888). Жидкие кристаллы (см. Fig. 5 в Hemsley, Gabarayeva, 2007) часто наблюдаются в цитоплазме развивающихся микроспор и тапетума (см. Fig. 5 в Gabarayeva et al., 2010: *Persea americana*). Опалесценция типична для поверхности многих пыльцевых зерен и спор, например для пыльцы *Stangeria eriopus* и *Encephalartos altensteinii*: пыльца этих

видов обладает переливчатостью при наблюдении под биноклем.

Молекулярно-генетические механизмы, включая дифференциальную экспрессию генома, определяют точный состав веществ и их относительные концентрации, включая предшественники спорополленина и его мономеры: жирные кислоты, фенилпропаноиды, например, *p*-кумаровую кислоту (Gubatz et al., 1986; Herminghaus et al., 1988; Wiermann, Gubatz, 1992; Wilmesmeier, Wiermann, 1995; Van Bergen et al., 2004; Hemsley et al., 1996a;

Wilmesmeier, Wiermann, 1997; Wiermann et al., 2001; Grienberger et al., 2010; Kim, Douglas, 2013; Wang et al., 2013; Quilichini et al., 2015; Li et al., 2019). Предшественники и мономеры спорополленина, будучи также поверхностно-активными веществами, доставляются в периплазматическое пространство, начиная со средней тетрадной стадии.

Известны многочисленные гены, экспрессия которых необходима для отложения экзины, так как определяет состав “строительных блоков”, необходимых для ее формирования (Paxson-Sowders et al., 1997, 2001; Ariizumi et al., 2004, 2005; Dong et al., 2005; Nishikawa et al., 2005; Zhang et al., 2007; Grienberger et al., 2010; Ariizumi, Toriyama, 2011; Dobritsa et al., 2011; Li et al., 2010; Wallace et al., 2011; Lou et al., 2014; Hu et al., 2014; Quilichini et al., 2015; Jia et al., 2015; Shi et al., 2015; Kim, 2015; Padmanaban et al., 2017; Xiong et al., 2020; Wang, Dobritsa, 2018, 2021; Li et al., 2019; Wang et al., 2021; Mi et al., 2022; Xu et al., 2022; Kanaoka et al., 2022). Обзор по генетическим и биохимическим механизмам построения стенки пыльцевого зерна опубликован Ши с соавторами (Shi et al., 2015). Недавно был опубликован краткий обзор по цитологической и метаболической дифференциации между вегетативными клетками и клетками мужского гаметофита, с акцентом на роль временной каллозной оболочки (Liu, Wang, 2021). Однако, ничто не противоречит идее, что возникновение специфических паттернов экзины основано на физико-химических закономерностях тесной упаковки в пространстве (так называемых “операциях заполнения пространства” – Scott, 1994; Hemsley, 1998).

Цель этой работы – обрисовать главные выводы из предыдущих исследований и представить новые эксперименты по моделированию экзин для того, чтобы сформулировать главные закономерности упущенных ранее из вида механизмов морфогенеза экзины.

РАМКИ ОБЗОРА

Обзор сфокусирован на роли физико-химических процессов в онтогенезе оболочки пыльцы. Мы сконцентрировались на наших собственных работах, а также на работах других авторов, которые имели дело с той же проблемой. Результаты последних 8-ми лет, которые прошли с нашего предыдущего обзора (Gabayeva, 2014), пересмотрены и проанализированы. Обсуждены прежние и новые онтогенетические исследования и экспериментальное моделирование.

ПЕРЕСМОТР КОНЦЕПЦИИ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФИЗИКО- ХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ, ЛЕЖАЩИХ В ОСНОВЕ РАЗВИТИЯ ЭКЗИНЫ

Ключевой момент заключается в том, что вся последовательность структур, наблюдавшаяся нами в ходе развития экзины у 43 видов из отдаленных и близких таксонов, совпадает с последовательностью самоорганизующихся мицеллярных мезофаз. Возникновение этих мезофаз инициируется в периплазматическом пространстве микроспор определяемыми геномом сурфактантами (вероятнее всего – гликопротеинами и липополисахаридами) при постепенном увеличении их концентрации. Огромное разнообразие паттернов экзины возникает, по сути, на основе трех основных мицеллярных элементов: сферических, цилиндрических (палочковидных) и пластинчатых (рис. 1). В органических системах эти элементы часто слегка искажены: встречаются искривленные столбики или волнистые пластины вместо прямых. Таковы натуральные элементы, наблюдаемые в процессе развития экзины: сферические единицы голосеменных (например, гранулы экзины у *Larix*); палочковидные единицы, такие как прямые или искривленные колумеллы большинства ангиоспермовых; прямые или искривленные альвеолы (как в экзине у *Stangeria* и *Pinus*); извилистые или ровные ламеллы (как у многих оболочек спор и в эндэксине семенных растений).

Сферические мицеллы наблюдались на ранних стадиях развития экзины у всех исследованных видов. У большинства видов мы наблюдали также колонки из сферических мицелл (которые являются транзитивной мезофазой между сферической и цилиндрической мезофазой (рис. 2: *Eupomatia laurina*, *Chamaedorea microspadix*, *Magnolia sieboldii*, *Nymphaea mexicana*, *Swida alba* и *Acer tataricum*), как и дискоидную мезофазу (колонки “монетных столбиков”, сплюснутые мицеллы) у цикадовых *Stangeria eriopus* и *Encephalartos altensteinii* (рис. 3а–3в; Fig. 7 в работе Hemsley, Gabarayeva 2007).

J. Rowley в своих многочисленных работах (см. полный список его статей в посвященной его памяти статье Блэкмо и Скварлы – Blackmore, Skvarla, 2012) наблюдал палочковидные элементы у большого числа видов. Он называл эти единицы пучками (tufts), (Rowley, 1990), и рассматривал как фундаментальные единицы экзины, подчеркивая их спиральную субструктуру. Спиральную субструктуру развивающихся колумелл мы наблюдали у многих изученных нами видов в тетрадном периоде; позднее она маскируется отложениями спорополленина. Спиральная субструктура цилиндрических мицелл, которой присуща закрученность, известна, например, в хиральной, нематической фазе и смектической С фазе, где молекулы рас-

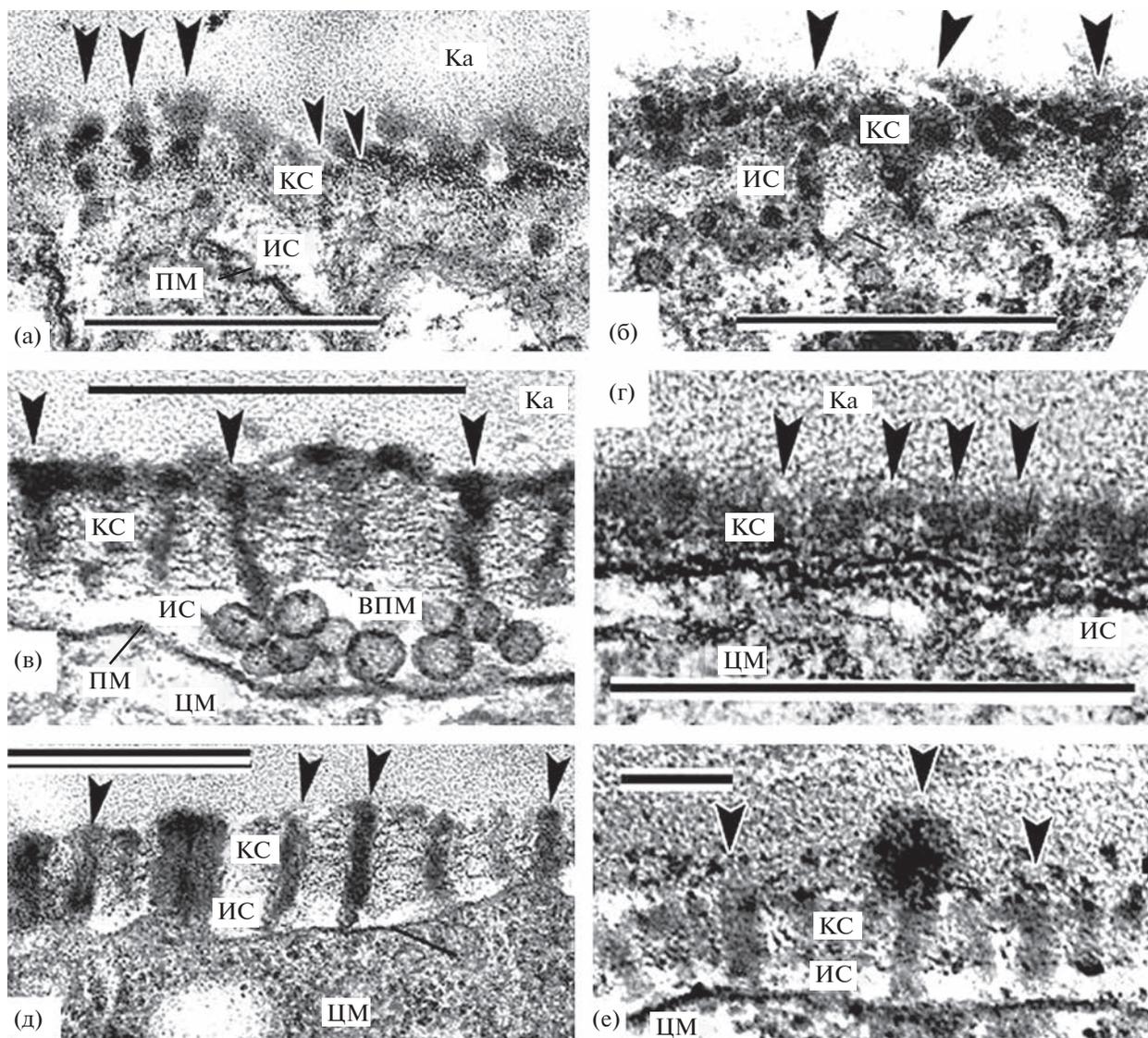


Рис. 2. Молодая и средняя тетрадные стадии развития микроспор у ряда видов, выявляющие инициальные мицеллярные мезофазы параллельно с фазовым разделением. (а, б) Колонки сферических мицелл на ранней тетрадной стадии у *Eupomatia laurina* и *Chamaedorea microspadix* (головки стрелок). (в–е) Колонки полуслившихся сферических мицелл (головки стрелок) на средней тетрадной стадии у (в) *Magnolia sieboldii*, (г) *Nymphaea mexicana*, (д) *Swida alba*, (е) *Acer tataricum*. Фазовое разделение в периплазматическом пространстве хорошо заметно как концентрированный (КС) и истощенный (ИС) слой. Ка – каллоза, ПМ – плазматическая мембрана, ВПМ – выросты плазматической мембраны, цм – цитоплазма микроспоры. (а–е: Fig. 3a'–f' из Gabarayeva, Grigorjeva, 2016). Масштабные линейки 0.5 мкм. На рис. 2 воспроизведены: Fig. 2 from the paper of Gabarayeva, Grigorjeva, 2016 “Simulation of exine patterns by self-assembly” from Permission and License number 5474710817880 of Springer Publishing Company).

положены винтообразным образом (см. Fig. 11, i, j в работе Gabarayeva, 2014). Мы считаем, что “тафты” (по терминологии Rowley) соответствуют цилиндрическим мицеллам или, скорее, их кластерам.

В настоящее время выяснилось, что мицеллярная самоорганизация – не единственный физический процесс, вовлеченный в развитие экзины. Другим важным процессом является фазовое разделение. Этот процесс является собой физический механизм гетерогенного распределения веществ в

неком объеме. В частности, фазовое разделение локально увеличивает концентрацию веществ в одной области периплазматического пространства, одновременно приводя к истощению в другой его области. Было показано (Lavrentovich et al., 2016), что многообразие паттернов экзины может быть объяснено фазовым переходом к пространственно измененным фазам. Последние являются геометрически правильными структурами, вызванными фазовым разделением (Leibler, Andelman, 1987). При фазовом разделении изначально сме-

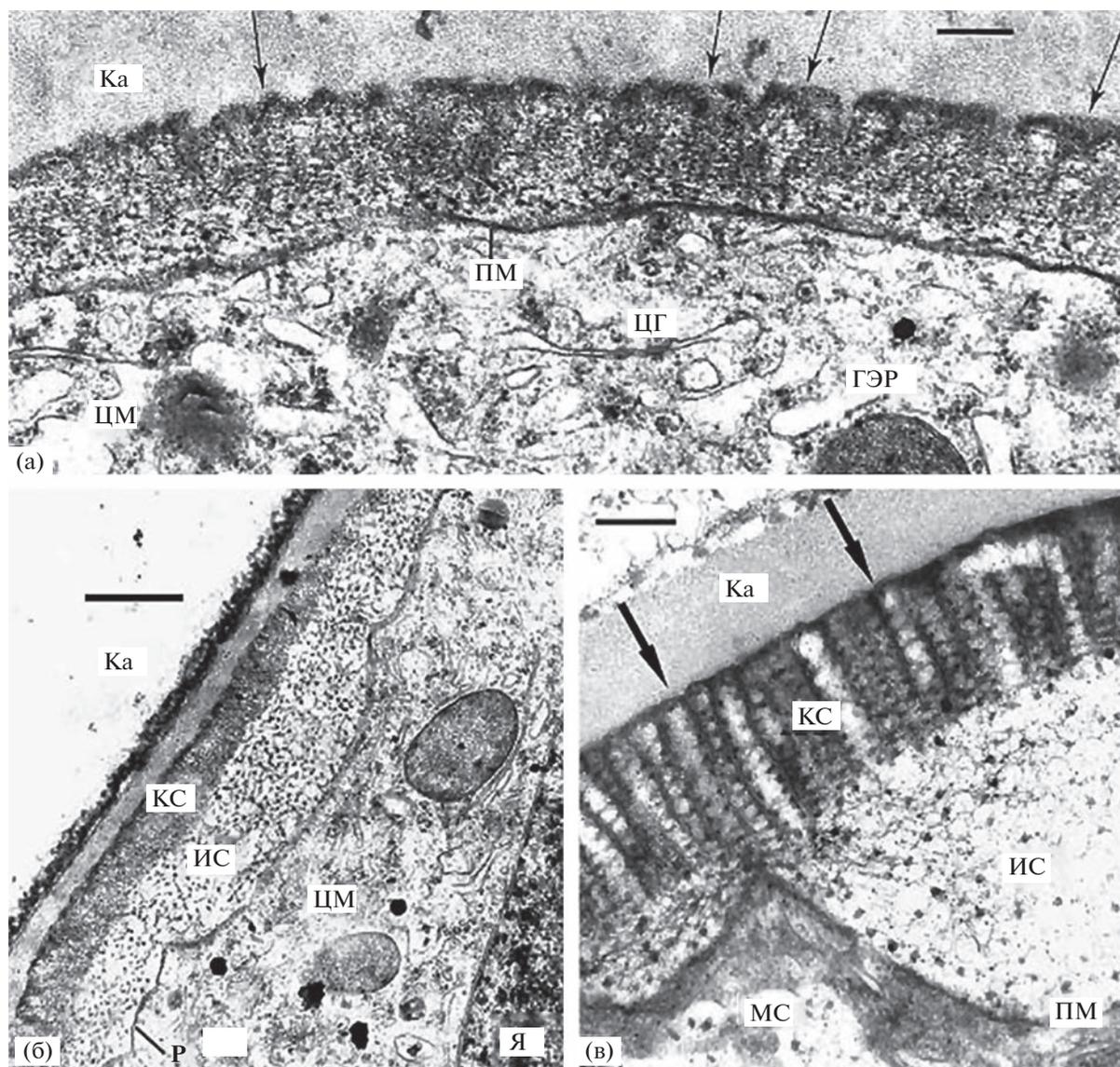


Рис. 3. Молодая и средняя тетрадные стадии развития микроспор у цикадовых. (а) Транзитивная мицеллярная мезофаза “монетные столбики” (колонки уплощенных сферических мицелл) при переходе от ранней к средней тетрадной стадии у *Stangeria eriopus*. Гликокаликс состоит из отдельных радиально ориентированных и тесно упакованных колонок сплюснутых сферических мицелл (стрелки). (б, в) Средняя тетрадная стадия у *Stangeria eriopus* (б) and *Encephalartos altensteinii* (в). Фазовое разделение веществ гликокаликса привело к расслоению на концентрированный (КС) и isotropic (ИС) слои. Упорядоченная мицеллярная структура – слой цилиндрических мицелл – локализована внутри концентрированного слоя. Эта средняя (или гексагональная) мезофаза является каркасом будущей удлиненно-альвеолярной эктэкины. ГЭР – гладкий эндоплазматический ретикулум, ЦГ – цистерны Гольджи. Остальные обозначения здесь и далее – как на рис. 2. Масштабные линейки: (а) 0,3, (б) 1, (в) 0,2 мкм. На рис. 3 воспроизведены: (а, б) Plate V, 11 and VI, 13 from the paper of Gabarayeva, Grigorjeva, 2002, “Exine development in *Stangeria eriopus* (Stangeriaceae): ultrastructure and substructure, sporopollenin accumulation, the equivocal character of the aperture, and stereology of microspore organelles”, Review of Palaeobotany and Palynology 122 (2002) 185-218, from Permission and License number 5474710508368 of ELSEVIER; (с) Plate IV, 6 from the paper of Gabarayeva, Grigorjeva, 2004, “Exine development in *Encephalartos altensteinii* Cycadaceae): ultrastructure, substructure and the modes of sporopollenin accumulation”, Review of Palaeobotany and Palynology 132 (2004) 175–193, from Permission and License number 5474710077579 of ELSEVIER.

шанные системы подвергаются фазовому расслоению (процесс, обратный смешиванию) на два или более компартамента, в результате которого в двух результирующих измененных фазах может появляться упорядоченная пространственная структу-

ра (Alberti, 2017). Позднее появилась теория, объясняющая все многообразие паттернов экзины, включая скульптуру и распределение апертур, этим физическим процессом (Radja et al., 2019). Эти авторы использовали компьютерное моделиро-

вание, чтобы показать, что в ходе развития оболочки пыльцы фазовое разделение ведет к пространственно-измененной фазе, и что паттерны оболочки пыльцы формируются путем фазового разделения примэкины, сопряженного с извилистым профилем плазматической мембраны. Важно, что периплазматическое пространство микроспор является местом локализации сурфактантов, концентрация которых постоянно увеличивается что приводит к мицеллярной самоорганизации. Принимая во внимание этот факт, мы предложили нашу интерпретацию: после фазового разделения, структуры пространственно-измененной фазы представляют собой ничто иное как последовательность мицеллярных мезофаз (Gabaeva et al., 2020).

Фазовое разделение играет роль во многих других клетках растений и животных, где необходимо гетерогенное распределение вещества в цитоплазме. Например, было показано, что путем изменения организации и динамики связанных с полярностью сигнал-несущих центров, фазовое разделение может служить универсальным биофизическим механизмом, лежащим, наряду с генетической регуляцией, в основе асимметричного клеточного деления (АКД) у бактерий и других организмов (Tan et al., 2022).

Радья (Radja, 2020) в своем обзоре подчеркивает, что количество отдельных компонентов экзины у различных видов неизвестно, и распределение липополисахаридов, гликопротеинов и сложных углеводов, предполагаемых как составные компоненты экзины, должно быть проверено.

Ранее мы уже подчеркивали, что тетрадный период – ключевой в онтогенезе пыльцевой оболочки. Начиная с 19-го века были проведены сотни микроскопических исследований тетрадных (и посттетрадных) стадий, особенно после появления трансмиссионного и сканирующего электронных микроскопов. Но тетрадный период получил недостаточно внимания со стороны молекулярных генетиков и биохимиков, за несколькими исключениями (например, Wang et al., 2021). Пересмотр всех наших онтогенетических данных, с акцентом на ключевой тетрадный период (см. Gabaeva et al., 2019, 2021; Gabaeva, Grigoreva, 2021; Grigoreva et al., 2021 и другие наши публикации в списке литературы) показал не только соответствие последовательности развивающихся структур мицеллярной последовательности, но также признаки фазового разделения, предшествующие каждой стадии развития экзины. По-видимому, локальное увеличение концентрации сурфактантов в одном из подобъемов периплазматического пространства является необходимым для запуска фазового перехода к следующей мезофазе, сразу после расслоения. Признаки фазового разделения и структур, соответствующих тем или иным мицеллярным мезофазам в ходе развития экзины

легко видеть на наших микрографиях (рис. 2 и все последующие). Они очевидны в тетрадном периоде у видов, принадлежащих широкому спектру таксонов (от лептоспорангиатных папоротников до однодольных покрытосеменных). Наиболее выразительные признаки фазового разделения наблюдаются в ходе развития пыльцевой стенки у *Echinops exaltatus* и *Tanacetum vulgare*, тех видов Asteraceae, которые имеют сложную, “2-х этажную” экзину, состоящую из наружных тонких и внутренних толстых колумелл (рис. 4а–4г). У обоих видов фазовое разделение происходит на средней тетрадной стадии (рис. 4а, 4в), приводя сначала у *Echinops exaltatus* к образованию большой лакуны (истощенный слой – рис. 4а) и разбавленного слоя у *Tanacetum vulgare* (рис. 4в), затем к появлению толстых проколумелл внутреннего слоя у обоих видов (рис. 4б, 4г). Особым моментом является то, что вещества, заполняющие периплазматическое пространство, фазово-разделены не только параллельно плазмалемме, но и вокруг растущих колумелл (рис. 4б, *восклицательные знаки*). Это особенность, часто наблюдаемая в развитии оболочки пыльцы. Весьма вероятно, что и какой-то другой, еще не обнаруженный физический процесс вовлечен в развитие экзины, в данном случае – прерывистого внутреннего тектума (наружные колумеллы находятся в контакте с внутренними через отверстия во внутреннем тектуме – рис. 4б, 4г, *звездочки*; 4в, *стрелка*). Это должен быть самоорганизующийся реакционно-диффузионный (РД) процесс, ведущий к формированию продырявленных пластинок. Последние соответствуют РД-модели Тьюринга, одной из наиболее известных теоретических моделей саморегуляции паттернов в живых системах (Kondo, Miura, 2010).

Основные стадии развития экзины у *Trevesia burckii* показаны на рис. 5. На ранней тетрадной стадии процесс фазового разделения виден внутри инвагинаций плазматической мембраны (рис. 5а). Несколько позднее фазово-разделенные слои становятся более отчетливыми, и скопления сферических мицелл появляются внутри разбавленного слоя (рис. 5б). На средней тетрадной стадии плазмалемма глубоко и регулярно инвагинирована и несет на верхушках скопления тесно упакованных, параллельных друг другу цилиндрических мицелл (средняя мицеллярная мезофаза – рис. 5в); фазово-разделенные слои хорошо заметны. На поздней тетрадной стадии плазмалемма становится ровной, фазовое разделение – особенно хорошо заметным, и кластеры цилиндрических мицелл видны как проколумеллы после аккумуляции на них инициального спорополленина (рис. 5г).

Процесс инвагинации плазматической мембраны наблюдался у широкого круга видов и был важной предпосылкой для точной предразметки расположения колумелл: в ходе формирования проколумелл арабиногалактан-протеины (АГП)

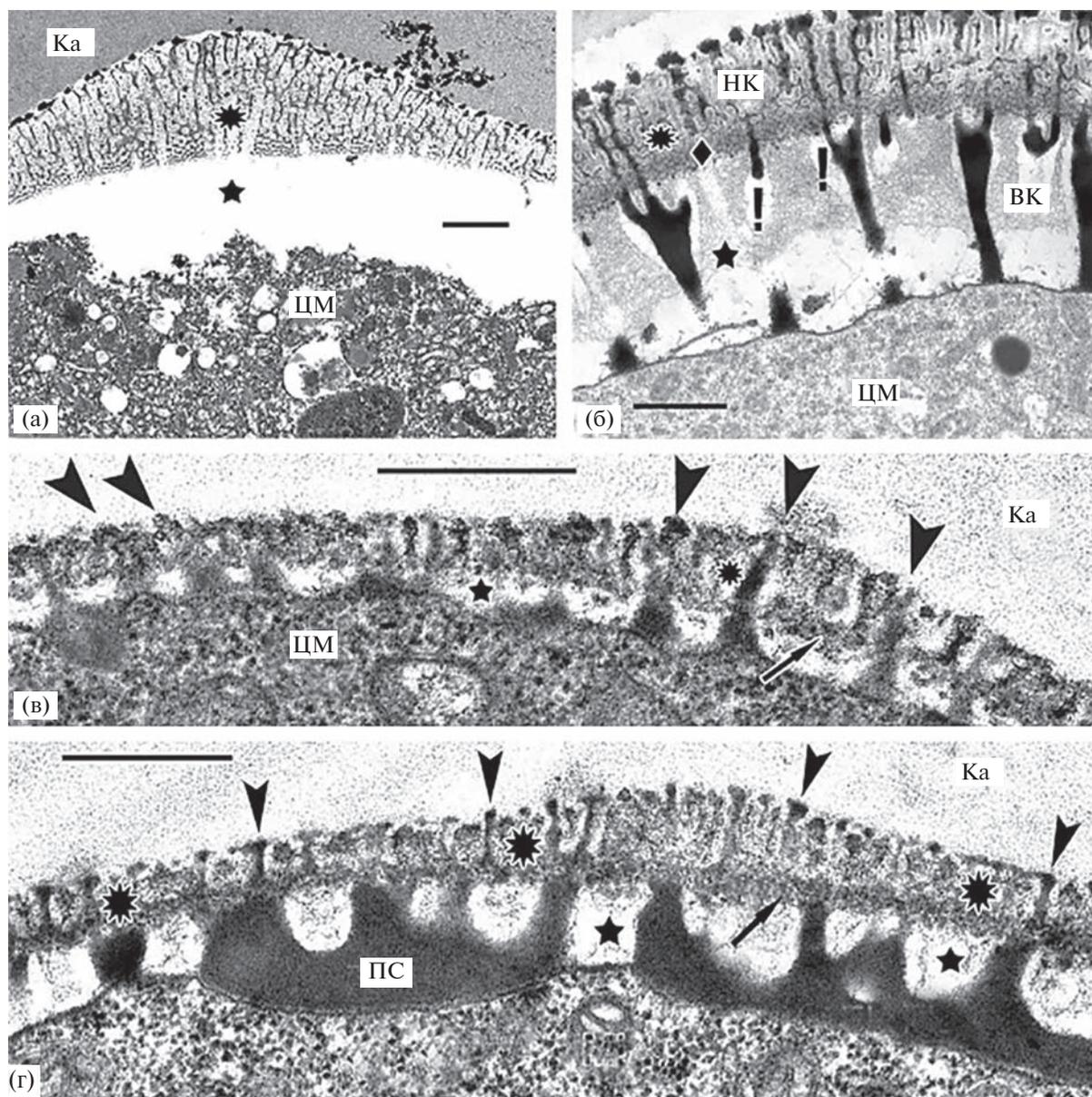


Рис. 4. Ярко выраженное фазовое разделение и мицеллярные структуры в тетрадном периоде у *Echinops exaltatus* и *Tanacetum vulgare*. (а, б) Средняя и поздняя тетрадные стадии у *E. exaltatus*. (а) Фазовое разделение крайне выражено: слой тесно упакованных цилиндрических мицелл (средняя мезофаза) локализован в концентрированном слое (астерик), а большой просвет внизу – истощенный слой (звездочка). (б) Поздняя тетрадная стадия: примэксина с наружными проколумеллами (НК) и внутренними толстыми проколумеллами (ВК). Признаки фазового разделения очевидны (астерик и звездочка). Средняя (в) и поздняя (г) тетрадные стадии у *Tanacetum vulgare*. Примэксина в процессе развития. Наружный слой тонких проколумелл (головки стрелок) основан на цилиндрических мицеллах (средняя мезофаза) внутри конденсированного слоя (астериски), толстые колумеллы – внутри истощенного слоя (звездочки). Внутренний тектум: продырявленная пластинка (стрелки). Масштабные линейки: (а, б) 1 мкм, (в, г) 0,5 мкм. На рис. 4 воспроизведены: (а, б) Figs. 6a, 8d from the paper of Gabarayeva et al. “Assembling the thickest plant cell wall: exine development in *Echinops* (Asteraceae, Cynareae)”, *Planta* (2018) 248:323–346, from Permission and License number 5474711020697 of Springer Nature; (в, г) Figs. 6D, 7F from the paper of Gabarayeva et al., “Pollen wall substructure and development in *tanacetum vulgare* (compositae: anthemideae): revisiting hypotheses on pattern formation in complex cell walls”, *Int. J. Plant Sci.* 177(4):347–370. 2016. The University of Chicago).

и ксиланы были обнаружены на пиках ундулирующей плазматической мембраны в тетрадном периоде (Suzuki et al., 2017). Было высказано предположение (Li et al., 2017), что арабиногалактан-проте-

ины могут быть местами адгезии спорополленина и компоновки паттерна в раннем развитии оболочки микроспор. Это полностью совпадает с нашей давней точкой зрения на раннюю детерминацию

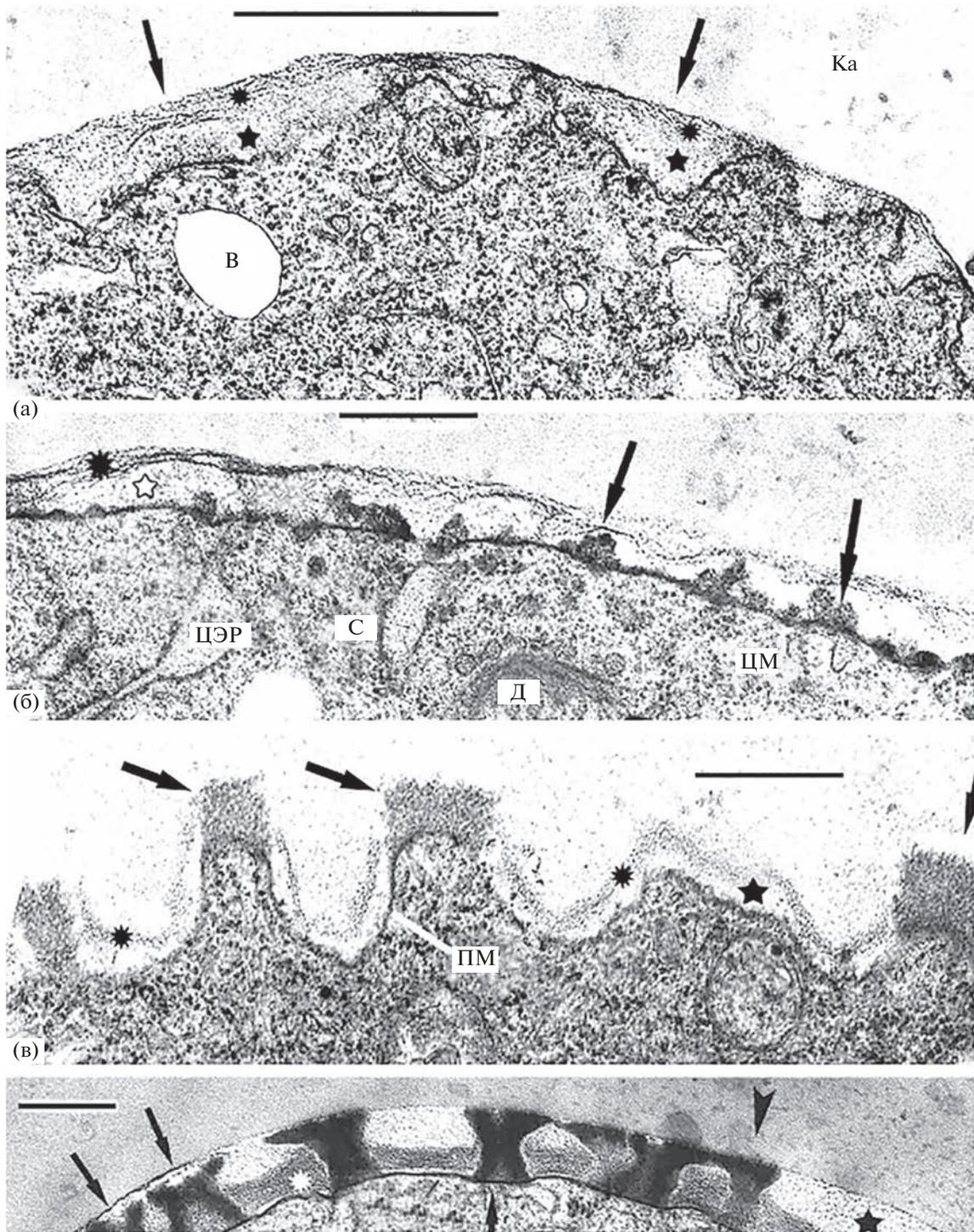


Рис. 5. Тетрадный период у *Trevesia burckii*. (а) Ранняя тетрадная стадия. Инициальное фазовое разделение внутри регулярных инвагинаций плазмалеммы (стрелки): концентрированный (астериски) и истощенный (звездочки) слои. (б) Молодая тетрада. Кластеры сферических мицелл (стрелки) внутри разбавленного слоя (астериск). (в) Средняя тетрадная стадия. На верхушках глубоко инвагинированной плазмалеммы появляются кластеры цилиндрических мицелл (стрелки) и истощенный (звездочка) слой выражены сильнее. (г) Поздняя тетрадная стадия. После инициальной аккумуляции спорополленина кластеры цилиндрических мицелл преобразуются в проколумеллы. Фазово-разделенные слои резко выражены и поменялись местами. ЦЭ – расширенная цистерна ЭР, В – вакуоль. Масштабные линейки: (а, б) 1 мкм, (в, г) 0.5 мкм. На рис. 5 воспроизведены: (а–г) Plate III, 5; Plate IV, 3; Plate V, 2; Plate VII, 3 from the paper of Gabarayeva et al. “Sporoderm development in *Trevesia burckii* (Araliaceae). I. Tetrad period: Further evidence for the participation of self-assembly processes”, Review of Palaeobotany and Palynology 156, 2009, 211–232, from Permission and License number 5474710296934 from ELSEVIER.

паттернов экзины (Gabarayeva et al., 2009), которая, как можно предположить, происходит за счет самосборки белковых комплексов.

Такие же события наблюдаются в онтогенезе экзины у других изученных нами видов: *Symphytum officinale* (Gabarayeva et al., 2011), *Eupomatia laurina* (Gabarayeva, Grigorjeva, 2014), *Passiflora racemosa* (Gabarayeva et al., 2013a, b), *Polemonium caeruleum* (Gabarayeva, Grigorjeva, 2018), *Chloranthus japonicus*, магнолииды и другие рано разошедшихся покрытосеменные (Gabarayeva et al., 2021), *Cymbalaria muralis* (Polevova et al., 2022).

Другие типичные черты самоорганизующихся систем — повторение мезофазной последовательности — наблюдались в развитии пыльцевых оболочек у *Acer tataricum* L. и у *Passiflora racemosa* Brot., где после появления конечной мезофазы (ламинатных мицелл, основы ламелл эндэксины) появлялась первая мезофаза — сферические мицеллы (Gabarayeva et al., 2010, рис. 7; 2013b, рис. 10), и началась вторая мицеллярная последовательность.

Хотя совпадение наблюдаемых стадий развития экзины и основной мицеллярной последовательности впечатляюще, для его подтверждения необходимо экспериментальное моделирование. Чтобы показать, что фазовое разделение и мицеллярная самоорганизация вовлечены в развитие оболочки пыльцы, были предприняты эксперименты *in vitro*. В них использовались сурфактанты периплазмы микроспор (натуральные или их заменители), чтобы получить симуляты натуральных экзин. Эти попытки были успешными. Первые экспериментальные усилия реплицировать структуру оболочек спор *in vitro* были предприняты Хемсли и его соавторами (Hemsley et al., 1996; 1998; 2003). Авторы исследовали структуру и развитие мегаспор *Selaginella* и обнаружили высоко упорядоченную коллоидно-кристаллическую оболочку, которая состояла из сферических единиц спорополленина (Hemsley, Griffiths, 2000). Эти авторы использовали свое оригинальное оборудование и создали условия искусственного эксперимента, близкие таковым натурального спорангия. Полученные симуляты оказались очень схожими с натуральными оболочками ряда видов, особенно — со сложной оболочкой *Selaginella*. Наиболее важный вывод, следующий

из этих экспериментов: сложная форма не обязательно является следствием сложных взаимодействий.

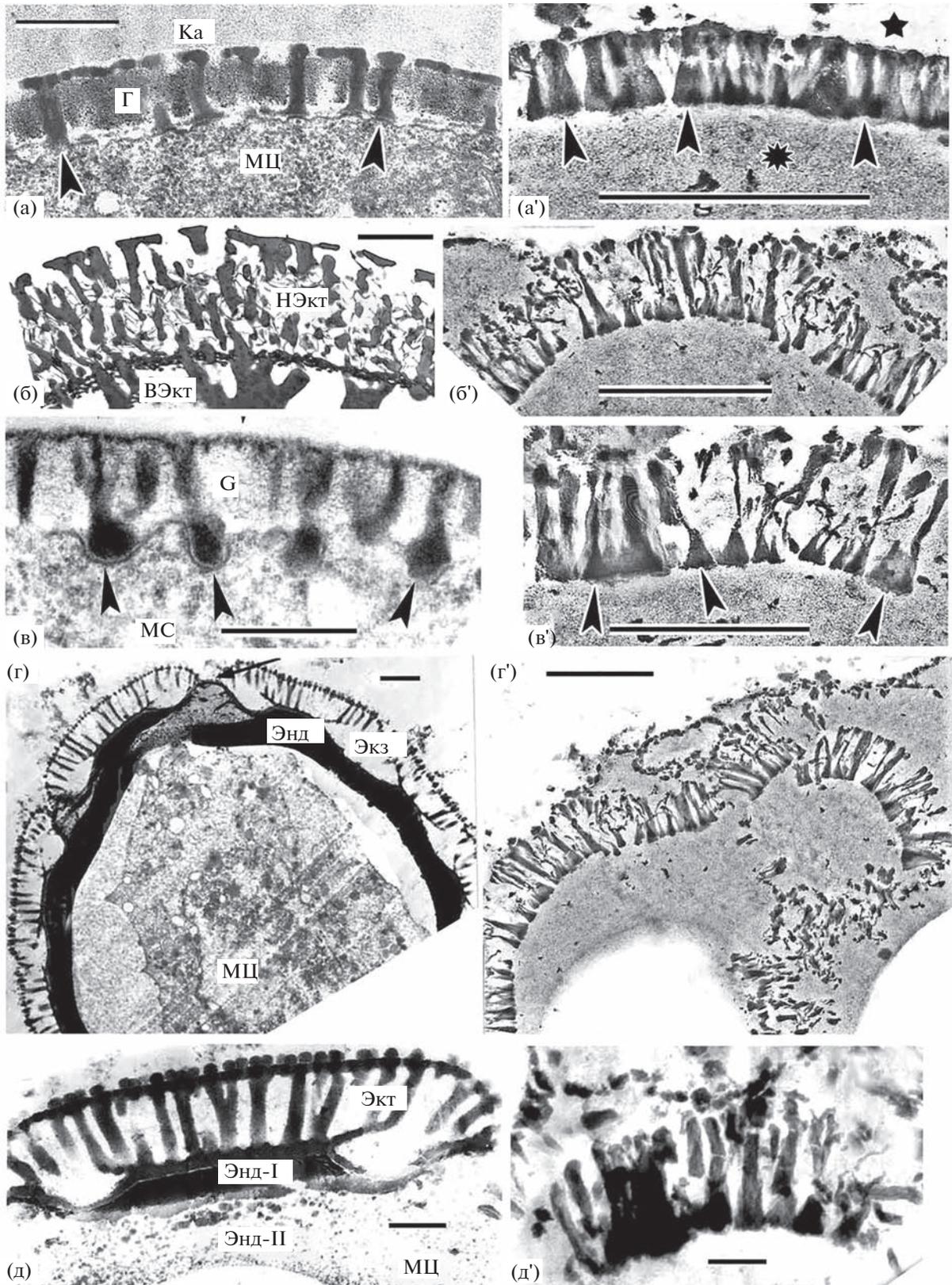
Позднее мы продолжили эксперименты по моделированию экзины, используя наш собственный простой метод (см. Gabarayeva, Grigorjeva, 2016; 2017). Мы получили *in vitro* симуляты всех основных типов экзины: колумеллярной, гранулярной, альвеолярной и гомогенной эктэксины, а также ламеллярной эндэксины (рис. 6, 7, 8, а также Gabarayeva et al., 2019; 2020). Таким образом, используя смеси сурфактантов, мы показали, что все паттерны экзины могут быть симулированы в *in vitro* системах, где действуют физические силы фазового разделения и мицеллярной самоорганизации.

НОВЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО МОДЕЛИРОВАНИЮ ЭКЗИНЫ: ИСКУССТВЕННЫЕ ЭКЗИНО-ПОДОБНЫЕ ПАТТЕРНЫ

В этих экспериментах был использован наш оригинальный простой метод (Gabarayeva, Grigorjeva, 2016; Gabarayeva et al., 2019). Коллоидные смеси сурфактантов — тех же или аналогичных тем, что находятся в периплазматическом пространстве развивающихся микроспор — приготавливали, используя эти вещества в различных сочетаниях и концентрациях (табл. 1). Смеси пяти типов (смесь № 1, № 2, № 3, № 4, № 5) помещали либо в малые чашки Петри диаметром 3.5 см, либо между 2-х предметных стекол, оставляя их в покое в течение некоторых периодов времени (табл. 1) для того, чтобы прошли процессы фазового разделения и самоорганизации путем конденсации (испарения воды). Продолжительность эксперимента зависела от скорости испарения воды (табл. 1, “ДДФ” — дни до момента фиксации).

Мы слегка модифицировали наш метод, описанный ранее (Gabarayeva, Grigorjeva, 2016, 2021; Gabarayeva et al., 2019, 2020; Grigorjeva et al., 2021), в частности использовали некоторые новые вещества, в том числе муцин, лецитин и стеариновую кислоту. Кроме того, в экспериментах со смесями 1, 2 и 4 мы удерживали смеси в процессе конден-

Рис. 6. Натуральные паттерны экзины ряда видов (а–д) и экспериментальные симуляты, возникшие путем самоорганизации (а'–д'). (а) Колумеллярная эктэксина на поздней тетрадной стадии у *Acer tataricum*. Колумеллы (головки стрелок). (а') Симулят с колумеллярно-подобным паттерном (головки стрелок) на границе раздела липидного (астерик) и водного (звездочка) доменов. (б) Зрелая эктэксина у *Echinops exaltatus* с наружной эктэксиной (НЭкт) и внутренней эктэксиной (ВЭкт). (б') Симулят, имитирующий наружную эктэксину *Echinops*. (в) Поздняя тетрадная стадия у *Cabomba aquatica*. Развивающиеся колумеллы с расширенным основанием (головки стрелок). (в') Колумеллярно-подобный симулят, “колумеллы” с расширенным основанием (головки стрелок). (г) Свободная микроспора *Borago officinalis* с зрелой колумеллярной эктэксиной (Экт) и с эндэксиной (Энд). Апертурный район (стрелка). (г') Симулят, частично имитирующий эктэксину у *Borago*. (д) Интерапертурный район экзины у *Borago officinalis* с колумеллярной эктэксиной (Экт) и двуслойной эндэксиной (Энд-I и Энд-II). (д') Симулят, частично сходный с эктэксиной у *Borago*. Масштабные линейки: (а, в, д; а'–г') 0.5 мкм; (б) 2 мкм; (г) 1 мкм; (д') 0.1 мкм. На рис. 6 воспроизведены: Fig. 2 from the paper of Gabarayeva et al., Annals of Botany XX: 1–14, 2019, “Mimicking pollen and spore walls: self-assembly in action”, from Permission and License number 5491291182073 of Springer Publishing Company).



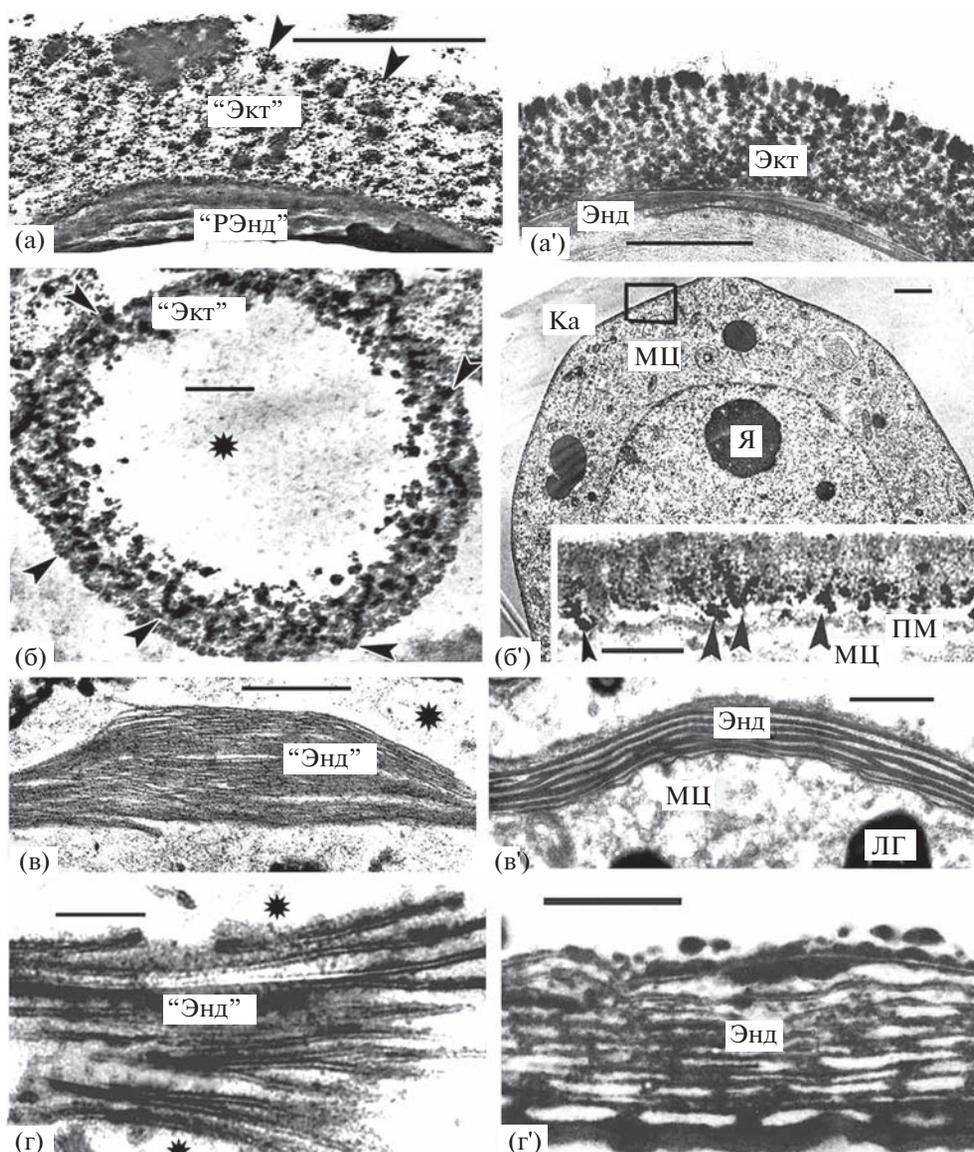


Рис. 7. Модели и сопоставимые с ними натуральные гранулярные эктэксины и ламеллятные эндэксины. (а–г) Симуляты, (а', б') гранулярные эктэксины, (в', г', вставка) ламеллятные эндэксины. (а) Развитие ламинатных мицелл ("РЭнд") в концентрированном слое, симулирующее ламеллы эндэксины у *Larix decidua* (а'). (б) Симулят оболочки микроспоры, основанный на сферических мицеллах, самоорганизованных в колонки (головки стрелок), сходный с паттерном развивающейся экзины у *Symphytum officinale* на средней тетрадной стадии (б') и увеличенная часть оболочки с развивающимися колумеллами (головки стрелок, вставка). (Fig. 2g, eg', h, h' из Gabarayeva et al., 2020). (в) Модель ("Энд"), состоящая из ламинатных мицелл, симулирует ламеллы эндэксины у *Juniperus communis* (в', Энд). (Fig. 9a, a' из Gabarayeva et al., 2020). (г) Модель ("Энд"), состоящая из ламинатных мицелл с типичными зазорами между бислоями, симулирует ламеллы эндэксины у *Abies concolor* (г', Энд). (Fig. 9d, d' из Gabarayeva et al., 2020). Экт - эктэксина, РЭнд - развивающаяся эндэксина, МЦ - цитоплазма микроспоры, Я - ядрышко, ПМ - плазмалемма. Масштабные линейки: (а, а', б') 1 мкм; (б, вставка в б', г) 0.1 мкм; (в, в', г') 0.5 мкм. На рис. 7 воспроизведены: parts of Figs. 2 and 9 from the paper of Gabarayeva et al., "Artificial pollen walls simulated by the tandem processes of phase separation and self-assembly in vitro", *New Phytologist*, 2019, 225: 1956–1973 from Permission and License Number 5491290930469 of John Wiley and Sons.

сации, поместив их между двумя предметными стеклами, разделенными стеклянными капиллярами диаметром 0.4 мм. Таким образом, на экспериментальные смеси накладывались физические ограничения, что приближало состояние коллоидных растворов к естественным условиям узкого

периплазматического пространства микроспоры. Эксперименты были проведены шесть раз с одинаковыми результатами, но с небольшими вариациями в размерах и кривизне структурных единиц.

Высохшие пленки фиксировали обычным методом, используемым в электронной микроскопии

Таблица 1. Компоненты, их концентрации и объемы, использованные для получения симулятов экзины (рис. 6 и 7). ДДФ – число дней опыта (процесса самоорганизации) до фиксации

№ смеси	Компоненты	Число дней до фиксации (ДДФ)	№ рисунка
1	Каллоза 3% (водный коллоидный раствор, 2 мл) + хондроитин (2 мл) + гипромелдоза 3% (водный раствор, 2 мл) + гликопротеин 5% (0.5 мл) + сапонин 3% (1 мл) + лецитин (3 капли*) + <i>p</i> -кумаровая кислота 5% (спиртовой раствор, 2 мл) + омега-3 жирные кислоты (4 капли) + ванилиновая кислота 1% (спиртовой раствор, 10 капель) + стеариновая кислота 1% (4 drops)	5Т**	Рис. 9а, 9б
2	<i>Двухэтапный эксперимент:</i> Каллоза 3% (водный коллоидный раствор, 2 мл) + гипромелдоза 3% (водный раствор, 2 мл) + лецитин (0.5 мл) + кофейная кислота 1% (0.5 мл) + олеиновая кислота (чистая, 5 капель) + ванилиновая кислота (1% спиртовой раствор, 5 капель) + стеариновая кислота (1% спиртовой раствор, 5 капель) <i>Через 4 дня добавлено:</i> Каллоза 3% (водный коллоидный раствор, 2 мл) + гипромелдоза (3% водный раствор, 1 мл) + муцин 1% (водный раствор, 1 мл) + сапонин 3% (водный раствор, 0.5 мл) + лецитин (0.5 мл) + <i>p</i> -кумаровая кислота 5% (спиртовой раствор, 6 капель) + олеиновая кислота (чистая, 2 капли) + ванилиновая кислота (1% спиртовой раствор, 3 капли) + стеариновая кислота (1% спиртовой раствор, 5 капель)	3 + 3Т	Рис. 9в
3	Каллоза 3% (водный коллоидный раствор, 2 мл) + гипромелдоза (5% водный раствор, 2 мл) + муцин (3% водный раствор, 1 мл) + сапонин (3% водный раствор, 2 мл) + <i>p</i> -кумаровая кислота 5% (спиртовой раствор, 10 капель) + лецитин (4 капли) + омега-3 жирные кислоты (4 капли) + ванилиновая кислота (1% спиртовой раствор, 6 капель)	8	Рис. 9г
4	Каллоза 3% (водный коллоидный раствор, 2 мл) + гипромелдоза (3% водный раствор, 2 мл) + муцин (3% водный раствор, 1 мл) + сапонин (3% водный раствор, 1 мл) + <i>p</i> -кумаровая кислота (5% спиртовой раствор, 0.5 мл) + лецитин (0.5 мл) + олеиновая кислота (чистая, 10 капель) + ванилиновая кислота (1% спиртовой раствор, 10 капель) + стеариновая кислота (1% спиртовой раствор, 10 капель)	5-10Т	Рис. 10а, 10б, 10в
5	Каллоза 3% (водный коллоидный раствор, 2 мл) + гипромелдоза (3% водный раствор, 2 мл) + сапонин (3% водный раствор, 1 мл) + <i>p</i> -кумаровая кислота (5% спиртовой раствор, 0.5 мл) + лецитин (4 drops) + омега-3 жирные кислоты (4 капли) + ванилиновая кислота (1% спиртовой раствор, 10 капель)	10	Рис. 10г
	* 1 капля = 0.04 мл		
	** Все смеси, отмеченные буквой “Т”, были приготовлены в тонком слое (0.4 мм), остальные – в более толстом (2–3 мм) перед конденсацией		

(Gabaeva, Grigoreva, 2016). Небольшие кусочки сухих пленок фиксировали в растворе 3% глутаральдегида и 2.5% сахарозы на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.3) с добавлением 1% танниновой кислоты. Материал постфиксировали 2%-ным тетроксидом осмия (рН 8.0, 2 ч). После обезвоживания в серии спиртов образцы инкубировались в смеси ацетона с заливочной средой Epon-Araldite,

затем в чистой заливочной среде Epon-Araldite. Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным раствором уранилацетата в этаноле и 0.2% цитратом свинца. Срезы исследовали с помощью электронного микроскопа Hitachi-600.

В этих *in vitro* экспериментах был смоделирован целый ряд структур, весьма схожих по своей

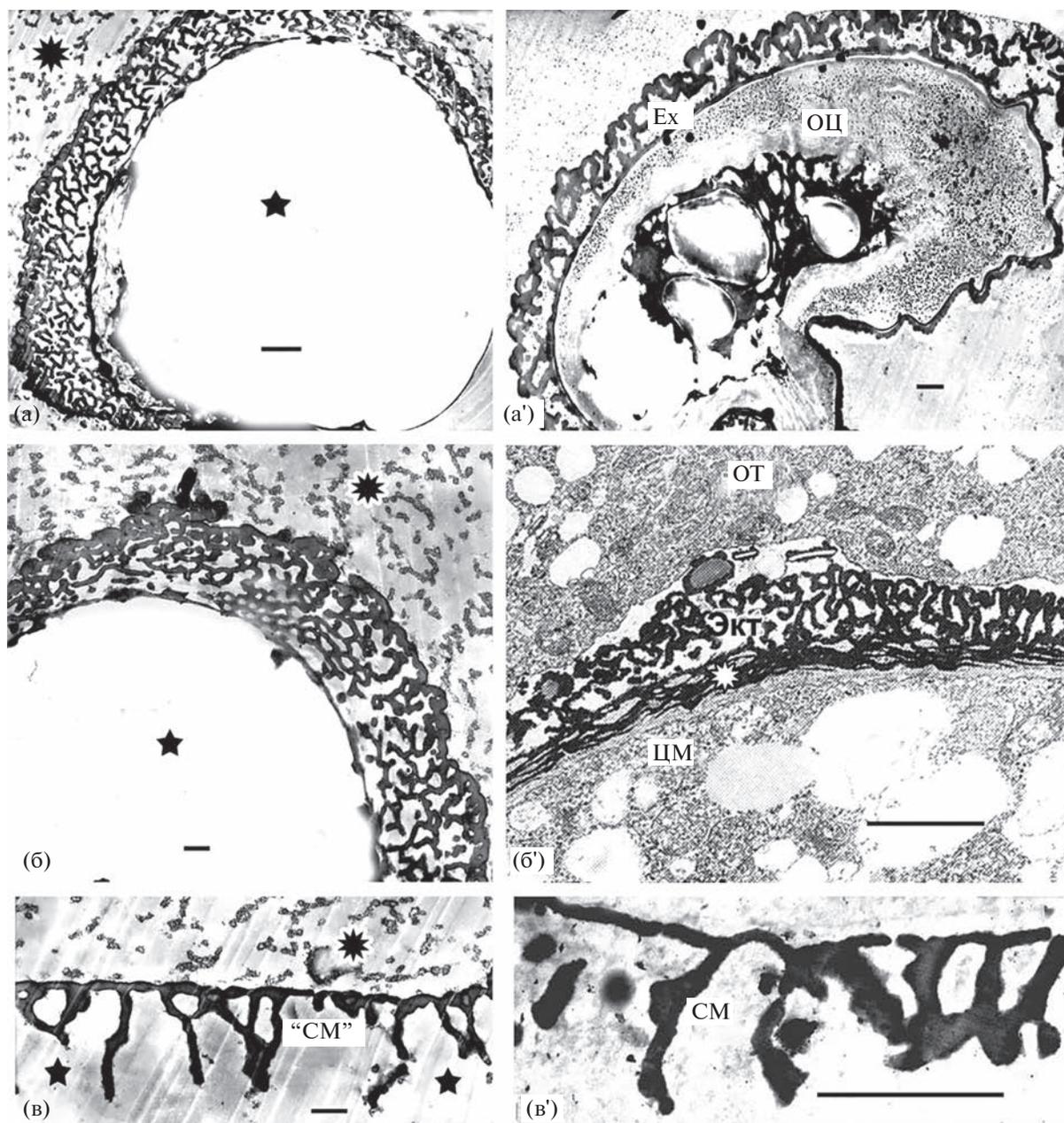


Рис. 8. Модели (а–в), симулирующие альвеолярные структуры экзины пыльцевых зерен *Pinus sylvestris* (а'–в'). (а) Симулянт с альвеолярно-подобной оболочкой, сформированной на поверхности липидной капли. (а') Пыльцевое зерно *P. sylvestris* с альвеолярной экзиной (из гербарного материала). (б) Модель, симулирующая экзину *Pinus sylvestris*. (б') Экзина *Pinus sylvestris* (астериск: эндэксина). (в) Симулянт стенки пыльцевого мешка (“СМ”) *Pinus sylvestris*. (в') Стенка пыльцевого мешка (СМ) *Pinus sylvestris*. ОЦ остатки цитоплазмы, ЦМ цитоплазма микроспоры. Концентрированная фаза (астериски), истощенная фаза (звездочки) в результате фазового разделения. Масштабные линейки: (а, а') – 2 мкм; (б, б', в, в') – 1 мкм. На рис. 8 воспроизведены: Fig. 5 from the paper of Gabarayeva et al., “Artificial pollen walls simulated by the tandem processes of phase separation and self-assembly in vitro”, *New Phytologist*, 2019, 225: 1956–1973 from Permission and License Number 5491290930469 of John Wiley and Sons.

ультраструктуре с основными типами эктэкзины и ламеллярной эндэкзины в ходе их развития (рис. 9, 10).

Модели, показанные на рис. 9а–9в, симулируют гранулярную эктэкзину и ламеллярную эндэкзину с типичными “белыми линиями”, наблюдаемыми

у голосеменных, например у *Larix decidua* (рис. 9а', 9б', 9в'). Симуляты, полученные из смеси № 1 (рис. 9а, 9б), подобны гранулярной эктэкзине *Larix* (рис. 9а', 9б', 9в'). Наличие фазового разделения очевидно на рис. 9б, где сформированы истощенный (звездочка) и конденсированный (астериск)

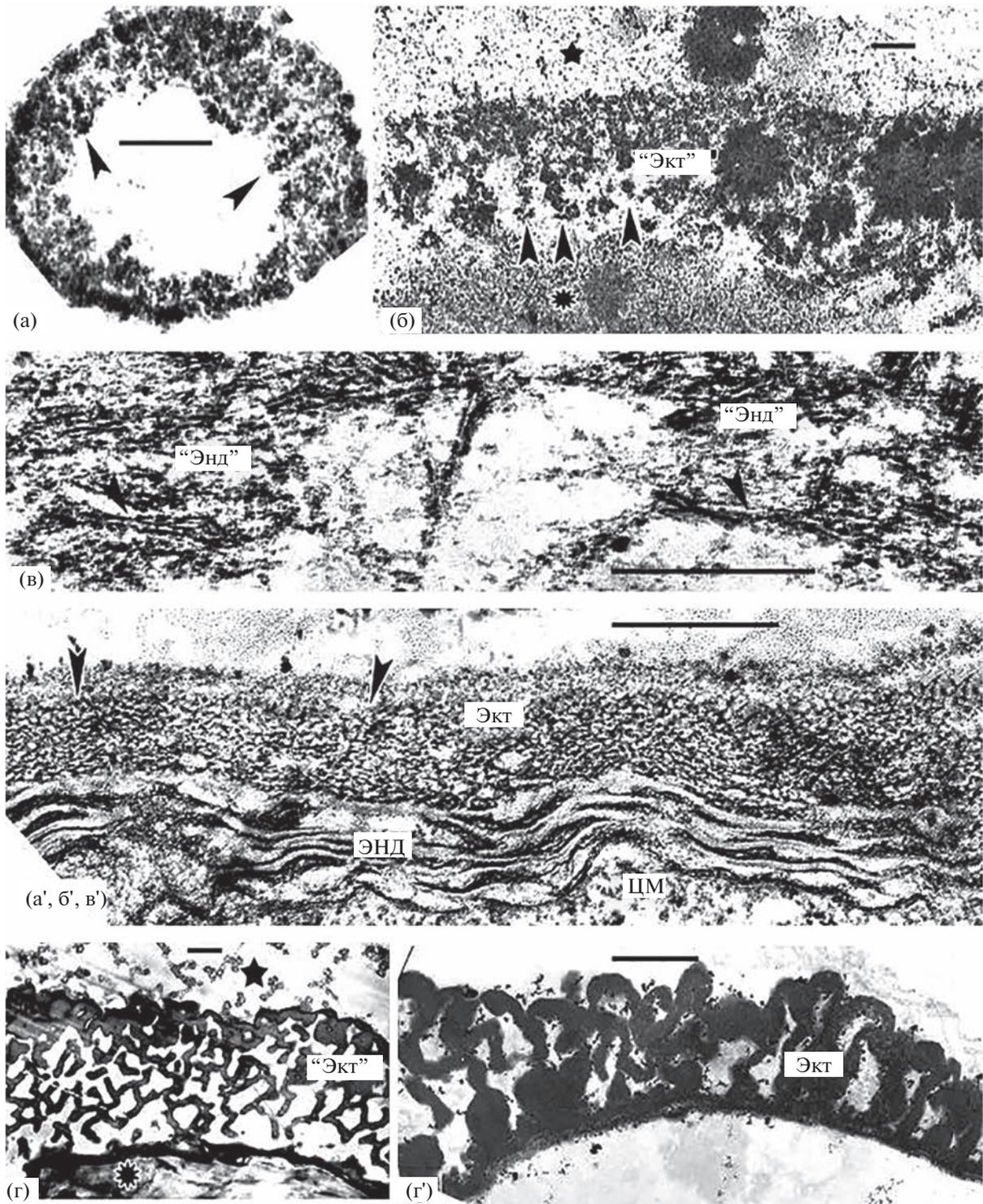


Рис. 9. Модели (симуляты), полученные с использованием смесей № 1–3 (а–г), симулирующие гранулярную (а', б', в') и альвеолярную (г') экзину (оригинальные данные). (а) Симулянт, подражающий гранулярной эктэкзине. (б) Модель оболочки микроспоры, состоящей из колонок сферических мицелл (*головки стрелок*). Концентрированный (*астериск*) и истощенный (*звездочка*) домены после фазового разделения. (в) Симуляты (ламеллярные мицеллы), сходные с ламеллярной эндэкзиной многих видов, с ее типичными “белыми линиями” (зазоры между бислоями мицелл). (а', б', в') Оболочка пыльцевого зерна *Larix decidua* с гранулярной эктэкзиной (Экт, *головки стрелок*) и ламеллярной эндэкзиной (Энд). (г) Модель, симулирующая альвеолярную эктэкзину. Конденсированный (*астериск*) и истощенный (*звездочка*) домены после фазового разделения. (г') Альвеолярная эктэкзина *Pinus sylvestris*. Масштабные линейки: (а) – 0.1 мкм; (б, в, а', б', в') – 0.5 мкм; (г, г') – 1 мкм.

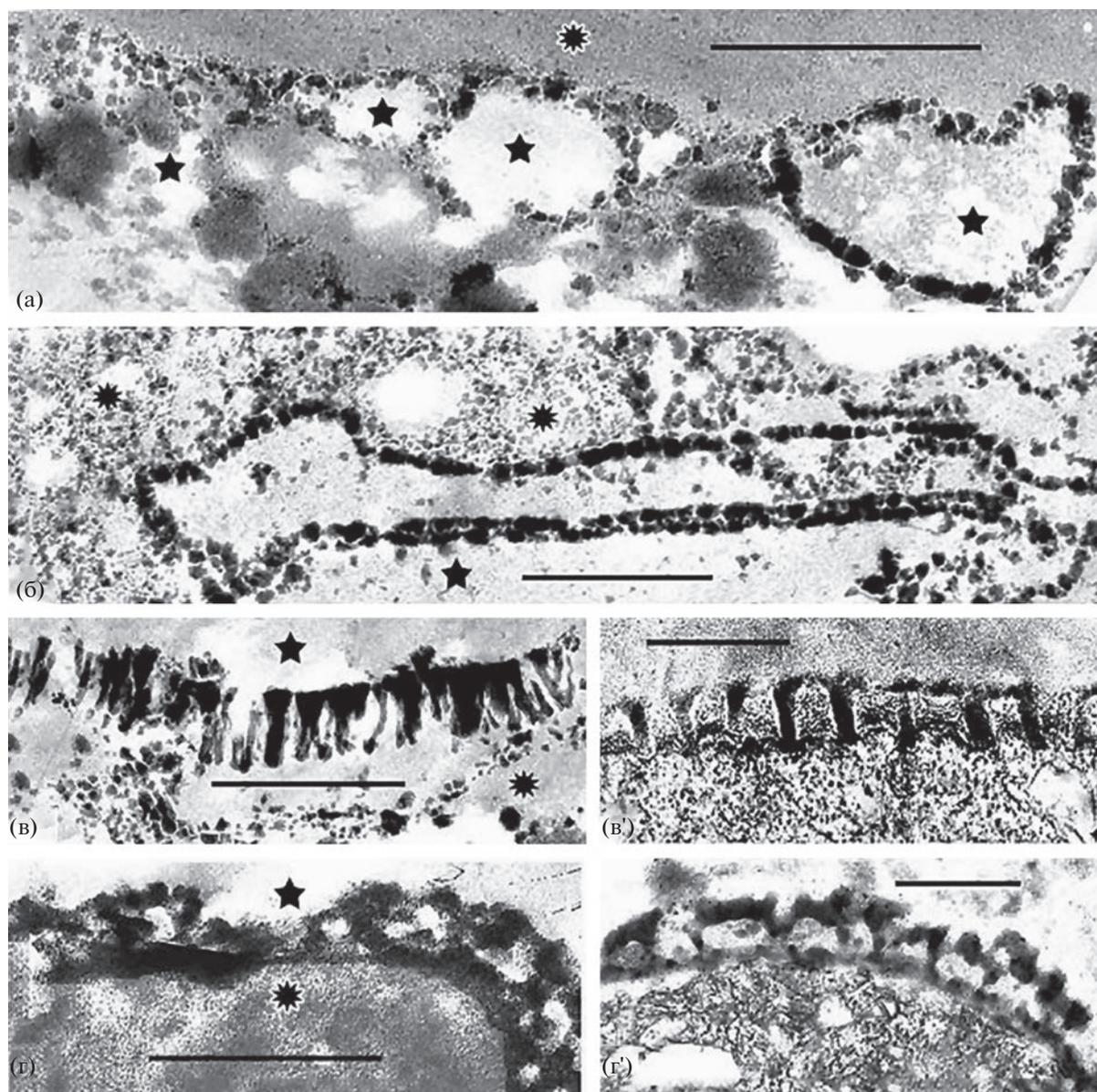


Рис. 10. Модели, полученные с использованием смесей № 4 и № 5, симулирующие развитие колумеллярной экзины (оригинальные данные). (а–в) Серия симулятов, полученных из смеси 4, возникла на поверхности раздела конденсированного (гидрофобного – *астериск*) и истощенного (гидрофильного – *звездочки*) доменов. (а) 5 дней до фиксации образца. Каскад везикуло-подобных объемов возник в результате фазового разделения и мицеллярной самоорганизации: сферические мицеллы появились вдоль поверхности везикул. Слева направо: колонки сферических мицелл постепенно перестраиваются в короткие цилиндрические мицеллы. (б) 7 дней до фиксации образца. После слияния везикулярных объемов, удлиненная везикула окружена короткими цилиндрическими мицеллами. (в) 10 дней до фиксации. Модель, сходная с примэкзиной, формирующейся на поздней тетрадной стадии у многих видов растений. (в') Примэкзина *Calycanthus floridus* в конце тетрадного периода. (г) Модель, полученная из смеси 5 (10 дней до фиксации), симулирует колумеллярную примэкзину на стадии распадающейся тетрады у ряда видов растений. (г') Примэкзина *Chamaedorea microspadix* на стадии распадающейся тетрады. Масштабные линейки 0.5 мкм.

слои. Паттерн, подражающий гранулярной эктэкзине, сформирован на границе раздела вышеуказанных слоев (рис. 9б, “Экт”). Гранулы, которые являются сферическими мицеллами (рис. 9а, 9б, *головки стрелок*), собраны в колонки подобно гранулам экзины *Larix* (рис. 9а', 9б', 9в', *головки стрелок*).

Структуры, полученные из смеси № 2, представляют собой ламинатные мицеллы с типичными просветами между бислоями (рис. 9в, *головки стрелок*). Эта структура симулирует ламеллярную эндэкзину у *Larix* (рис. 9а', 9б', 9в') с типичными “белыми линиями”, которые соответствуют про-

светам между ламинатными мицеллами, видны на рис. 9в.

Другой паттерн, полученный из смеси № 3 (рис. 9г), симулирует альвеолярную экзину, например, эктэксину *Pinus sylvestris* (рис. 9г'). Эта структура возникла также на поверхности раздела между истощенным (рис. 9г, *звездочка*) и конденсированным слоем (рис. 9г, *астериск*) подобьями в результате фазового разделения.

На рис. 10 показаны симуляты колумеллятной эктэксина в процессе развития. Эти модели (рис. 10а–10в) были получены из смеси № 4 и зафиксированы через 5, 7 и 10 дней после начала эксперимента. Первый паттерн, полученный после 5-ти дней конденсации на границе раздела гидрофобного (рис. 10а, *астериск*) и гидрофильного (рис. 10а, *звездочки*) доменов, представляет собой серию пузыревидных пространств. После фазового разделения сферические мицеллы окружают пузыревидные домены. Заметно постепенное увеличение размера мицелл (слева направо): от колонок мелких сферических мицелл до более крупных, переходящих в короткие цилиндрические мицеллы (рис. 10а). 7-дневный эксперимент показал слияние нескольких пузыревидных доменов в один удлиненный (рис. 10б), сходный с колумеллятными примэксинами многих видов. Структура, полученная после 10 дней конденсации (рис. 10в), представляет собой ряд типичных цилиндрических мицелл, которые симулируют колумеллятную примэксину многих видов покрытосеменных, например у *Calycanthus floridus* на поздней тетрадной стадии (рис. 10в'). Цилиндрические мицеллы (рис. 10в) являются основой проколумелл после аккумуляции спорополленина.

Модель, полученная из смеси № 5 (рис. 10г), симулирует колумеллятную экзину, характерную для стадии молодых свободных микроспор многих видов покрытосеменных. Сходство очевидно, например, с молодой экзиной *Chamaedorea microspadix* (рис. 10г').

Из наших экспериментов – этих и проведенных ранее – ясно, что фазовое разделение, описанное как процесс, лежащий в основе возникновения паттернов экзины (Lavrentovich et al., 2016; Radja et al., 2019), действует вместе с процессом мицеллярной самоорганизации. Было отмечено (Radja, 2020), что паттерны пыльцевой оболочки могут быть использованы как модель для биологической самоорганизации и были указаны будущие направления действий в этой области.

В ходе естественного развития экзины, после того, как за счет экспрессии генома и целого каскада биохимических реакций определяется состав сурфактантов и их концентрации в периплазматическом пространстве микроспор, фазовое разделение и мицеллярная самоорганизация (и, возможно, еще какие-то пока неучтенные физические

процессы) подхватывают инициативу и доводят развитие экзины до финальной точки (см. схему и подписи к ней на Fig. 6 в статье Gabarayeva, Grigorieva, 2021).

А. Hemsley и я считаем (личные сообщения), что в целом генерация паттернов является скорее свойством коллоидных веществ, чем зависит от видео-специфичных материалов экзины, определяемых геномом каждого из видов растений. Иначе было бы невозможно получить экзино-подобные паттерны простым смешиванием веществ в ходе эксперимента *in vitro*. Образование паттерна зависит от условий внутри пыльника/спорангия, где коллоидные вещества являют свой полный потенциал. Это объясняет, например, недавно обнаруженный поразительный колумелло-подобный паттерн на поверхности тапетальных клеток (!) в отклонившихся от нормального пути развития пыльниках *Symbalaria muralis* (Polevova et al., 2022, см. Fig. 4), где нормальный баланс коллоидных строительных веществ экзины был, по-видимому, нарушен. Другие примеры – появление ламелл с “белыми линиями”, основанных на ламинатных мицеллах, лежащих свободно в локусе пыльника у ряда видов, например у *Plantago major* (Gabarayeva et al., 2017, см. Fig. 15A) и у *Symbalaria muralis* (Polevova et al., 2022, см. Fig. 7). Признаки фазового разделения и белых линий в орбикулах и в сгущениях полленкитта были описаны у многих видов, например, у магнолиид (Gabarayeva, Grigorieva, 2012, см. Fig. 11F) и видов *Apiaceae*, хотя в то время были описаны автором как артефакты (Weber, 1992, см. Fig. 8). Равным образом, коллоидные вещества проявляют свой потенциал в наших предшествующих и настоящем экспериментах по моделированию *in vitro*: хотя влияние генома полностью отсутствовало, высокая паттерно-генерирующая способность этих веществ позволила симулировать все известные экзино-подобные ультраструктуры за счёт действия физических сил.

ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Анализ имеющихся данных указывает на универсальный характер механизмов, лежащих в основе развития оболочки пыльцы.

Для развития оболочки мужского гаметофита недостаточно регуляции на уровне генома. На уровне генома определяются начальные условия формирования оболочки пыльцы, т.е. контролируются специфические для видов пропорции веществ-сурфактантов, продуцируемых в цитоплазме микроспор, особенно в ключевом тетрадном периоде. Затем физические процессы, такие как фазовое разделение и мицеллярная самоорганизация, действуя в тандеме, активизируются и доводят процесс до конца. Главными событиями развития экзины в посттетрадном периоде являются формирование

эндэкины и массовая аккумуляция мономеров спорополленина, синтезированных в тапетуме.

Интердисциплинарные усилия, приложенные в обеих сферах — в тщательно проведенном прослеживании всех стадий развития на ультраструктурном уровне и в области коллоидной физической химии — способны пролить новый свет на хорошо известные факты. Они перспективны в отношении поддержки теоретических гипотез и дают более глубокое понимание морфогенеза.

Этот обзор показывает, что наблюдается удивительное сходство в возникающих структурах в ходе развития оболочек пыльцевых зерен в отдаленных таксонах, особенно в тетрадном и раннем пост-тетрадном периоде. Более того, простые коллоидные смеси, без какого-либо генетического контроля, способны самоорганизовываться в искусственные оболочки, имитирующие натуральные. Становится все более очевидным, что эти рефрены возникают путем неких фундаментальных физических процессов, объясняющих многократное повторение способов онтогенеза в природе (Meyen, 1978; Pozhidayev, 1993; 1995; 1998; 2000; 2002; Chaikovsky, 2018; Pozhidaev, Petrova, 2023).

В будущем необходимо достичь более полного понимания того, как дифференциальная экспрессия генома взаимодействует с физическими процессами в ходе онтогенеза. Конечная цель — понять, как эта сложная сеть взаимодействий создает наблюдаемое разнообразие ультраструктуры оболочки пыльцы, и как это разнообразие возникло в эволюции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я благодарю всех моих соавторов ранее опубликованных работ: В.В. Григорьеву, Я. Косенко, С.В. Полево-ву, А.Л. Шаварду, S. Blackmore, G. El-Ghazaly, A.R. Hemsley, S.J. Hiscock, M.O. Lavrentovich, S.E.M. Moore, J.R. Rowley. Особая благодарность — Stephen Blackmore (Стиву Блэмо) за проверку англоязычной версии и многие советы по рукописи. Я благодарю моих анонимных рецензентов за взятый на себя труд по прочтению рукописи и важные поправки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа поддержана инициативным грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 20-04-00174а (руководить Н.И. Габараева) и проводилась с использованием оборудования Центра “Клеточные и Молекулярные Технологии в Науках о Растениях” Ботанического института РАН им. В.Л. Комарова (Санкт-Петербург).

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 АВТОРА

Автор статьи написала данный обзор, задумала и разработала новый эксперимент, описанный в данной статье, синтезировала образцы и провела их ультраструктурное исследование с помощью ТЭМ. Автором обобщены все данные и текст статьи подготовлен к представлению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Габараева Н.И.* Гипотетические пути детерминации структуры экзины // Ботанический журн. 1990. Т. 75. С. 1353–1362 (с аннотацией на английском).
- Фридрихсберг Д.А.* Коллоидная химия. Санкт-Петербург: Химия, 1995 (2010 – 2е изд.). 416 с.
- Герасимова-Навашина Е.Н.* Физико-химическая природа формирования примэкины пыльцевых зерен покрытосеменных // В: Коварский А. (Ред.). Эмбриология покрытосеменных. Кишинев: Штиинца, 1973. Р. 57–70.
- Ariizumi T., Hatakeyama K., Hinata K. et al.* Disruption of the novel plant protein NEF1 affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen, resulting in male sterility in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2004. V. 39. P. 170–181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2004.02118.x>
- Ariizumi T., Hatakeyama K., Hinata K. et al.* The HKM gene, which is identical to the MS1 gene of *Arabidopsis thaliana*, is essential for primexine formation and exine pattern formation // Sex Plant Reprod. 2005. V. 18. P. 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00497-005-0242-3>
- Ariizumi T., Toriyama K.* Genetic regulation on sporopollenin synthesis and pollen exine development // Ann. Rev. Plant Biol. 2011. V. 62. P. 1–24. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809->
- Ball P.* Designing the Molecular World. Princeton: Princeton University Press, 1994. 384 p.
- Benítez M.* An interdisciplinary view on dynamic models for plant genetics and morphogenesis: scope, examples and emerging research avenues // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00007>
- Blackmore S., Wortley A.H., Skvarla J.J., Rowley J.R.* Pollen wall development in flowering plants // New Phytol. 2007. V. 174. P. 483–498. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02060>
- Blackmore S., Wortley A.H., Skvarla J.J., Gabarayeva N.I., Rowley J.R.* Developmental origins of structural diversity in pollen walls of Compositae // Plant Syst. Evol. 2010. V. 284. P. 17–32. <https://doi.org/10.1007/s00606-009-0232-2>
- Blackmoore S., Skvarla J.J.* John Rowley (1926–2010), palynologist extraordinaire // Grana. 2012. V. 51. № 2. P. 77–83. <https://doi.org/10.1080/00173134.2012.661454>

- Bray D.* Model for membrane movements in the neural growth cone // *Nature*. 1973. V. 244. P. 93–96. <https://doi.org/10.1038/244093a0>
- Chaikovskiy J.V.* (2018) Autopoiesis. Society of scientific editions KMK, Moscow (In Russian: Chaikovskiy J.V. Avtopoez).
- Meyen S.V.* (1984) Basic features of gymnosperm systematics and phylogeny as evidenced by the fossil record. *Bot Rev* 50. <https://doi.org/10.1007/BF02874305>
- Coen E.S., Meyerowitz E.M.* The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development // *Nature*. 1991. V. 353. P. 31–37. <https://doi.org/10.1038/353031a0>
- Curantz C., Manceau M.* Trends and variation in vertebrate patterns as outcomes of self-organization // *Current Opinion in Genetics & Development*. 2021. V. 1(69). P. 147–153.
- Dickinson H.G., Sheldon J.M.* The generation of patterning at the plasma membrane of the young microspore of *Lilium* // In: Blackmore S., Ferguson I.K. (eds.) *Pollen and Spores: form and function*. London: Academic Press. pp. 1–18.
- Dobritsa A.A., Geanconteri A., Shrestha J. et al.* A Large-scale genetic screen in *Arabidopsis* to identify genes involved in pollen exine production // *Plant Physiol.* (Lancaster). 2011. V. 157, P. 947–970. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179523>
- Dobritsa A.A., Coerper D.* The novel plant protein INAPERTURATE POLLEN1 marks distinct cellular domains and controls formation of apertures in the *Arabidopsis* pollen exine // *Plant Cell*. 2012. V. 24. P. 4452–4464. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.101220>
- Dong X.Y., Hong Z.L., Sivaramakrishnan M. et al.* Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis* // *Plant J*. 2005. V. 42. P. 315–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02379.x>
- Gabarayeva N.I.* Hypothetical ways of exine pattern determination // *Grana*. 1993. V. 33. P. 54–59. <https://doi.org/10.1080/00173139309428980>
- Gabarayeva N.I., Grigorjeva V.V.* Exine development in *Encephalartos altensteinii* (Cycadaceae): ultrastructure, substructure and the modes of sporopollenin accumulation // *Rev. Palaeobot. Palynol.* 2004. V. 132. P. 175–193. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2004.05.005>
- Gabarayeva N.I., El-Ghazaly G.* Sporoderm development in *Nymphaea mexicana* (Nymphaeaceae). *Plant Syst. Evol.* 1997. V. 204. P. 1–19.
- Gabarayeva N.I., Grigorjeva V.V.* Exine development in *Stangeria eriopus* (Stangeriaceae): ultrastructure and substructure, sporopollenin accumulation, the equivocal character of the aperture, and stereology of microspore organelles // *Rev. Palaeobot. Palynol.* 2002. V. 122. P. 185–218. [https://doi.org/10.1016/S0034-6667\(02\)00183-5](https://doi.org/10.1016/S0034-6667(02)00183-5)
- Gabarayeva N.I., Grigorjeva V.V.* Sporoderm ontogeny in *Chamaedorea microspadix* (Arecaceae). Self-assembly as the underlying cause of development // *Grana*. 2010. V. 49. P. 91–114. <https://doi.org/10.1080/00173131003650920>
- Gabarayeva N.I., Grigorjeva V.V.* Sporoderm development in *Swida alba* (Cornaceae), interpreted as a self-assembling colloidal system // *Grana*. 2011. V. 50. P. 81–101. <https://doi.org/10.1080/00173134.2011.580448>
- Gabarayeva N.I., Hemsley A.R.* Merging concepts: The role of self-assembly in the development of pollen wall structure // *Rev. Palaeobot. Palynol.* 2006. V. 138. P. 121–139. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2005.12.001>
- Gabarayeva N.I., Grigorjeva V.V., Rowley J.R., Hemsley A.R.* Sporoderm development in *Trevesia burckii* (Araliaceae). I. Tetrad period: further evidence for the participation of self-assembly processes // *Rev. Paleobot. Palynol.* 2009. V. 156. № 1–2. P. 211–232. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2008.12.001>
- Gabarayeva N.I., Grigorjeva V.V., Rowley J.R.* Sporoderm development in *Acer tataricum* (Aceraceae). An interpretation // *Protoplasma*. 2010a. V. 247. P. 65–81. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0141-9>
- Gabarayeva N.I., Grigorjeva V.V., Rowley J.R.* A new look at sporoderm ontogeny in *Persea americana*. Micelles and the hidden side of development // *Ann. Bot.* 2010b. V. 105. P. 939–955. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq075>
- Gabarayeva N.I., Grigorjeva V.V., Polevova S.V.* Exine and tapetum development in *Symphytum officinale* (Borraginaceae). Exine substructure and its interpretation // *Plant Syst. Evol.* 2011. V. 296. P. 101–120.
- Gabarayeva N., Grigorjeva V.* Sporoderm development and substructure in *Magnolia sieboldii* and other *Magnoliaceae*: an interpretation // *Grana*. 2012. V. 51. P. 119–147. <https://doi.org/10.1080/00173134.2012.688863>
- Gabarayeva N.I., Grigorjeva V.V., Kosenko Y.V.* Primexine development in *Passiflora racemosa* Brot. Overlooked aspects of development // *Plant Syst. Evol.* 2013. V. 299. P. 1013–1035.
- Gabarayeva N., Grigorjeva V., Polevova S.* Sporoderm and tapetum ontogeny in *Juniperus communis* (Cupressaceae). Connective structures between tapetum and microspores // *Rev. Palaeobot. Palynol.* 2014a. V. 206. P. 23–44.
- Gabarayeva N., Grigorjeva V.* Sporoderm and tapetum development in *Eupomatia laurina* (Eupomatiaceae). An interpretation // *Protoplasma*. 2014b. V. 251. P. 1321–1345. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0631-2>
- Gabarayeva N., Grigorjeva V.* Simulation of exine patterns by self-assembly // *Plant Syst. Evol.* 2016. V. 302. P. 1135–1156. <https://doi.org/10.1007/s00606-016-1322-6>
- Gabarayeva N., Grigorjeva V., Polevova S., Hemsley A.R.* Pollen wall and tapetum development in *Plantago major* L. (Plantaginaceae): assisting self-assembly // *Grana*. 2016. V. 56. № 2. P. 81–111. <https://doi.org/10.1080/00173134.2016.1159729>
- Gabarayeva N.I., Grigorjeva V.V.* An integral insight into pollen wall development: involvement of physical processes in exine ontogeny in *Calycanthus floridus* L., with an experimental approach // *Plant J*. 2021. V. 105. P. 736–753. <https://doi.org/10.1111/tpj.15070>

- Gabarayeva N.I., Polevova S.V., Grigorjeva V.V., Blackmore S.* Assembling the thickest plant cell wall: exine development in *Echinops* (Asteraceae, Cynareae) // *Planta*. 2018. V. 248. P. 323–346.
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2902-1>
- Gabarayeva N.I., Grigorjeva V.V., Shavarda A.L.* Mimicking pollen and spore walls: self-assembly in action // *Ann. Bot.* 2019. V. 123. P. 1205–1218.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcz027>
- Gabarayeva N.I., Grigorjeva V.V., Lavrentovich M.O.* Artificial pollen walls simulated by the tandem processes of phase separation and self-assembly *in vitro* // *New Phytol.* 2020. V. 225. P. 1956–1973.
<https://doi.org/10.1111/nph.16318>
- Gabarayeva N.I., Polevova S.V., Grigorjeva V.V., Hiscock S.J.* Underlying mechanisms of development: pollen wall ontogeny in *Chloranthus japonicus* and a reconsideration of pollen ontogeny in early-diverging lineages of angiosperms // *Bot. J. Linn. Soc.* V. XX. P. 1–21.
<https://doi.org/10.1093/BOTLINNEAN/BOAA102>
- Gingell D.* Membrane permeability change by aggregation of mobile glycoprotein units // *J. Theor. Biol.* 1973. V. 38. P. 677–679.
- Grienenberger E., Kim S.S., Lallemand B. et al.* Analysis of TETRAKETIDE α -PYRONE REDUCTASE function in *Arabidopsis thaliana* reveals a previously unknown, but conserved, biochemical pathway in sporopollenin monomer biosynthesis // *Plant Cell*. V. 22. P. 4067–4083.
<https://doi.org/10.1105/tpc.110.080036>
- Grigorjeva V.V., Gabarayeva N.* Pollen wall ontogeny in *Polemonium caeruleum* (Polemoniaceae) and suggested underlying mechanisms of development // *Protoplasma*. 2018. V. 255. P. 109–128.
<https://doi.org/10.1007/s00709-017-1121-0>
- Grigorjeva V.V., Polevova S.V., Gabarayeva N.I.* Pollen wall development in *Hydrangea bretschneiderii* Dippel. (Hydrangeaceae): advanced interpretation through physical input, with *in vitro* experimental verification // *Protoplasma*. 2021. V. 258. № 2. P. 431–447.
<https://doi.org/10.1007/s00709-020-01571-4>
- Gubatz S., Herminghaus S., Meurer B., Strack D., Wiermann R.* The location of hydroxycinnamic acid amides in the exine of *Corylus* pollen // *Pollen & Spores*. 1986. V. 28. P. 347–354.
- Gunning B.E.S., Steer M.W.* *Plant cell biology: Structure and Function*. Jones & Bartlett Leasing, 1996. 120 p.
- Hamley I.* *Introduction to soft matter. Polymers, colloids, amphiphiles and liquid crystals*. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. 331 p.
- Hemsley A.R., Gabarayeva N.I.* Exine development: the importance of looking through a colloid chemistry “window” // *Plant Syst. Evol.* 2007. V. 263. P. 25–49.
<https://doi.org/10.1007/s00606-006-0465-2>
- Hemsley A.R.* Nonlinear variation in simulated complex pattern development // *J. Theor. Biol.* 1998. V. 192. P. 73–79.
<https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0610>
- Hemsley A.R., Collinson M.E., Brain A.P.R.* Colloidal crystal-like structure of sporopollenin in the megaspore walls of recent *Selaginella* and similar fossil spores // *Bot. J. Linn. Soc.* 1992. V. 108. P. 307–320.
- Hemsley A.R., Scott A.C., Barrie P.J., Chaloner W.G.* Studies of fossil and modern spore wall biomacromolecules using ¹³C solid state NMR // *Ann. Bot.* 1996. V. 78. P. 83–94.
<https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0099>
- Hemsley A.R., Griffiths P.C.* Architecture in the microcosm: biocolloids, self-assembly and pattern formation // *Phil. Trans. Royal Soc. London A*. 2000. V. 358. P. 547–564.
- Hemsley A.R., Lewis J., Griffiths P.C.* Soft and sticky development: some underlying reasons for microarchitectural pattern convergence // *Rev. Paleobot. Palenol.* 2004. V. 130. P. 105–119.
<https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2003.12.004>
- Herminghaus S., Gubatz S., Arendt S., Wiermann R.* The occurrence of phenols as degradation products of natural sporopollenin – a comparison with “synthetic sporopollenin” // *Zeit für Nat.* 1988. Bd 43c. P. 491–500.
- Heslop-Harrison J.* Pattern in plant cell walls: morphogenesis in miniature // *Proc. Roy. Inst. GB*. 1972. V. 45. P. 335–351.
- Hu J., Wang Z., Zhang L., Sun M.X.* The *Arabidopsis* Exine Formation Defect (EFD) gene is required for primexine patterning and is critical for pollen fertility // *New Phytol.* 2014. V. 203. P. 140–154.
<https://doi.org/10.1111/nph.12788>
- Ingber D.* Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton // *J. Cell. Sci.* 1993. V. 104. P. 613–627.
<https://doi.org/10.1242/jcs.104.3.613>
- Ingber D.E.* Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology // *J. Cell. Sci.* 2003a. V. 116. P. 1157–1173.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00359>
- Ingber D.E.* Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks // *J. Cell. Sci.* 2003b. V. 116. 1397–1408.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00360>
- Ingber D.E., Jamieson J.D.* Cells as tensegrity structures: architectural regulation of histodifferentiation by physical forces transduced over basement membrane. In: Andersson L.C., Gahmberg C.G., Ekblom P. (eds.), *Gene expression during normal and malignant differentiation*. Orlando, FL.: Academic Press, 1985. P. 13–32.
- Jia Q.S., Zhu J., Xu X.F., Lou Y., Zhang Z.L., Zhang Z.P., Yang Z.N.* *Arabidopsis* AT-hook protein TEK positively regulates the expression of arabinogalactan proteins for nexine formation // *Mol. Plant*. 2015. V. 8. P. 251–260.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.10.001>
- Kadzik R.S., Homa K.E., Kovar D.R.* F-actin cytoskeleton network self-organization through competition and cooperation // *Annual review of cell and developmental biology*. 2020. V. 6(36). P. 35–60.
- Kanaoka M.M., Shimizu K.K., Xie B. et al.* KOMPEITO, an atypical *Arabidopsis* rhomboid-related gene, is required for callose accumulation and pollen wall development // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 5959.
<https://doi.org/10.3390/ijms23115959>
- Kauffman S.A.* *The origin of order*. New York, Oxford: Oxford University Press, 1993. 709 p.
- Kim M.J., Kim M., Lee M.R. et al.* LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LDB) 10 interacts with SIDECAR POLLEN/LBD27 to control pollen develop-

- ment in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2015. V. 81. P. 794–809. <https://doi.org/10.1111/tpj.12767>
- Kurakin A.* Self-organization versus watchmaker: stochastic dynamics of cellular organization // *Biol. Chem.* 2005. V. 386. P. 247–254. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.030>
- Lavrentovich M.O., Horsley E.M., Radja A., Sweeney A.M., Kamien R.D.* First-order patterning transitions on a sphere as a route to cell morphology // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 5189–5194. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600296113>
- Lecuit T.* “Developmental mechanics”: cellular patterns controlled by adhesion, cortical tension and cell division // *HFSP J.* 2008. V. 2. P. 72–78. <https://doi.org/10.2976/1.2896332>
- Lecuit T., Lenne P.F.* Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 8. P. 633–644. <https://doi.org/10.1038/nrm2222>
- Lehmann O.* Flüssige Kristalle, sowie Plastizität von Kristallen im Allgemeinen, molekulare Umlagerungen und Aggregatzustandsänderungen. Leipzig: Engelmann, 1904. 267 p.
- Leibler S., Andelman D.* Ordered and curved meso-structures in membranes and amphiphilic films. *J. Phys. Paris.* 1987. V. 48. P. 2013–2018. <https://doi.org/10.1051/jphys:0198700480110201300>
- Li W., Liu Y., Douglas C.* Role of glycosyltransferases in pollen wall primexine formation and exine patterning // *Plant Physiol.* 2017. V. 173. P. 167–182. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00471>
- Li J., Yu M., Geng L.L., Zhao J.* The fasciclin-like arabinogalactan protein gene, FLA3, is involved in microspore development of *Arabidopsis* // *Plant J.* 2010. V. 64. P. 482–497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04344.x>
- Li F.S., Phyto P., Jacobowitz J. et al.* The molecular structure of plant sporopollenin // *Nat. Plants.* 2019. V. 5. P. 41–46. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0330-7>
- Lintilhac P.M.* The problem of morphogenesis: unscripted biophysical control systems in plants // *Protoplasma.* 2014. V. 251. P. 25–36. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0522-y>
- Liu L., Wang T.* Male gametophyte development in flowering plants: A story of quarantine and sacrifice // *J. Plant Physiol.* 2021. V. 258–259. P. 153365. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153365>
- Lou Y., Xu X.F., Zhu J., Gu J.N., Blackmore S., Yang Z.N.* The tapetal AHL family protein TEK determines nexine formation in the pollen wall // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3855. <https://doi.org/10.1038/ncomms4855>
- Mandelbrot B.B.* The Fractal Geometry of Nature. San Francisco: WH Freeman and Co., 1982. 460 p.
- Mi L., Mo A., Yang J. et al.* *Arabidopsis* novel microgametophyte defective mutant 1 is required for pollen viability via influencing intine development in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.814870>
- Moore S.E.M., Gabarayeva N., Hemsley A.R.* Morphological, developmental and ultrastructural comparison of *Osmunda regalis* L. spores with spore mimics // *Rev. Paleobot. Palynol.* 2009. V. 156. P. 177–184.
- Neto A., Salinas S.* The physics of lyotropic liquid crystals: Phase transitions and structural properties. Oxford: Oxford Science Publications, 2005. 320 p.
- Nishikawa S., Zinkl G.M., Swanson R.J., Maruyama D., Preuss D.* Callose (β -1, 3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth // *BMC Plant Biol.* 2005. V. 5. P. 22–30. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-22>
- Padmanaban S., Czerny D.D., Levin K.A. et al.* Transporters involved in pH and K⁺ homeostasis affect pollen wall formation, male fertility, and embryo development // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 3165–3178. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw483>
- Paxson-Sowders D.M., Owen H.A., Makaroff C.A.* A comparative ultrastructural analysis of exine pattern development in wild-type *Arabidopsis* and a mutant defective in pattern formation // *Protoplasma.* 1997. V. 198. P. 53–65.
- Paxson-Sowders D.M., Dodrill C.H., Owen H.A., Makaroff C.A.* Dex1, a novel plant protein, is required for exine pattern formation during pollen development in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2001. V. 127. P. 1739–1749. <https://doi.org/10.1104/pp.010517>
- Pettitt J.M.* Ultrastructure and cytochemistry of spore wall morphogenesis. In: *Dyer AF* (ed) *The experimental biology of ferns.* London, N.Y., San Francisco: Academic Press, 1979. P. 211–252.
- Pettitt J.M., Jermy A.C.* The surface coats on spores // *Biol. J. Linn. Soc.* 1974. V. 6. P. 245–257.
- Plourde S.M., Amom P., Tan M., Dawes A.T., Dobritsa A.A.* Changes in morphogen kinetics and pollen grain size are potential mechanisms of aberrant pollen aperture patterning in previously observed and novel mutants of *Arabidopsis thaliana* // *PLoS Comput. Biol.* 2019. V. 15. e1006800. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006800>
- Polevova S.V., Grigorjeva V.V., Gabarayeva N.I.* Pollen wall and tapetal development in *Cymbalaria muralis*: the role of physical processes, evidenced by in vitro modelling // *Protoplasma.* 2023. V. 260. P. 281–298. <https://doi.org/10.1007/s00709-022-01777-8>
- Pozhidaev A.E.* Polymorphism of pollen in the genus *Acer* (Aceraceae). Isomorphism of deviant forms of Angiosperm pollen. Grana. 1993. V. 32. P. 79–85. <https://doi.org/10.1080/00173139309429457>
- Pozhidaev A.E.* Pollen morphology of the genus *Aesculus* (Hippocastanaceae). Patterns in the variety of morphological characteristics. Grana. 1995. V. 34. P. 10–20. <https://doi.org/10.1080/00173139509429028>
- Pozhidaev A.E.* Hypothetical way of pollen aperture patterning. 1. Formation of 3-colpate patterns and endoaperture geometry. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 1998. V. 104. P. 67–83.
- Pozhidaev A.E.* Hypothetical way of pollen aperture patterning. 2. Formation of polycolpate patterns and pseudoaperture geometry. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 2000. V. 109. P. 235–254.
- Pozhidaev A.E.* Hypothetical way of pollen aperture patterning. 3. A family-based study of *Krameriaceae*. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 2002. V. 127. P. 1–23.

- Pozhidaev A.E., Petrova N.V.* Structure of variability of palynomorphological features within and beyond the genus *Galeopsis* L. Hjl. (Lamiaceae) in the context of divergent morphological evolution. *Biol. Bull. Rev.* 2023. V. 13. P. 63–80.
<https://doi.org/10.1134/S2079086423010061>
- Quilichini T.D., Grienerberger E., Douglas C.J.* The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: A tough case to crack // *Phytochemistry*. 2015. V. 113. P. 170–182.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.05.002>
- Radja A.* Pollen wall patterns as a model for biological self-assembly // *J. Exper. Zool. Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2020. V. 336. № 8. P. 629–641.
<https://doi.org/10.1002/jez.b.23005>
- Radja A., Horsley E.M., Lavrentovich M.O., Sweeney A.M.* Pollen patterns form from modulated phases // *Cell*. 2019. V. 176. P. 856–868.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.014>
- Regier J.C., Hatzopoulos A.K.* Evolution in steps: the role of regulatory alterations in the diversification of the moth chorion morphogenetic pathway. In: Varner J.E. (ed.) *Self-assembling architecture*. N.Y.: Alan R. Liss, 1988. P. 179–202.
- Reinitzer F.* Zur Kenntnis des Cholesterins // *Monatshefte*. 1888. V. 9. P. 421–441.
- Rowley J.R.* Implications on the nature of sporopollenin based upon pollen development. In: Brooks J., Grant P.R., Muir M.D., van Gijzel P., Shaw G. (eds.) *Sporopollenin*. London, N.Y.: Academic Press, 1971. P. 174–218.
- Rowley J.R.* Formation of pollen exine bacules and microchannels on a glycolyx // *Grana*. 1973. V. 13. P. 129–138.
- Rowley J.R.* Lipopolysaccharide embedded within the exine of pollen grains. In: Bailey G.W. (ed.) *33rd Ann Proc Electron Microscopy Soc. Amer. Las Vegas, 1975*. P. 572–573.
- Rowley J.R., Dahl A.O.* Pollen development in *Artemisia vulgaris* with special reference to glycolyx material // *Pollen Spores*. 1977. V. 19. P. 169–284.
- Scott R.J.* Pollen exine – the sporopollenin enigma and the physics of pattern. In: Scott R.J., Stead M.A. (eds.) *Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction*. Society for Experimental Biology Seminar Series 55. Cambridge: Univ. Press, 1994. P. 49–81.
- Skriven L.E.* Equilibrium bicontinuous structures. In: Mittal K.L. (ed), *Micellization, Solubilization, and Microemulsions 1, 2*. N.Y. & London: Plenum Press, 1977. P. 548–567.
- Sitte P.* Role of lipid self-assembly in subcellular morphogenesis. In *Cytomorphogenesis in plants*. In: Kiermayer O. (ed.) *Cell Biology Monographs 8*. Wien. N.Y.: Springer, 1981. P. 401–421.
https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8602-2_15
- Shapiro B.E., Tobin C., Mjolsness E., Meyerowitz E.M.* Analysis of cell division patterns in the *Arabidopsis* shoot apical meristem // *PNAS*. 2015. V. 112. P. 4815–4820.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1502588112>
- Sheldon J.M., Dickinson H.G.* Determination of patterning in the pollen wall of *Lilium henryi* // *J. Cell Sci*. 1983. V. 63. P. 191–208.
- Shellard A., Mayor R.* Sculpting with stiffness: rigidity as a regulator of morphogenesis // *Biochemical Society Transactions*. 2023. BST20220826.
- Shi J., Cui M., Yang L., Lim Y.J., Zhang D.* Genetic and biochemical mechanisms of pollen wall development // *Trends Plant Sci*. 2015. V. 20. P. 741–753.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.07.01>
- Stillman N.R., Mayor R.* Generative models of morphogenesis in developmental biology // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2023. V. 147. P. 83–90.
- Suzuki T., Narciso J., Zeng W. et al.* KNS4/UPEX1: A type II arabinogalactan β -(1,3)-galactosyltransferase required for pollen exine development // *Plant Physiol*. 2017. V. 173. P. 183–205.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01385>
- Schweigsuth F., Corson F.* Self-organization in pattern formation // *Developmental cell*. 2019. V. 49(5). P. 659–77.
- Tan W., Cheng S., Li Y. et al.* Phase separation modulates the assembly and dynamics of a polarity related scaffold-signaling hub // *Nat. Commun*. 2022. V. 13. P. 7181.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-35000-2>
- Taylor M.L., Hudson P.J., Rigg J.M. et al.* Pollen ontogeny in *Victoria* (Nymphaeales) // *Int. J. Plant Sci*. 2013. V. 174. P. 1259–1276.
<https://doi.org/10.1086/673246>
- Taylor M., Cooper R.L., Schneider E.L., Osborn J.M.* Pollen structure and development in Nymphaeales: insights into character evolution in an ancient angiosperm lineage // *Am. J. Bot*. 2015. V. 102. P. 1–18.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1500249>
- Taylor M.L., Altrichter K.M., Aeilts L.B.* Pollen ontogeny in *Ruppia* (Alismatidae) // *Int. J. Plant Sci*. 2018. V. 179. P. 217–230.
<https://doi.org/10.1086/696535>
- Thompson D.A.* *On growth and form*. Cambridge: University Press, 1917. 793 p.
- van Bergen P.F., Blokker P., Collinson M.E., Sinninghe Damsté J.S., de Leeuw J.W.* Structural biomacromolecules in plants: what can be learnt from the fossil record? In: Hemsley A.R., Poole I. (eds.) *The evolution of plant physiology*. Amsterdam: Academic Press, 2004. P. 134–154.
<https://doi.org/10.1016/B978-012339552-8/50009-3>
- Van Uffelen G.A.* The control of spore wall formation. In: Blackmore S., Barnes S.H. (eds.) *Pollen and spores: patterns of diversification*. Oxford: Clarendon Press, 1991. P. 89–102.
- Vignaud T., Blanchoin L., Théry M.* Directed cytoskeleton self-organization // *Trends in cell biology*. 2012. V. 22(12). P. 671–682.
- Wallace S., Fleming A., Wellman Ch.H., Beerling D.J.* Evolutionary development of the plant spore and pollen wall // *AoB PLANTS* plr027. 2011.
<https://doi.org/10.1093/aobpla/plr027>
- Wang R., Dobritsa A.* Exine and aperture patterns on the pollen surface: their formation and roles in plant reproduction // *Ann. Plant Rev.* 2018. V. 1. P. 1–40.
<https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0625>
- Wang R., Dobritsa A.* Loss of THIN EXINE2 disrupts multiple processes in the mechanism of pollen exine formation // *Plant Physiol*. 2021. V. 187. P. 133–157.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiab244>

- Wang R., Owen H.A., Dobritsa A.A. Dynamic changes in primexine during the tetrad stage of pollen development // *Plant Physiol.* 2021. kiab426.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiab426>
- Weber M. The formation of pollenkit in *Apium nodiflorum* (Apiaceae) // *Ann. Bot.* 1992. V. 70. P. 573–577.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088519>
- Wiermann R., Gubatz S. Pollen wall and sporopollenin // *Int. Rev. Cytol.* 1992. V. 140. P. 35–72.
- Wiermann R., Ahlers F., Schmitz-Thom I. Sporopollenin. In: Hofrichter M., Steinbüchel A. (eds.) *Biopolymers – Lignin, Humic Substances and Coal*, vol. 1. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. P. 209–227.
<https://doi.org/10.1002/3527600035.bpol1007>
- Wilmesmeier S., Wiermann R. Influence of EPTC (S-ethyl-dipropyl-thiocarbamate) on the composition of surface waxes and sporopollenin structure in *Zea mays* // *J. Plant Physiol.* 1995. V. 146. P. 22–28.
- Wilmesmeier S., Wiermann R. Immunocytochemical localization of phenolic compounds in pollen walls using antibodies against p-coumaric acid coupled to bovine serum albumin // *Protoplasma.* 1997. V. 197. P. 148–159.
- Wodehouse R.P. *Pollen grains: their structure, identification and significance in science and medicine.* N.Y.: McGraw-Hill Co. 1935.
- Xiong S.-X., Zeng Q.-Y., Hou J.-Q. et al. The temporal regulation of TEK contributes to pollen wall exine patterning // *PLoS Genet.* 2020. V. 16. № 5. e1008807.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008807>
- Xu M., Yan X., Wang Y. et al. ADAPTOR PROTEIN-1 complex-mediated post-Golgi trafficking is critical for pollen wall development in *Arabidopsis* // *New Phytol.* 2022. V. 235. P. 472–487.
<https://doi.org/10.1111/nph.18170>
- Zhang Z.B., Zhu J., Gao J.F. et al. Transcription factor AtMYB103 is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2007. V. 52. P. 528–538.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03254.x>

The Role of Physical Processes in Pollen Wall Morphogenesis: Hypothesis and Experimental Confirmation

N. I. Gabarayeva*

Komarov Botanical Institute of Russian Academy of Sciences, ul. Popova, 2, St. Petersburg, 197376 Russia

**e-mail: 1906ng@mail.ru*

The review is devoted to the analysis and generalization of modern knowledge about the mechanisms underlying the ontogeny of the male gametophyte envelope. New and earlier data on exine development are discussed, and recurrent phases in the development of exine of phylogenetically distant plant species are emphasized. Though exine formation has been shown to be dependent on plenty of genes, the reiteration of exine patterns in different plant species (e. g. columellate, granular, “white-lined” lamellae) suggests that these patterns are based on some non-biological principles of space-filling operations. However, mechanisms involved remained obscure until it became clear that the sequence of structures observed during exine development coincided with the sequence of self-assembling micellar mesophases. It was discovered later that another physical-chemical process – phase separation – participated in exine formation. To confirm that exine-like patterns are capable of generating *in vitro* by simple physical processes, and their formation does not require regulation at the genome level, some our and other authors’ *in vitro* experiments were undertaken; the data obtained are discussed. Several series of our new experiments on modeling exine development with mixtures of surface-active substances resulted in some patterns simulating the main types of natural exine. Transmission electron microscopy analysis of the samples has shown that patterns simulating the full range of exine types were obtained by joint action of phase separation and micellar self-assembly. The reconsideration and analysis of our and other authors’ morphogenetic and modeling data revealed that molecular-genetic mechanisms and physical forces work in tandem, with considerable input of physical processes.

Keywords: pollen wall development, physical forces, self-assembly, phase separation, micellar mesophases, modeling of morphogenesis

УДК 591.3

ТРАНСФОРМАЦИЯ СОСТОЯНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ В ХОДЕ МОРФОГЕНЕЗА ЭПИБЛАСТА МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. В. К. Абдыев^{а, *}, Е. В. Алпеева^а, Е. Н. Калистратова^б,
Е. А. Воротеяк^а, А. В. Васильев^{а, б}

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

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

*E-mail: maitovepa@gmail.com

Поступила в редакцию 27.07.2022 г.

После доработки 01.06.2023 г.

Принята к публикации 19.07.2023 г.

Плюрипотентный статус клетки *in vivo* имеет пространственно-временную регуляцию в рамках эмбриогенеза и обусловлен процессами самообновления, бесконечной пролиферации и дифференцировки во все типы клеток организма. Статус плюрипотентности был охарактеризован при исследовании клеток тератокарциномы, а затем это понятие было применено к эмбриональным клеткам преимплантационного эмбриона мыши. Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) мыши и человека образуются в преимплантационный период и присутствуют у эмбриона до начала гаструляции. Одно из основных событий раннего развития млекопитающих – разделение внутренней клеточной массы бластоцисты (ВКМ) на гипобласт и эпибласт, который дает начало собственно эмбриону. В ходе морфогенетических процессов, связанных с формированием эпибласта, состояния плюрипотентности его клеток трансформируются. Таким образом, клетки ВКМ бластоцисты эпигенетическим и транскрипционным паттернами отличаются от своих дочерних клеток пери/постимплантационного эпибласта. С началом гаструляционных движений созревание клеток эпибласта завершается их дифференцировкой в клетки трех зародышевых листков. В данном обзоре рассмотрены исторические аспекты изучения плюрипотентности клеток, различные источники ПСК, механизмы и сигнальные пути, поддерживающие самообновление и плюрипотентность клеток в культурах ПСК. Кроме того, мы обобщили данные о морфогенетических процессах, которые влияют на образование наивных клеток ВКМ *in vivo* и последующее созревание клеток эпибласта мыши и человека, связанное с трансформацией их состояний плюрипотентности.

Ключевые слова: эмбриогенез млекопитающих, морфогенез, ВКМ бластоцисты, эпибласт, BMP, FGF, WNT сигнальные пути, плюрипотентные стволовые клетки, ИПСК, ЭСК, наивные ПСК, праймированные ПСК, репрограммирование

DOI: 10.31857/S0475145023050026, **EDN:** KJFGAE

ВВЕДЕНИЕ

Плюрипотентность – это способность клеток дифференцироваться в производные трех зародышевых листков и первичные половые клетки (ППК). В ходе онтогенеза *in vivo* плюрипотентность является временным и трансформирующимся состоянием. В связи с этим плюрипотентные стволовые клетки (ПСК), полученные на разных догаструляционных стадиях развития из эмбриона человека и мыши, имеют разные свойства и разные состояния плюрипотентности. Существуют так называемые наивные, розеткоподобные, формативные и праймированные ПСК, которые отличаются эпигенетическим статусом, и, как следствие, профилем экспрессии, а также способностью дифференцироваться в различные типы клеток организма. Кроме

того, разные условия культивирования ПСК дают возможность переводить их из наивного в промежуточные и праймированное состояния или репрограммировать в обратном направлении. Так, основными признаками наивной плюрипотентности, в отличие от праймированной, является транскрипция гена *Oct4* с использованием дистального энхансера, сохранение неинaktivированного состояния второй X хромосомы в женских клетках, глобальное деметилирование ДНК, способность образовывать химеры. В искусственных условиях, воспроизводящих условия организма, возможно поддержание различных состояний плюрипотентности ПСК, а также репрограммирование более дифференцированных праймированных ПСК в наивные путем модулирования в них

сигнальных путей WNT и FGF2 при помощи генетических конструкций, малых молекул, РНК и другими способами. Основным отличием условий поддержания плюрипотентного состояния ПСК мыши и человека является независимость ПСК человека от активатора сигнального белка STAT3 фактора LIF (лейкемия ингибирующий фактор), необходимого для культивирования ПСК мыши.

Поиск молекулярных механизмов и сигнальных путей, модулирование которых можно использовать для поддержания ПСК, а также репрограммирования соматических клеток взрослого организма с получением индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) в культуре – чрезвычайно актуальная область исследований. Дело в том, что ПСК человека являются важной моделью для изучения дифференцировки клеток. Лимитированный доступ к эмбриональному материалу человека затрудняет исследование эмбриогенеза и отклонений, происходящих на ранних стадиях эмбрионального развития. Поэтому использование ПСК человека в качестве объекта дает возможность модулирования и изучения раннего развития человека *in vitro*.

Мы проанализировали информацию о механизмах динамично изменяющихся в развитии состояний плюрипотентности, а также о потенциале ПСК эмбриона человека и мыши дифференцироваться в зародышевые и внезародышевые производные. В настоящем обзоре будут рассмотрены источники и способы получения ПСК человека, динамика состояний плюрипотентности в развитии мыши и человека, а кроме того, её связь с морфогенетическими процессами, характерными для раннего эмбриогенеза млекопитающих.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Явления бесконечной пролиферации и симметричного деления в культуре, а также способность дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков эмбриона свойственны двум основным типам клеток: плюрипотентным раковым клеткам тератокарцином и ПСК (Chambers, Smith, 2004). Тератома – это образование, которое содержит клетки трех зародышевых листков разной степени дифференцированности в виде формирующейся неупорядоченным образом опухолевой массы, которая может быть доброкачественной (Andrews, 2002; Chambers, Smith, 2004; Damjanov, 1993; Damjanov, Andrews, 2016). Злокачественная тератома, тератокарцинома, содержит недифференцированные эмбриональные карциномные стволовые клетки и образует при трансплантации реципиенту злокачественную опухоль. Экспериментальные работы с тератомой были начаты

Стивенсом и Литтлом (Stevens, Little, 1954) на самцах мышей линии 129. В их исследованиях тератомы спонтанно возникали в семенниках примерно 1% самцов мышей линии 129. Также они могли быть вызваны трансплантацией гонады эмбрионов мыши 11–13 суток развития (данной и некоторых других линий) в семенники взрослых мышей (Stevens, 1970a, 1970b; Stevens, 1964). В норме на 11–13 сутки развития происходит заселение ППК в зачаток гонады, и пролиферация ППК в индифферентной гонаде. Далее, на 13 сутки, детерминируется пол мыши, начинается мейотическое деление ППК, и они становятся гаплоидными. Таким образом, предшественниками возникших тератом в семенниках мыши были ППК на стадии митотического деления, имеющие свойства стволовых клеток. Позднее было показано, что в результате дисбаланса между процессами пролиферации и дифференцировки (Pierce, 1980, 1983), начиная с 11 суток развития мышей, среди ППК происходит накопление стволовых клеток злокачественной тератокарциномы. Поэтому в экспериментах Стивенса и Литтла при пересадке гонады реципиентным животным у них могли образовываться злокачественные тератокарциномы.

Клетки тератокарциномы мыши культивировались *in vitro* на фидере из фибробластов и были названы эмбриональными карциномными клетками (ЭКК) (Finch, Ephrussi, 1967). ЭКК имели плюрипотентный статус. Различные подходы и методы, разработанные для оптимизации условий культивирования плюрипотентных ЭКК, были впоследствии применены для работы с клетками преимплантационного эмбриона, поскольку предполагалось, что эти клетки схожи друг с другом. При инъекции плюрипотентных ЭКК в бластоцисту мыши они не приживались в реципиенте и/или образовывали опухоль в пре/постнатальных эмбрионах (Papaioannou et al., 1978). Позднее были проведены эксперименты по пересадке в бластоцисты плюрипотентных клеток XY линий с нормальным кариотипом, выделенных из преимплантационного эмбриона. Оказалось, что клетки преимплантационного эмбриона, считавшиеся ранее тератокарциномными, в определенном окружении могут вести себя как нормальные эмбриональные клетки. Они были способны внедряться в эмбриональные ткани мыши-реципиента, а также дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков, в том числе в клетки половой линии, минуя образование тератомы и/или тератокарциномы (Bradley et al., 1984). В итоге стало понятно, что такие квази-карциномные клетки являлись клетками внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты и эпибласта (Chambers, Smith, 2004).

ИСТОЧНИКИ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

ПСК можно разделить на три категории в зависимости от источников и методов получения. Первая категория – это ПСК, выделенные из эмбриона: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) из ВКМ бластоцисты преимплантационного эмбриона мыши и человека (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson et al., 1998) и стволовые клетки из постимплантационного эпибласта (ЭпиСК) мыши на стадии E5.75 (Brons, et al., 2007; Tesar et al., 2007). Вторая категория – ПСК, полученные методом переноса соматического ядра в энуклеированный ооцит (Wilmot et al., 1997). Третья категория – ПСК, полученные методом репрограммирования соматических клеток с помощью ключевых факторов плюрипотентности (Takahashi, Yamanaka, 2006).

Эмбриональные стволовые клетки мыши

Развитие эмбриона млекопитающих можно разделить на два основных периода: пре- и постимплантационный. В преимплантационный период при дроблении зиготы бластомеры “выбирают” направление своего дальнейшего развития в двух точках бифуркации. Первая точка соответствует стадии 8 бластомеров, и в ней происходит разделение бластомеров на внутренние и наружные клетки (Nichols, Gardner, 1984). В результате клеточной сегрегации из внутренних клеток образуются клетки ВКМ бластоцисты, а из наружных – трофэктодерма (Ducibella, Anderson, 1975; Lim, Plachta, 2021). Вторая точка бифуркации соответствует разделению ВКМ на гипобласт (так называемую “первичную энтодерму” у мыши) и эпибласт. Эпибласт – это кластер эпителиальных зародышевых клеток, который дает начало собственно эмбриону (Gardner, Rossant, 1979; Muhr, Askerman, 2022). ВКМ бластоцисты является источником ЭСК (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981). Первые ЭСК, полученные от мыши, поддерживали в среде, кондиционированной клетками тератокарциномы (Johnson, Ziomek, 1981), или культивировали совместно с облученными эмбриональными фибробластами мыши (МЭФ) в обогащенной культуральной среде (Evans, Kaufman, 1981; Wobus et al., 1984). Позже было показано, что поддержание плюрипотентности *in vitro* зависит от фактора LIF (Gough et al., 1989; Smith et al., 1988). LIF принадлежит к семейству цитокинов интерлейкина-6 и связывается с гетеродимерным рецептором, состоящим из LIF-рецептора и gp130 (Niwa et al., 2009). Данный фактор действует на 3 основных внутриклеточных сигнальных пути: путь JAK-STAT3, который отвечает за самообновление, путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)-Akt, ответственный за пролиферацию и поддержание плюрипотентности, и путь митоген-активируемой

протеинкиназы (МАРК), который при активации приводит к пролиферации и дифференцировке ЭСК мыши (Ohtsuka et al., 2015). Посредством фосфорилирования транскрипционного фактора STAT3 через сигнальный путь JAK-STAT (Ohtsuka et al., 2015) активируется экспрессия “генов плюрипотентности”, таких как *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4* и *Sall4*, и стимулируется самообновление ЭСК мыши *in vitro* (Ho et al., 2009; Nichols et al., 1998; Raz et al., 1999). Активация экспрессии этих генов происходит за счет совместного связывания транскрипционных факторов Stat3 и Brg1 с их промоторами, при этом *Klf4* и *Sall4* являются прямыми мишенями Stat3 (Bourillot et al., 2009). Активация PI3K-Akt фактором LIF повышает экспрессию генов *Nanog*, *Esrrb*, *Tbx3* и *Tcl1* (Storm et al., 2009), ответственных за самообновление ЭСК мыши (Storm et al., 2007, 2009). Ген *Zscan4*, который регулируется PI3K (Storm et al., 2009), экспрессируется в эмбрионе на стадии 2 бластомеров (Falco et al., 2007). В то же время гетерогенная популяция ЭСК мыши *in vitro* сохраняет экспрессию данного гена в 5% клеток (Zalzman et al., 2010). Функция *Zscan4* заключается в регуляции механизма альтернативной элонгации теломер на ранних стадиях развития эмбриона до начала теломеразной активности (Blasco, 2007). Альтернативная элонгация теломер в бластомерах на стадии 2-клеточного эмбриона и ЭСК мыши работает посредством гомологичной рекомбинации теломерных последовательностей (Blasco, 2007), тогда как гиперметилирование и гетерохроматизация теломерных/субтеломерных регионов препятствуют этому процессу в терминально дифференцированных клетках (Schoeftner, Blasco, 2009). *Zscan4* способствует деметилированию теломерных/субтеломерных регионов путем инициации деградации основных компонентов комплекса метилирования Uhrf1 и Dnmt1, в результате обеспечивая пролиферацию, поддержание плюрипотентности и стабильность генома (Dan et al., 2017; Le et al., 2021). Нокдаун *Zscan4* приводит к изменению кариотипа, снижению клеточной пролиферации и апоптозу через 7–8 пассажей (Zalzman et al., 2010). Таким образом, LIF активация двух сигнальных путей JAK-STAT3 и PI3K-Akt в ЭСК мыши способствует самообновлению, пролиферации и поддержанию статуса плюрипотентности. Кроме того, стимуляция LIF активирует МАРК посредством Shp2-mediated Grb/Sos сигнального пути, через который одновременно активируется JAK-STAT3 сигналинг (Ohtsuka et al., 2015).

Известно, что МАРК сигнальный путь обеспечивает дифференцировку клеток в нейрональном направлении (Stavridis et al., 2007), а его активность в ЭСК мыши ингибируется малой молекулой МЕК ингибитора PD098059 (Burdon et al., 1999; Ohtsuka et al., 2015). Для длительного самообновления ЭСК мыши *in vitro* необходима акти-

вазия WNT/ β -catenin сигнального пути и его мишеней *Nanog*, *Esrrb*, *Klf2*, и *Tfcp2l1* (Ohtsuka et al., 2015; Qiu et al., 2015). CHIR, ингибируя GSK3, стабилизирует активность и высвобождение β -catenin, который входит в ядро и индуцирует экспрессию “генов плюрипотентности” *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* (Martello et al., 2012) путем супрессии TCF3 (Qiu et al., 2015). Мишени WNT/ β -catenin сигнального пути, *Klf2* и *Tfcp2l1*, повышают свою экспрессию и стимулируют экспрессию *Nanog* для инициации самообновления клеток (Qiu et al., 2015; Ye et al., 2013). Суммируя, можно сказать, что для культивирования ЭСК мыши необходимы ингибирование MAPK (PD098059), активация канонического WNT/ β -catenin сигнального пути ингибитором GSK3 (CHIR) и стимуляция клеток фактором LIF.

Стволовые клетки эпибласта (ЭпиСК) мыши

В 2007 г. были впервые выделены плюрипотентные стволовые клетки пост-имплантационного эпибласта мыши (ЭпиСК) (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Было показано, что ЭпиСК экспрессируют основные регуляторные транскрипционные факторы плюрипотентности (*Oct4*, *Nanog*) и сохраняют способность дифференцироваться в соматические терминальные типы клеток и ППК (Tesar et al., 2007). В отличие от ЭСК мыши ЭпиСК поддерживались в LIF независимых и Activin A/nodal и FGF2 (Li, Belmonte, 2017) зависимых условиях *in vitro*. Они формировали плоские монослойные колонии, состоящие из клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением (Brons et al., 2007). Кроме того, было обнаружено отличие профилей тотальной экспрессии генов у ЭпиСК и ЭСК мыши (Kojima et al., 2014). Это связано с инактивацией дистального и активацией проксимального энхансера *Oct4* в ЭпиСК (Tesar et al., 2007). По сравнению с ЭСК мыши ЭпиСК более интенсивно экспрессировали гены *Otx2*, *Eomes*, *Foxa2*, *brachyury T*, *Gata6*, *Sox17* и *Cer1* (Tesar et al., 2007). Метиллом ЭпиСК мыши отличается от метилома ЭСК гиперметилированностью в регионах промоторов (Veillard et al., 2014). Известно, что геном ЭСК мыши гипометилирован, и их направленная дифференцировка активирует *de novo* метилирование посредством катализаторов Dnmt3b/a/l (*de novo* methyltransferase 3) (Okano et al., 1999). Было показано, что в клетках ЭпиСК увеличивается уровень экспрессии *de novo* метилтрансфераз *Dnmt3a1* и *Dnmt3b* и уменьшается уровень экспрессии деметилаз *Tet1* и *Tet2* (Veillard et al., 2014). ЭпиСК были способны формировать тератомы при трансплантации в различные органы иммунодефицитной мыши (Brons et al., 2007; Sugimoto et al., 2015; Tesar et al., 2007). Попытки получить химерных мышей подсадкой клеток ЭпиСК в морулу и бластоцисту

не привели к успеху. Точно так же клетки постимплантационного эпибласта мыши при подсадке были не способны давать химерных мышей (Tesar et al., 2007). Однако оказалось, что принудительная экспрессия антиапоптотического гена *Bcl2* в ЭпиСК, инъецируемых в премиплантационный эмбрион, способствует интеграции этих клеток в эмбрион и формированию первичной химеры (Morata Tarifa et al., 2020). Данная модификация ЭпиСК способствовала устранению межстадийных различий клеток эпибласта (Masaki et al., 2016). Таким образом, клетки эпибласта, выделенные из постимплантационного эмбриона мыши, способны прижиться в преимплантационном эмбрионе и дать вклад в формирование химерного эмбриона. Было показано, что если инъецировать клетки ЭпиСК в постимплантационный эмбрион, то трансплантированные клетки ЭпиСК приживаются внутри него и дифференцируются в производные трех зародышевых листков и ППК (Huang et al., 2012).

Эмбриональные стволовые клетки человека

Первые линии ЭСК человека были получены в 1998 г. из ВКМ бластоцисты в тех же условиях, что и условия культивирования ЭСК мыши (Thomson et al., 1998). Однако было показано, что LIF, ключевой фактор самообновления ЭСК мыши (Nanpa et al., 2010), не обеспечивает достаточного уровня сигнала для поддержания плюрипотентности ЭСК человека. Оказалось, что для них более важную роль играют сигналы FGF и TGF β /Activin (Vallier et al., 2005). Несмотря на то, что ЭСК человека и мыши были получены из преимплантационных эмбрионов, находящихся на одной и той же стадии развития, было замечено, что они отличаются по многим показателям. В число этих показателей входят морфология (плоские или куполообразные колонии), зависимость от факторов роста (bFGF и TGF β /Activin/Nodal или сигнальный путь LIF/STAT3), геномная стабильность, эпигенетическое состояние X-хромосомы и т.д. (Bayerl et al., 2021).

Плюрипотентные стволовые клетки, полученные путем переноса в ооцит соматического ядра

Очевидно, что исследования ЭСК человека имеют практические и этические ограничения. Кроме того, тератогенность ЭСК лимитирует их применение в регенеративной медицине. В связи с этим проблема альтернативного источника ПСК со свойствами, характерными для ЭСК, сохраняет свою актуальность. Потребность в получении любых типов клеток взрослого человека, которые были бы специфичны для каждого конкретного пациента, стала движущей силой разработки но-

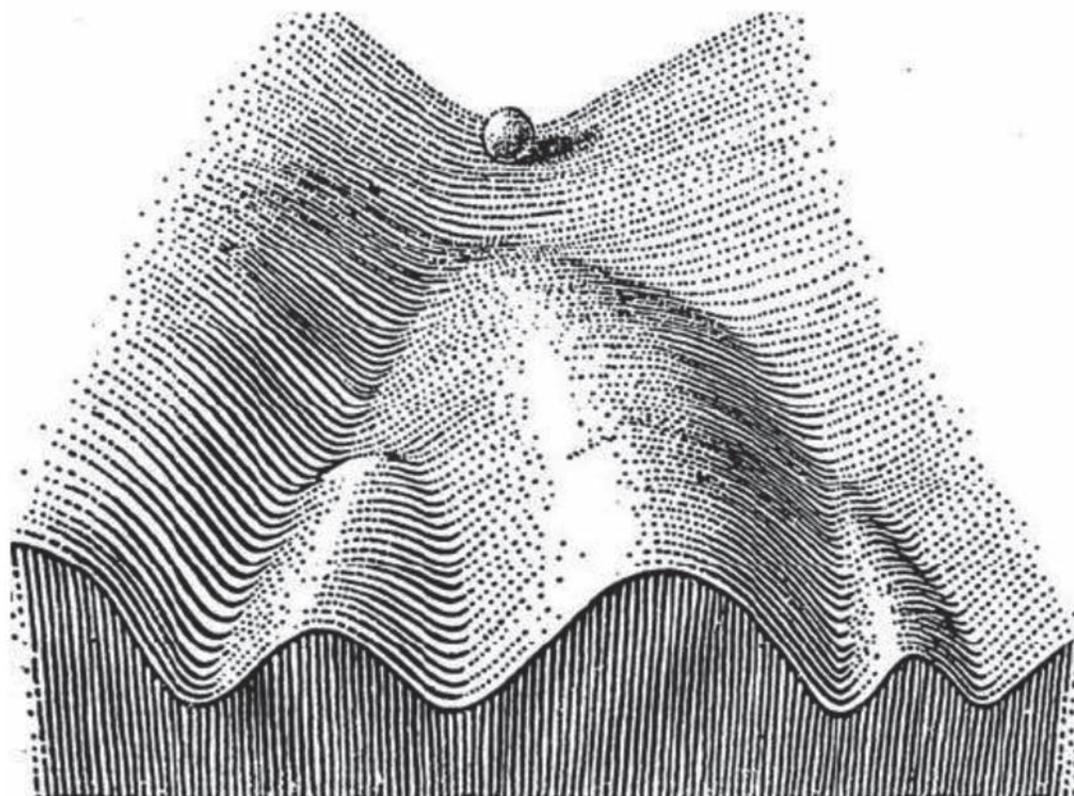


Рис. 1. Рисунок, иллюстрирующий концепцию эпигенетического ландшафта, предложенную К.Х. Уоддингтоном (из Waddington, 1957).

вых способов получения ПСК. В 1997 г. появился новый метод получения ПСК путем переноса соматических ядер в энуклеированные ооциты второго деления мейоза (Wilmut et al., 1997), впоследствии названный клонированием (Gurdon, 2006).

Работа, благодаря которой стало возможно данное направление получения ПСК, была выполнена Гёрдоном еще в 1962 г. (Gurdon, 1962b). Проведенные ранее эксперименты указывали на то, что ядро дифференцированной клетки может отличаться от ядер клеток эмбриона, и эти изменения могут быть необратимыми. Возник вопрос, является ли конечная дифференцировка клеток во время эмбриогенеза результатом делеции генетического материала, что приводит к разнообразию клеток с различными наборами генов, или же за нее ответственны регуляторные механизмы, которые не подразумевают существенного изменения генетического материала. Концепция “эпигенетического ландшафта” К.Х. Уоддингтона (Reiner, 1941; Waddington, 1957) была предложена для наглядного объяснения процессов дифференцировки клеток из тотипотентного состояния зиготы. Клетка в тотипотентном состоянии характеризуется способностью дать начало целому организму или клетке любого типа этого организма. Уоддингтон предложил проиллюстрировать судьбу клеток траектория-

ми движения шаров, скатывающихся под уклон по неровной местности (с холмами и оврагами) (рис. 1). Его концепции подразумевает ограниченный набор устойчивых путей развития клеток и целостного организма в рамках конкретного генотипа. Однако Гёрдон с помощью переноса соматического ядра *Xenopus laevis* в энуклеированный активированный ооцит получил половозрелых взрослых лягушек. Этим он показал, что дифференцировавшуюся клетку (скатившийся вниз шарик) можно вернуть в исходное состояние. Стало понятно, что соматическое ядро, обладая полным набором генов, при пересадке в энуклеированный ооцит “сбрасывает” эпигенетические и транскрипционные установки терминальной дифференцировки и восстанавливает профиль экспрессии тотипотентной клетки (т.е. дедифференцируется). В ходе клонирования соматическая клетка дробится, у нее активируется зародышевый геном (Liu et al., 2018). Однако низкая эффективность клонирования является недостатком данного метода. Кроме того, было показано, что процесс деметилирования и *de novo* метилирования генома клона функционирует нестабильно и вызывает нарушение экспрессии генов, ответственных за нормальное развитие (Gao et al., 2018; Wang et al., 2020). Несмотря на нарушения на стадии бластоцисты, можно вы-

делить клетки ВКМ клонов и культивировать их *in vitro*. Изучение выделенных ЭСК клонов позволит выявить проблемы с эпигенетической регуляцией и исправить недостатки метода клонирования.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки

Описанные выше эксперименты (Gurdon, 1962a; Wilmut et al., 1997) привели к революции в сфере репрограммирования зрелой соматической клетки – открытию возможности репрограммирования путем активации факторов плюрипотентности. Исследователи Такахаши и Яманака показали, что эктопическая экспрессия четырех факторов транскрипции Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус (которые были названы “коктейлем Яманак”) достаточна для репрограммирования фибробластов мыши (Takahashi, Yamanaka, 2006) и человека (Takahashi et al., 2007) из соматического терминально дифференцированного в плюрипотентное состояние и их трансформации в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). Один из четырех факторов, с-Мус, не является обязательным для индукции плюрипотентного состояния, и для репрограммирования достаточно трех других. Однако эффективность репрограммирования с тремя факторами, Oct4, Sox2 и Klf4, гораздо ниже (Wernig et al., 2008). Известно, что повышенный уровень экспрессии протоонкогена с-Мус приводит к увеличению пролиферации клеток, поскольку с-Мус участвует в регуляции клеточного цикла (Seoane et al., 2002). Таким образом, в коктейле Яманак факторы Klf4 и с-Мус используются для достижения антиапоптоического эффекта и снятия ареста клеточного цикла в G1/S фазе (Честков и др., 2014). Кроме того, Klf4 является фактором плюрипотентности, который в сочетании с ЕрСАМ индуцирует формирование ИПСК из эмбриональных мышечных фибробластов (Kuan et al., 2017). Честков с соавторами трактовали воздействие эктопической экспрессии этих двух факторов на репрограммируемую клетку как перевод к неустойчивому эпигенетическому состоянию (клетка поднимается на вершину эпигенетического ландшафта) и неопределенному фенотипу. Далее экспрессия основного транскрипционного фактора плюрипотентности Oct4 вместе с Sox2 (составляющего с Oct4 гетеродимерный комплекс) (Rodda et al., 2005), стимулирует переход клетки в более устойчивое плюрипотентное состояние (Честков и др., 2014).

Первые ИПСК человека были получены при помощи трансдукции лентивирусными конструкциями, несущими *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* и *с-МУС*. Этот метод обладает рядом существенных недостатков. Случайная и нецелевая интеграция вируса в геном соматической клетки может привести к сдвигу рамки считывания и, таким образом, активировать

либо подавить экспрессию генов хозяина, что увеличивает риск мутагенеза (Li et al., 2014). С другой стороны, неполное подавление трансгена после репрограммирования при последующей дифференцировке клеток также может стать причиной развития опухоли (Stadtfeld, Hochedlinger, 2010). С целью увеличения эффективности и безопасности репрограммирования были предложены новые стратегии, включающие использование полицистронных векторов (Carey et al., 2009), плазмидных трансфекций (Stadtfeld et al., 2010; Okita, Yamanaka, 2011), аденовирусных векторов (Stadtfeld, Hochedlinger, 2010) и безвекторной доставки рекомбинантных белков (Zhou et al., 2009). Эти новые способы индукции плюрипотентного состояния у соматических клеток проанализированы во многих обзорах (Мучкаева и др., 2012; Banito, Gil, 2010; Hirschi et al., 2014; Tabar, Studer, 2014; Bartocetti et al., 2020; Khoo et al., 2020; Liu et al., 2020; Neavin et al., 2021; Shelby et al., 2022).

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ОБРАЗОВАНИЯ ЭПИБЛАСТА И ТРАНСФОРМАЦИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ *IN VIVO*

Как было отмечено выше, дифференцировку клеток эмбриона млекопитающего можно наглядно изобразить с помощью карты эпигенетического ландшафта, иллюстрирующей концепцию К.Х. Уоддингтона (Waddington, 1952). Тотипотентная клетка постепенно преобразовывается в терминально дифференцированную клетку со специфическими свойствами. На стадии ранней морулы механо-генетические процессы приводят к разделению бластомеров на трофобласт и массу внутренних плюрипотентных клеток. Внутренние клетки компактной морулы способны дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков и во внезародышевые клетки как трофэктодермы (Okae et al., 2018), так и амниона (Shao et al., 2017). Они сохраняются в раннем эмбриогенезе млекопитающих до закладки первичной полоски. Таким образом, плюрипотентность этих клеток ограничивается свойствами и особенностями, которые возникают и исчезают в ходе эмбриогенеза. Трансформацию плюрипотентности *in vivo* можно разделить на 2 основных этапа: преимплантационный и постимплантационный (рис. 2).

В преимплантационных бластомерах 8-клеточного эмбриона мыши экспрессируется Е-кадгерин, который равномерно распределяется в их цитоплазме. Фосфорилирование Е-кадгерина приводит к структурированию клеточных контактов на базолатеральной стороне бластомеров и инициирует компактизацию 8 бластомеров на E2.75 (Toyooka, 2020). Бластомеры на этой стадии образуют филоподии, которые формируют с соседними клетками контакты, опосредованные Е-кадгерином.

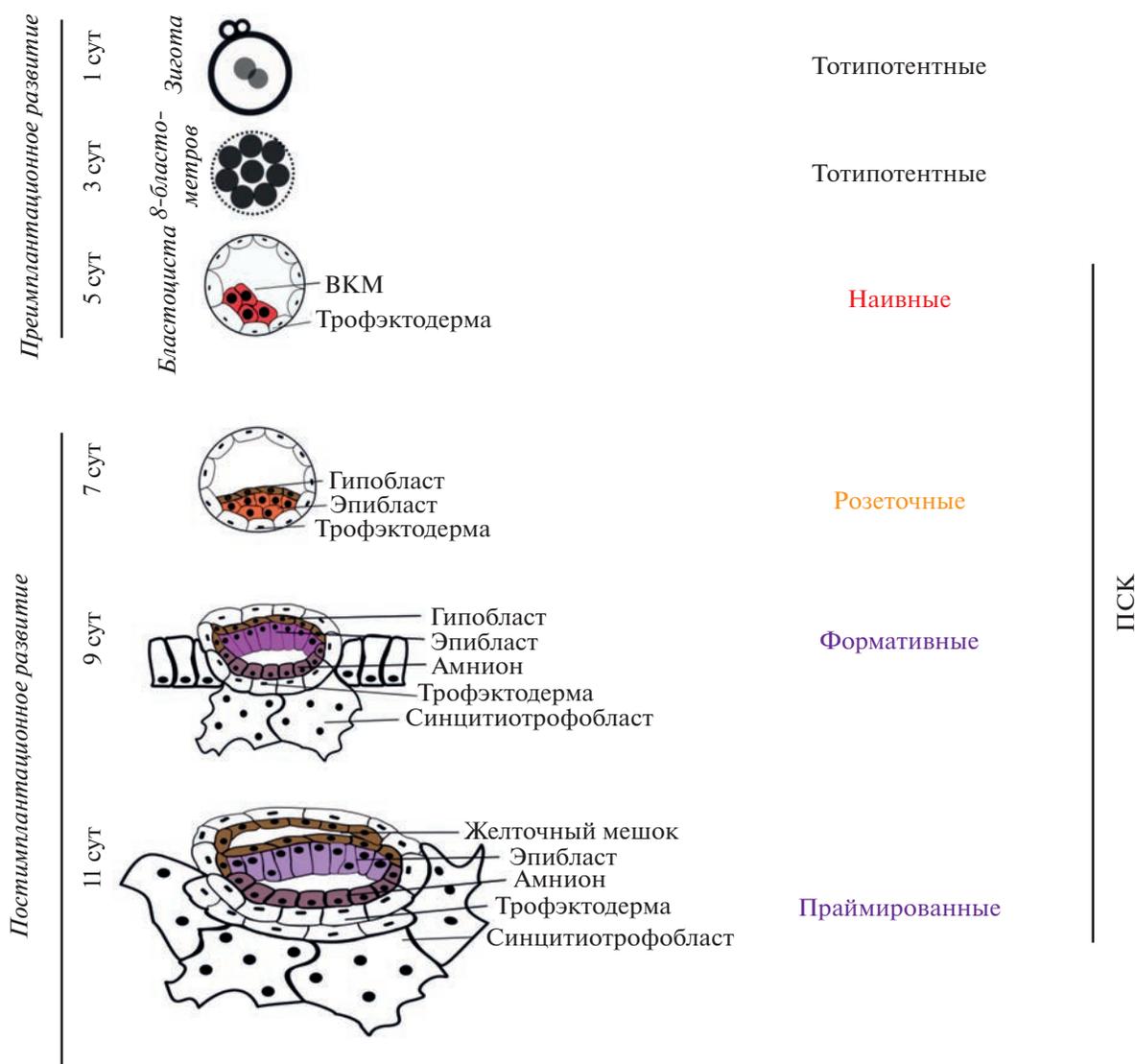


Рис. 2. Схема, обобщающая данные о различных состояниях плюрипотентности клеток в раннем эмбриогенезе человека.

Наличие и активность PAR3-PAR6-aPKC комплекса в бластомерах в этот момент определяет поляризацию наружных бластомеров (Pauken, Carso, 1999). Наряду с асимметричным наследованием дочерними клетками кератинов, поляризация и расположение клеток в эмбрионе являются ключевыми факторами, обуславливающими деления бластомеров на трофэктодерму и будущие клетки ВКМ бластоцисты. Кератины являются единственными промежуточными филаментами, которые экспрессируются в преимплантационном эмбрионе (Oshima et al., 1983). Показано, что клеточная сегрегация на стадии 8 бластомеров у млекопитающих происходит за счет асимметричного наследования кератинов при клеточном делении и дальнейшего их сохранения в субапикальной области дочерних наружных клеток. Кератины 8 и 18

появляются в единичных вегетативных бластомерах стадии 8 клеток и являются маркерами трофэктодермы (Lim et al., 2020). При этом предрасположенность к дифференцировке в трофэктодерму из вегетативного бластомера появляется еще на стадии 4 бластомеров. Клеточное разнообразие 8-клеточного эмбриона определяется ремоделирующим комплексом хроматина BAF (BAF chromatin remodeling complex), который экспрессируется на высоком уровне в одном из двух вегетативных бластомеров. Высокий уровень его экспрессии сохраняется в кератин-положительных бластомерах на стадии 8 бластомеров. Внутренние бластомеры остаются аполярными до тех пор, пока клеточные контакты E-кадгерин независимы (Korotkevich et al., 2017).

Сигнальные пути, поддерживающие
плюрипотентность клеток

Сигнальный путь FGF4/MAPK посредством эффектора ERK1/2 вызывает дифференцировку blastомеров во внезародышевые клетки, трофэктодерму и первичную энтодерму (гипобласт) (Yamanaka et al., 2010), а также играет важную роль в самообновлении и поддержании плюрипотентности постимплантационного эпибласта и ЭпиСК мыши (Brons et al., 2007; Mossahebi-Mohammadi et al., 2020; Tesar et al., 2007). Было показано, что на E3.5 клетки преимплантационного эпибласта мыши экспрессировали рецептор FGFR1, связывание с которым FGF4 приводило к созреванию эпибласта (Kang et al., 2017; Molotkov et al., 2017). FGF2, известный как активатор ERK1/2 и индуктор дифференцировки в зародышевые листки (Kunath et al., 2007), вызывает долгосрочное ингибирование ERK1/2 в ЭСК и blastоцисте мыши путем FGF2-индуцируемой некогерентной положительной обратной связи (Gharibi et al., 2020), где FGF2 подавляет активность и экспрессию рецептора тирозин киназы Ret (Pachnis et al., 1993) и приводит к долгосрочному ингибированию ERK1/2 (Gharibi et al., 2020). В данном контексте FGF2 повышает экспрессию маркеров наивности, супрессирует *de novo* ДНК метилтрансферазы и способствует подавлению метилирования генома (Gharibi et al., 2020). При первой и второй клеточной сегрегациях в преимплантационном эмбрионе мыши модуляция FGF/MAPK/ERK1/2 сигнального пути является частью процессов созревания эпибласта и сохранения плюрипотентности.

Активность канонического WNT/ β -catenin сигнального пути приводит к образованию передне-задней оси зародыша мыши, мезодермы и инициации гаструляции *in vivo* (Haegel et al., 1995; Huelsken et al., 2000; Mohamed et al., 2004). Кроме того, она поддерживает плюрипотентность и самообновление ЭСК человека и мыши *in vitro* (Lyashenko et al., 2011; Sato et al., 2003; Sokol, 2011). Известно, что на всех стадиях развития преимплантационного эмбриона мыши все участники канонического WNT/ β -catenin сигнального пути экспрессируются, но сам путь остается неактивным (Harwood et al., 2008). Канонический путь *Wnt3a* экспрессируется со стадии 2-blastомерного эмбриона, *Wnt4* – со стадии 4/8-blastомерного эмбриона мыши (Lloyd et al., 2003), в то время как β -catenin детектируется, начиная со стадии 2 blastомеров на внутренней поверхности клеточной мембраны (Mohamed et al., 2004), и участвует в формировании клеточных контактов (Kemler, 1993). Активный (нефосфорилированный) β -catenin впервые начинает накапливаться в цитоплазме единичных клеток заднего постимплантационного эпибласта на стадии E6.5 развития мыши (Mohamed et al., 2004). Эмбрион мыши с нокаутом β -catenin

развивается до стадии гаструляции, и на стадии E5.5 наблюдается блок образования зародышевых осей и отсутствие мезодермы (Huelsken et al., 2000).

Вероятно, в преимплантационном развитии мыши WNT использует неканонические пути, такие как Wnt/ Ca^{+2} (Harwood et al., 2008) и эффекторные молекулы SAMK2A/TAK1/NLK, которые ингибируют связывание β -catenin-TCF/LEF с ДНК путем фосфорилирования TCF/LEF (Ishitani et al., 1999, 2003). Эти данные говорят о том, что *in vivo* канонический WNT/ β -catenin сигнальный путь не участвует в поддержании плюрипотентности и самообновлении клеток ВКМ blastоцисты и перепостимплантационного эпибласта мыши. Тогда остается вопрос, почему активация канонического WNT/ β -catenin сигнального пути посредством стабилизации β -catenin является важным компонентом при получении наивных ПСК *in vitro*?

Секвенирование единичных клеток преимплантационного эмбриона мыши (Tang et al., 2010) показало, что в них экспрессировались компоненты BMP сигнального пути: лиганды BMP (BMP4, BMP6), рецепторы (ALK2, ALK3 (BMPRI1A), ALK6 (BMPRI1B)), Smad1/5/8 белки (Reyes de Mochel et al., 2015). Данные результаты говорят об активности и участии BMP сигналинга в преимплантационном развитии эмбриона. Исследование нокаута лигандов и рецепторов BMP показало их важность в гаструляции, потому что при их нокауте не образуется мезодерма (Mishina et al., 1995). Нокаут внутриклеточных трансдукторов (*Smad1/5*) приводил к остановке развития эмбриона (Arnold et al., 2006). Преимплантационные blastоцисты мыши, дефицитные по рецептору BMP I (BMPRI1A/ALK3) или 2 типа (BMPRII/BMPRI2), были нормального размера, но отличались низкой пролиферативной активностью. При этом количество клеток постимплантационного эпибласта на E7.0 и их пролиферативная активность снижались по сравнению с диким типом, что означает вовлеченность BMP сигналинга в процессы клеточной пролиферации (Mishina et al., 1995). В гомозиготных *Bmpr* мутантных эмбрионах не формировалась первичная полоска. Это приводило к отсутствию мезодермы, однако клетки эпибласта в культуре сохраняли способность дифференцироваться в мезодермальные производные (Mishina et al., 1995). Активность сигнального пути BMP наблюдается во всех клетках, начиная с 4-blastомерного эмбриона мыши, однако она пространственно ограничивается на стадии поздней blastоцисты с накоплением наибольшего количества фосфорилированных белков Smad1/5/8 в клетках ВКМ (Reyes de Mochel et al., 2015). При этом мРНК *Bmpr4* обнаруживалась исключительно в клетках ВКМ blastоцисты (Soucovanis, Martin, 1999). В результате ассиметричного деления 8 blastомеров на 16 наружные и

внутренние бластомеры экспрессировали *Bmpr1a*, в то время как только внутренние бластомеры экспрессировали *Bmpr4* и *Bmpr7*, продукты которых являются мишенью для данного рецептора (Graham et al., 2014). Дифференциальная экспрессия *Bmpr2* на стадии 16 бластомеров наблюдалась в наружных клетках (Graham et al., 2014). Дозозависимая реакция на *Noggin* в 16-бластомерном эмбрионе мыши показала, что при продолжительном культивировании *in vitro* снижается количество клеток первичной энтодермы (гипобласта) (Graham et al., 2014). С другой стороны, нокдаун *Bmpr4* и *Bmpr7* в 2-бластомерном эмбрионе мыши приводил к значительному снижению количества клеток трофэктодермы и первичной энтодермы бластоцисты на E3,5 (Graham et al., 2014). Оказалось, что снижение количества внезародышевых клеток было связано с удлинением клеточного цикла при ингибировании антагонистами BMP, такими как *Noggin* (Reyes de Mochel et al., 2015) и *Dorsomorphin* (Graham et al., 2014). Работы по ингибированию BMP сигналинга показали, что малая молекула антагонист BMP LND193189 замедляет дробление бластомеров. При экспозиции целого эмбриона с антагонистом BMP *Noggin* или при экспрессии доминантного негативного рецептора *BMPRIa/ALK3* снижается скорость клеточной пролиферации, но гибель клеток не наблюдается (Reyes de Mochel et al., 2015). Тотипотентный статус ЭСК мыши в культуре был получен путем активации сигнального пути BMP4 через *Smad1/5* и ингибирования FGF, WNT, TGF- β (Meharwade et al., 2022). Известно, что культура ЭСК гетерогенна (Hayashi et al., 2008; Toyooka et al., 2008), соответственно, было показано, что маркер тотипотентности *MERVL* экспрессировался в единичных клетках (Meharwade et al., 2022). Индукция ЭСК мыши ростовым фактором BMP4 не только увеличивала процент тотипотентных клеток, но и усиливала активность сигнальных путей FGF, WNT, TGF- β (Meharwade et al., 2022), которые вовлечены в направлении различных состояний плюрипотентности и детерминацию процесса развития (клеточной дифференцировки).

Созревание эпибласта мыши.

Различные состояния плюрипотентности клеток эпибласта

В преимплантационной бластоцисте у млекопитающих клетки ВКМ определяют как наивные ПСК. Еще до имплантации из них образуется эпибласт, который с развитием приобретает различные состояния плюрипотентности и сохраняет статус плюрипотентности до формирования первичной полоски. Выделяют три типа плюрипотентного эпибласта: розеткоподобный, формативный и праймированный (Гордеев и др., 2021) (рис. 2). Аналогичные состояния плюрипотент-

ности ПСК были получены в культуре (Kinoshita et al., 2021; Neagu et al., 2020). Розеткоподобный эпибласт появляется в момент имплантации. При этом эпигенетический паттерн клеток эпибласта перестраивается в сторону большей восприимчивости к сигналам дифференцировки через формативное состояние. В итоге образуются праймированные клетки. При имплантации (на стадии E4.9) эпибласт мыши приобретает розеткоподобную форму, и на стадии E5.1 инициируется люминогенез, в результате которого формируется проамниотическая полость (Christodoulou et al., 2018; Neagu et al., 2020).

Иными словами, морфогенетическая трансформация постимплантационного эмбриона мыши (E5.5) (Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014), которая связана с утратой наивности клетками ВКМ в период перимплантации (E4.5–E4.75) (Shahbazi et al., 2017), осуществляется за счет поляризации клеток эпибласта (Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014; Molè et al., 2021) и люминогенеза (Christodoulou et al., 2018).

Розеткоподобная форма эпибласта мыши на стадии E4.5 связана с экспрессией основного ламинина базальной мембраны, который синтезируется клетками трофэктодермы и первичной энтодермы (гипобласта) вокруг зародышевой ткани (Wallingford et al., 2013; Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014; Murray, Edgar, 2000). Культивирование ВКМ мыши, микрохирургически выделенной на стадии E3.5, в нише матригеля в качестве внеклеточного матрикса показало, что наличие базальной мембраны достаточно для поляризации и созревания клеток эпибласта и формирования проамниотической полости (Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014; Molè et al., 2021). Важным участником реорганизации эпибласта в розеткоподобную структуру является экспрессируемый клетками эпибласта в области базальной мембраны рецептор V1 -интегрин, который активирует поляризацию клеток и люминогенез на стадии E4.75 (Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014). В его отсутствие поляризация клеток эпибласта не происходит (Molè et al., 2021). Рецептор V1 -интегрин, кроме того, способствует повышению жизнеспособности клеток эпибласта мыши (Molè et al., 2021). Для поляризации клеток эпибласта также необходимо взаимодействие E-кадгерина и F-актина и сокращение актомиозина, подстилающего апексы клеток. Процесс поляризации инициируется в 12–13 клетках перимплантационного эпибласта, экспрессирующих aPKC (атипичная протеин киназа C), и структура розетки формируется за счет деления этих клеток (Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014).

При культивировании бластоцисты мыши на стадии E4.5 в условиях поддержания наивности ЭСК (2iLIF), в клетках эпибласта сохранялась активность белка *Nanog* (Shahbazi et al., 2017). Его

активность подавляется при морфогенетической трансформации (поляризации клеток эпибласта и люминогенезе) *in vivo*. При этом в данных условиях ингибировалась экспрессия белка *Podx1* (Shahbazi et al., 2017), который в естественных условиях локализуется в клетках эпибласта апикально и секретируется при образовании люмена — будущей проамниотической полости (Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014). В экспериментах по культивированию ЭСК мыши в условиях 2iLIF и 3D с матригелем, клетки экспрессировали *Nanog* и *Rex1*, розеткоподобная структура эпибласта сохранялась, но не формировался люмен, в то время как в отсутствие ингибиторов он образовывался (Shahbazi et al., 2017). Таким образом, для формирования розеткоподобного эпибласта и морфогенетической перестройки в клетках ВКМ должна подавляться экспрессия *Nanog*, и они должны утрачивать наивное состояние плюрипотентности.

Хотя ЭСК мыши, культивируемые в условиях 3D с матригелем, экспрессируют *Otx2* и формируют розетку и люмен, они всегда образуют сфероид, тогда как в интактных эмбрионах мыши зародышевая ткань принимает куполообразную форму (Weberling, Zernicka-Goetz, 2021). Дело в том, что на стадии E5.5 полярные клетки трофэктодермы “заставляют” розеткоподобный эпибласт принять куполообразную форму посредством механического воздействия (Weberling, Zernicka-Goetz, 2021). В этот момент клетки эпибласта приобретают формативное состояние плюрипотентности (Smith, 2017).

На стадии E5.5 у эмбриона мыши наиболее интересные события происходят на границе зародышевого эпибласта и внезародышевой эктодермы. В этом регионе апикобазальная ось полярности эпибласта меняет ориентацию с параллельной на перпендикулярную относительно проксимодистальной оси эмбриона. Это приводит к удлинению полости эпибласта в сторону внезародышевой эктодермы на стадиях E5.5—E5.75. Наконец, на стадии E5.75 происходит объединение двух полостей — полости эпибласта и полости внезародышевой эктодермы — и образование проамниотической полости (Christodoulou et al., 2018). На клеточном уровне основным механизмом этого морфогенеза является интеркаляция клеток (Christodoulou et al., 2018).

Эпибласт мыши, микрохирургически выделенный на стадии E5.5, культивировали на фибронектине в условиях стимуляции FGF2 и Nodal (Activin A) и ингибирования WNT сигнальных путей (Kinoshita et al., 2021; Wang et al., 2021). В данных условиях его клетки экспрессировали *Otx2*, *Oct4*, *Sox2*, а также на низком уровне *Nanog* (Kinoshita et al., 2021; Wang et al., 2021). Было отмечено, что энхансерная активность менялась — она переходила с дистального энхансера *Oct4*, который работал у наивных клеток эпибласта, на проксимальный

(Wang et al., 2021). Явными характеристиками этих клеток были инактивация одной X хромосомы, схожесть транскриптомного профиля с таковым клеток эпибласта на E5.5—6.5, активация *de novo* метилирования, экспрессия *Fgf5* (Wang et al., 2021) и способность формировать химеры (Kinoshita et al., 2021). Полученная таким образом устойчивая линия *in vitro* была определена как формативные ПСК и, соответственно, ее аналогом *in vivo* являются клетки формативного эпибласта на стадии E5.5. Данные клетки на стадии E5.75 обладают свойством дифференцироваться в ППК (Hoogland, Marks, 2021; Kinoshita et al., 2021; Kinoshita, Smith, 2018; Yeh et al., 2021), которые *in vivo* на стадии E6.25 закладываются на дорсальной стороне эмбриона мыши над прилегающей внезародышевой эктодермой (Tanaka et al., 2005; Kurimoto et al., 2008; Saitou, Yamaji, 2012; Абдыев и др., 2019). Было показано, что направленная дифференцировка ИПСК человека со свойствами формативных ПСК, экспрессирующих маркеры постимплантационного эпибласта *OTX2* и *SOX11*, в ППК-подобные клетки привела к появлению среди них высокого процента SSEA1⁺ клеток (Abdyuev et al., 2020). Высокий выход ППК-подобных клеток в этой работе согласуется с результатами исследования Киношита и соавторов, в котором они дифференцировали формативные ПСК в ППК-подобные клетки и использовали SSEA1 и CD61 как поверхностные маркеры ППК (Kinoshita et al., 2021).

Эпибласт прегастролы мыши на стадии E5.25—E6.5 претерпевает постепенную трансформацию состояний плюрипотентности (Cheng et al., 2019) с образованием висцеральной энтодермы и последующей закладкой передне-задней оси эмбриона (Tam et al., 2006). Висцеральная энтодерма заднего конца тела экспрессирует *Wnt3* на стадии E5.5 и индуцирует разделение клеток задней части эпибласта (Rivera-Pérez, Magnuson, 2005) на субпопуляции, одна из которых экспрессирует только *Wnt3* (начиная со стадии E5.25), а другая — *Wnt3* в совокупности с *Brachyury T* (Cheng et al., 2019). Передняя висцеральная энтодерма экспрессирует антагонисты Nodal (*Cerl* и *Lefty*) (Yamamoto et al., 2004), WNT (*Dkk1*) и TGFβ (*Shisa2*) (Cheng et al., 2019), ингибируя сигнальные пути заднего конца тела (Nodal, WNT и BMP) в переднем эпибласте, в котором экспрессируется “ген плюрипотентности” *Dppa4*. Изучение паттернов экспрессии лигандов и рецепторов эмбриона мыши показало, что экспрессирующиеся уникальные лиганды областей висцеральной энтодермы соответствуют рецепторам прилегающих к ним кластеров эпибласта (передней, транзитной, задней частей эпибласта). Анализ их взаимодействий выявил 19 пар лиганд-рецептор передней висцеральной энтодермы и переднего эпибласта и 24 — задней висцеральной энтодермы и эпибласта — с различ-

ными комбинациями пар лигандов и рецепторов между соответствующими клеточными кластерами (Cheng et al., 2019). Таким образом, эпибласт разделяется на клеточные кластеры, при этом формативное состояние плюрипотентности “смещается” в передние клетки эпибласта, а клетки заднего эпибласта приобретают праймированное состояние, определяющееся экспрессией *Dnmt3a*, *Utf1* и *Oct4* (Cheng et al., 2019).

Созревание эпибласта человека. Розеткоподобный эпибласт

Оказалось, что у человека фенотипическое разделение клеток эпибласта и гипобласта эмбриона происходит позже, чем у мыши (Deglincerti et al., 2016). Тем не менее уже на 6 сутки развития транскриптомный профиль этих клеток отчетливо сегрегируется (Blakeley et al., 2015). На данной стадии в условиях искусственной имплантации были выявлены клетки ВКМ (презумптивные клетки эпибласта), экспрессирующие *OCT4+*/*NANOG+*/*GATA6-*, гипобласта, экспрессирующие *OCT4+*/*GATA6+*/*NANOG-*, и трофэктодермы, экспрессирующие *CDX2+*/*GATA3+*. При этом ВКМ бластоцисты человека состоит из двух типов клеток, расположенных неупорядоченным образом (Deglincerti et al., 2016). На 7 сутки развития полярные клетки трофэктодермы приобретают способность связываться с субстратом, и форма эмбриона становится вытянутой. На 8 сутки происходит выделение четких клеточных типов, таких как *OCT4+*/*GATA6-* клетки эпибласта и *OCT4-*/*GATA6+* клетки гипобласта (Deglincerti et al., 2016).

На 7.5 сутки развивается зародышевый диск, состоящий из колбовидных эпителиальных клеток эпибласта и клеток амниона, между которыми формируется щель (Hertig et al., 1956); также происходит дальнейшее формирование проамниотической полости. Имеются данные о том, что на 6–7 сутки развития *GATA6-* клетки эпибласта экспрессировали *KLF17*, а маркер люминогенеза *PODXL*, характерный для 9–10 суток, отсутствовал (Shahbazi et al., 2017). При культивировании в условиях поддержания наивных ЭСК *5iLAF* (Theunissen et al., 2014) эмбрионы человека не образовывали полость и продолжали экспрессировать *KLF17*, *NANOG* и маркер наивности *CD130* (Shahbazi et al., 2017). Имитация люминогенеза *in vitro* показала, что условия наивности для ЭСК человека препятствуют образованию люмена, тогда как развитие плюрипотентности в сторону праймированности способствует образованию розетки (Shahbazi et al., 2017) и люминогенезу (Shahbazi et al., 2016; Taniguchi et al., 2015). Исследование Уэберлинг и Зерника-Гётц продемонстрировало, что полярные клетки трофэктодермы генерируют механическую силу, которая растягивает клетки эпибласта и спо-

собствует образованию дискоидальной формы эмбриона человека (Weberling, Zernicka-Goetz, 2021). Сила растяжения является основной движущей силой данного морфогенеза, что доказано экспериментально: приложение аналогичной силы к эмбриону мыши *in vitro* приводит к формированию дискоидального зародыша, а не куполообразного (Weberling, Zernicka-Goetz, 2021). На основе результатов данной работы было выполнено математическое моделирование, которое показало возможность формирования розеткоподобного эпибласта у человека (Dokmegang, 2022). Таким образом, можно сделать вывод, что в перимплантационном периоде (6–7 сутки) морфогенетические процессы организуют клетки ВКМ человека в дискоидальную структуру эпибласта. В результате этого клетки эпибласта поляризуются и, вероятно, на короткое время образуют розеткоподобную структуру.

Процесс люминогенеза в ходе образования проамниотической полости сопровождается переходом наивных ПСК человека в праймированное состояние (Schindler et al., 2021) и морфологической поляризацией клеток эпибласта и ПСК (Shahbazi et al., 2016). На 7.5 сутки развития эмбриона человека наблюдается образование люмена, а на 8 – дифференцировка плоских эпителиальных клеток амниона (Shao et al., 2017). На 10 сутки развития эмбриона человека в условиях искусственной имплантации образуется проамниотическая полость, а *OCT4*-положительные клетки эпибласта начинают экспрессировать *CD24* (Deglincerti et al., 2016), который демаркирует праймированные клетки эпибласта и ЭСК человека и мыши (Shakiba et al., 2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что изучение плюрипотентности началось еще в середине XX века, ученые смогли вплотную подойти к получению и характеристике ПСК мыши и человека только в конце прошлого столетия. Совсем недавно были открыты и описаны основные факторы, которые влияют на поддержание и трансформацию плюрипотентности у млекопитающих. За счет этого удалось начать работы по репрограммированию соматических дифференцированных клеток, а также выявить основные черты и свойства ПСК, полученных на разных стадиях эмбриогенеза. Данный прорыв в изучении связи между морфогенетическими процессами и дифференцировкой клеток в раннем эмбриогенезе мыши и человека стал возможен благодаря появлению методов выделения и культивирования ПСК.

Одним из важных открытий стало участие *WMP4* как ключевого морфогена в трансформации тотипотентного бластомера и смене состояний плюрипотентности в развитии. Его воздействие на ЭСК мыши в культуре увеличивает процент тотип-

потентных клеток и стабилизирует тотипотентный статус при условии ингибирования активности сигнальных путей FGF, WNT, TGF β . Активация перечисленных сигнальных путей приводит к обратному результату – развитию состояний плюрипотентности и созреванию эпибласта. Соответственно, можно сделать вывод, что активность BMP сигналинга приводит к утрате тотипотентности и приобретению blastomeres плюрипотентного клеточного статуса с последующим усилением активности сигнальных путей FGF, WNT, TGF β . Несмотря на то, что *in vivo Wnt3a* экспрессируется у эмбриона мыши на стадии 2 blastomeres, канонический WNT сигнальный путь остается неактивным до формирования основных осей эмбриона. Однако в культуре, без активации канонического WNT/ β -catenin сигнального пути, удерживать наивное плюрипотентное состояние и самообновление ЭСК мыши и человека невозможно. FGF2 выступает положительным регулятором наивности в клетках ВКМ, не давая ПСК дифференцироваться. В то же время FGF2 известен как индуктор дифференцировки в зародышевые листки.

Различие между ранним эмбриогенезом мыши и человека заключается в том, что у мыши границы плюрипотентных состояний лучше выражены и привязаны к стадиям эмбриогенеза (пре/постимплантационный эпибласт), которые имеют точные временные рамки. Также у мыши внезародышевые типы клеток (трофэктодерма и гипобласт) образуются до имплантации и четко разграничиваются на кластеры. В то же время у человека клетки гипобласта и плюрипотентные клетки ВКМ смешаны друг с другом. Кластеризация этих клеток у человека происходит только после имплантации. Клетки трофэктодермы участвуют в генерации силы натяжения, которая приводит к образованию дискоидальной формы зародыша человека, тогда как цилиндрическая форма зародыша мыши образуется под действием силы давления.

Интересным, но еще не полностью доказанным фактом является формирование у эмбриона человека розеткоподобной структуры эпибласта. Ее наличие было смоделировано, однако короткий период ее существования, вероятно, сложно зафиксировать. Кроме того, работа с эмбрионами человека ограничена по этическим соображениям. Это не позволяет провести достаточное количество исследований на ранних сроках развития. Поэтому, на наш взгляд, эта стадия развития эпибласта человека на сегодняшний день практически не описана.

Поскольку эмбрион человека на догастрюляционных стадиях развития практически недоступен, единственная модель, позволяющая исследовать дифференцировку его клеток, это культура ПСК. Возможность исследования ПСК в культу-

ре позволила смоделировать механизмы образования и созревания плюрипотентных клеток ВКМ и эпибласта, а также развитие blastocyst-like structures (Yanagida et al., 2021; Yu et al., 2021 Heidari Khoei et al., 2023). Эти модели стали основой для изучения раннего эмбриогенеза как мыши, так и человека. Данные исследования показали наличие различных состояний плюрипотентности ПСК, что говорит о плавной трансформации плюрипотентности клеток эпибласта в процессе его морфогенетических изменений *in vivo*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021 и в рамках Государственного задания ИБР РАН № 088-2021-0016.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.К. Абдыев написал текст, подбирая литературу, интерпретировал, делал заключение и подготовил иллюстрации. Е.В. Алпеева подбирала литературу, написала введение, редактировала текст. Е.А. Воротеляк редактировала текст. А.В. Васильев редактировал текст, направлял критические вопросы, и вносил заключительные правки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдыев В.К. и др. Современные технологии получения первичных половых клеток человека *in vitro* // Биохимия. 2019. Т. 84. № 3. С. 330–342.
- Гордеев М.Н., Бахмет Е.И., Томилин А.Н. Динамика плюрипотентности в эмбриогенезе и в культуре // Онтогенез. 2021. Т. 52. № 6. С. 429–440.
- Мучкаева И.А. и др. Молекулярные механизмы индуцированной плюрипотентности // 2012. Т. 1. № 12. С. 32–43.
- Честков И.В. и др. Молекулярные барьеры в процессах генетического репрограммирования и трансформации клеток // 2014. С. 1592–1604.
- Abdyuev V.K. et al. *In vitro* derived female hPGCLCs are unable to complete meiosis in embryoid bodies // Exp. Cell Res. 2020. V. 397. № 2. P. 112358.

- Andrews P.W.* From teratocarcinomas to embryonic stem cells // *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* 2002. V. 357. № 1420. P. 405–417.
- Arnold S.J. et al.* Dose-dependent Smad1, Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo // *Dev. Biol.* 2006. V. 296. № 1. P. 104–118.
- Banito A., Gil J.* Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the biology to improve the technology // *EMBO Rep.* 2010. V. 11. № 5. P. 353–9.
- Bartocetti M. u др.* Regulatory Dynamics of Tet1 and Oct4 Resolve Stages of Global DNA Demethylation and Transcriptomic Changes in Reprogramming // *Cell Rep.* 2020. V. 30. № 7.
- Bayerl J. et al.* Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction // *Cell Stem Cell.* 2021. V. 28. № 9. P. 1549–1565.e12.
- Bedzhov I., Zernicka-Goetz M.* Self-Organizing Properties of Mouse Pluripotent Cells Initiate Morphogenesis upon Implantation // *Cell.* 2014. V. 156. P. 1032–1044.
- Blakeley P. et al.* Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq // *Dev.* 2015. V. 142. № 18. P. 3151–3165.
- Blasco M.A.* The epigenetic regulation of mammalian telomeres // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. № 4. P. 299–309.
- Bourillot P.Y. et al.* Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog // *Stem Cells.* 2009. V. 27. № 8. P. 1760–1771.
- Bradley A. et al.* Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines // *Nat.* 1984. V. 309. № 5965. P. 255–256.
- Brons I.G.M. et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // *Nat.* 2007. V. 448. № 7150. P. 191–195.
- Brons I.G.M. et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // *Nature.* 2007b. V. 448. № 7150. P. 191–195.
- Burdon T. et al.* Suppression of SHP-2 and ERK Signalling Promotes Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells // *Dev. Biol.* 1999. V. 210. № 1. P. 30–43.
- Carey B.W. et al.* Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 1. P. 157–162.
- Chambers I., Smith A.* Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 43. P. 7150–7160.
- Cheng S. et al.* Single-Cell RNA-Seq Reveals Cellular Heterogeneity of Pluripotency Transition and X Chromosome Dynamics during Early Mouse Development // *Cell Rep.* 2019. V. 26. № 10. P. 2593–2607.e3.
- Christodoulou N. et al.* Sequential formation and resolution of multiple rosettes drive embryo remodelling after implantation // *Nat. Cell Biol.* 2018. V. 20. № 11. P. 1278–1289.
- Coucouvanis E., Martin G.R.* BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo // *Development.* 1999. V. 126. № 3. P. 535–546.
- Damjanov I.* Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis // *Int. J. Dev. Biol.* 1993. V. 37. № 1. P. 39–46.
- Damjanov I., Andrews P.W.* Pluripotent human stem cells: Standing on the shoulders of giants // *Int. J. Dev. Biol.* 2016. V. 60. № 10–11–12. P. 321–325.
- Dan J. et al.* Zscan4 Inhibits Maintenance DNA Methylation to Facilitate Telomere Elongation in Mouse Embryonic Stem Cells // *Cell Rep.* 2017. V. 20. № 8. P. 1936–1949.
- Deglinerti A. et al.* Self-organization of the in vitro attached human embryo // *Nat.* 2016. V. 533. № 7602. P. 251–254.
- Dokmegang J.* Modeling Epiblast Shape in Implanting Mammalian Embryos // *Methods Mol. Biol.* 2022. V. 2490. P. 281–296.
- Ducibella T., Anderson E.* Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: Prerequisites for morphogenesis of the blastocyst // *Dev. Biol.* 1975. V. 47. № 1. P. 45–58.
- Evans M.J., Kaufman M.H.* Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nat.* 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
- Falco G. et al.* Zscan4: A novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells // *Dev. Biol.* 2007. V. 307. № 2. P. 539–550.
- Finch B.W., Ephrussi B.* Retention of multiple developmental potentialities by cells of a mouse testicular teratocarcinoma during prolonged culture in vitro and their extinction upon hybridization with cells of permanent lines // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1967. V. 57. № 3. P. 615–621.
- Gao R. et al.* Inhibition of Aberrant DNA Re-methylation Improves Post-implantation Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos // *Cell Stem Cell.* 2018. V. 23. № 3. P. 426–435.e5.
- Gardner R.L., Rossant J.* Investigation of the fate of 4–5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection // *Development.* 1979. V. 52. № 1. P. 141–152.
- Gharibi B. et al.* A FGF2-mediated incoherent feedforward loop induces Erk inhibition and promotes naïve pluripotency // *bioRxiv.* 2020. P. 2020.11.11.378869.
- Gough N.M. et al.* LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells // *Reprod. Fertil. Dev.* 1989. V. 1. № 4. P. 281–288.
- Graham S.J.L. et al.* BMP signalling regulates the pre-implantation development of extra-embryonic cell lineages in the mouse embryo // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. № 1. P. 1–11.
- Gurdon J.B.* Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells // *Dev. Biol.* 1962a. V. 4. № 2. P. 256–273.
- Gurdon J.B.* The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles // *Development.* 1962b. V. 10. № 4. P. 622–640.
- Gurdon J.B.* From Nuclear Transfer to Nuclear Reprogramming: The Reversal of Cell Differentiation // 2006. V. 22. P. 1–22.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.090805.140144>

- Haegel H. et al.* Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation // *Development*. 1995. V. 121. № 11. P. 3529–3537.
- Hanna J. et al.* Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. V. 107. № 20. P. 9222–9227.
- Harwood B.N. et al.* Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes, and cleavage stage embryos // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. № 4. P. 1099–1111.
- Hayashi K. et al.* Dynamic Equilibrium and Heterogeneity of Mouse Pluripotent Stem Cells with Distinct Functional and Epigenetic States // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 3. № 4. P. 391–401.
- Heidari Khoei H. et al.* Generating human blastoids modeling blastocyst-stage embryos and implantation // *Nat. Protoc.* 2023.
- Hertig A.T., Rock J., Adams E.C.* A description of 34 human ova within the first 17 days of development // *Am. J. Anat.* 1956. V. 98. № 3. P. 435–493.
- Hirschi K.K., Li S., Roy K.* Induced Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2014. V. 16. № 1. P. 277–294.
- Ho L. et al.* An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is an essential component of the core pluripotency transcriptional network // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 13. P. 5187–5191.
- Hoogland S.H.A., Marks H.* Developments in pluripotency: a new formative state // *Cell Res.* 2021. V. 31. № 5. P. 493–494.
- Huang Y. et al.* *In Vivo* Differentiation Potential of Epiblast Stem Cells Revealed by Chimeric Embryo Formation // *Cell Rep.* 2012. V. 2. № 6. P. 1571–1578.
- Huelsken J. et al.* Requirement for β -Catenin in Anterior-Posterior Axis Formation in Mice // *J. Cell Biol.* 2000. V. 148. № 3. P. 567–578.
- Ishitani T. et al.* The TAK1–NLK–MAPK-related pathway antagonizes signalling between β -catenin and transcription factor TCF // *Nat.* 1999 3996738. 1999. V. 399. № 6738. P. 798–802.
- Ishitani T., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K.* Regulation of Lymphoid Enhancer Factor 1/T-Cell Factor by Mitogen-Activated Protein Kinase-Related Nemo-Like Kinase-Dependent Phosphorylation in Wnt/ β -Catenin Signaling // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. № 4. P. 1379–1389.
- Johnson M.H., Ziomek C.A.* The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula // *Cell*. 1981. V. 24. № 1. P. 71–80.
- Kang M., Garg V., Hadjantonakis A.K.* Lineage Establishment and Progression within the Inner Cell Mass of the Mouse Blastocyst Requires FGFR1 and FGFR2 // *Dev. Cell*. 2017. V. 41. № 5. P. 496–510.e5.
- Kemler R.* From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion // *Trends Genet.* 1993. V. 9. № 9. P. 317–321.
- Khoo T.S. et al.* Retention of Somatic Memory Associated with Cell Identity, Age and Metabolism in Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Reprogramming // *Stem Cell Rev. Reports*. 2020. V. 16. № 2. P. 251–261.
- Kinoshita M. et al.* Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency // *Cell Stem Cell*. 2021. V. 28. № 3. P. 453–471.e8.
- Kinoshita M., Smith A.* Pluripotency Deconstructed // *Dev. Growth Differ.* 2018. V. 60. № 1. P. 44–52.
- Kojima Y. et al.* The Transcriptional and Functional Properties of Mouse Epiblast Stem Cells Resemble the Anterior Primitive Streak // *Cell Stem Cell*. 2014. V. 14. № 1. P. 107–120.
- Korotkevich E. et al.* The Apical Domain Is Required and Sufficient for the First Lineage Segregation in the Mouse Embryo // *Dev. Cell*. 2017. V. 40. № 3. P. 235–247.e7.
- Kuan I. et al.* EpEX/EpCAM and Oct4 or Klf4 alone are sufficient to generate induced pluripotent stem cells through STAT3 and HIF2 α OPEN // 2017.
- Kunath T. et al.* FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment // *Development*. 2007. V. 134. № 16. P. 2895–2902.
- Kurimoto K. et al.* Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice // *Genes Dev.* 2008. V. 22. № 12. P. 1617–1635.
- Le R. et al.* Dcaf11 activates Zscan4-mediated alternative telomere lengthening in early embryos and embryonic stem cells // *Cell Stem Cell*. 2021. V. 28. № 4. P. 732–747.e9.
- Li M. et al.* A cut above the rest: Targeted genome editing technologies in human pluripotent stem cells // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. № 8. P. 4594–4599.
- Li M., Belmonte J.C.I.* Ground rules of the pluripotency gene regulatory network // *Nat. Rev. Genet.* 2017 183. 2017. V. 18. № 3. P. 180–191.
- Lim H.Y.G. et al.* Keratins are asymmetrically inherited fate determinants in the mammalian embryo // *Nat.* 2020 5857825. 2020. V. 585. № 7825. P. 404–409.
- Lim H.Y.G., Plachta N.* Cytoskeletal control of early mammalian development // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2021 228. 2021. V. 22. № 8. P. 548–562.
- Liu G. et al.* Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications // *Stem Cell Rev. Reports*. 2020. V. 16. № 1.
- Liu Z. et al.* Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer // *Cell*. 2018. V. 172. № 4. P. 881–887.e7.
- Lloyd S., Fleming T.P., Collins J.E.* Expression of Wnt genes during mouse preimplantation development // *Gene Expr. Patterns*. 2003. V. 3. № 3. P. 309–312.
- Lyashenko N. et al.* Differential requirement for the dual functions of β -catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation // *Nat. Cell Biol.* 2011 137. 2011. V. 13. № 7. P. 753–761.
- Martello G. et al.* Esrrb Is a Pivotal Target of the Gsk3/Tcf3 Axis Regulating Embryonic Stem Cell Self-Renewal // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 11. № 4. P. 491–504.
- Martin G.R.* Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981. V. 78. № 12. P. 7634–7638.

- Masaki H. et al.* Inhibition of Apoptosis Overcomes Stage-Related Compatibility Barriers to Chimera Formation in Mouse Embryos // *Cell Stem Cell*. 2016. V. 19. № 5. P. 587–592.
- Meharwade T. et al.* Cross-activation of the FGF, TGF- β and WNT pathways constrains BMP4-mediated induction of the Totipotent state in mouse embryonic stem cells // *bioRxiv*. 2022. P. 2022.04.15.488509.
- Mishina Y. et al.* Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. // *Genes Dev*. 1995. V. 9. № 24. P. 3027–3037.
- Mohamed O.A., Clarke H.J., Dufort D.* β -catenin signaling marks the prospective site of primitive streak formation in the mouse embryo // *Dev. Dyn*. 2004. V. 231. № 2. P. 416–424.
- Molè M.A. et al.* Integrin β 1 coordinates survival and morphogenesis of the embryonic lineage upon implantation and pluripotency transition // *Cell Rep*. 2021. V. 34. № 10. P. 108834.
- Molotkov A. et al.* Distinct Requirements for FGFR1 and FGFR2 in Primitive Endoderm Development and Exit from Pluripotency // *Dev. Cell*. 2017. V. 41. № 5. P. 511–526.e4.
- Morata Tarifa C. et al.* Chimeras for the twenty-first century // *Crit. Rev. Biotechnol*. 2020. V. 40. № 3. P. 283–291.
- Mossahebi-Mohammadi M. et al.* FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency // *Front. Cell Dev. Biol*. 2020. V. 8. P. 79.
- Muhr J., Ackerman K.M.* Embryology, Gastrulation. Stat-Pearls Publishing. 2022.
- Murray P., Edgar D.* Regulation of Programmed Cell Death by Basement Membranes in Embryonic Development // *J. Cell Biol*. 2000. V. 150. № 5. P. 1215–1221.
- Neagu A. et al.* *In vitro* capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states // *Nat. Cell Biol*. 2020. V. 22. № 5. P. 534–545.
- Neavin D. et al.* Single cell eQTL analysis identifies cell type-specific genetic control of gene expression in fibroblasts and reprogrammed induced pluripotent stem cells // *Genome Biol*. 2021. V. 22. № 1. P. 1–19.
- Nichols J. et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 // *Cell*. 1998. V. 95. № 3. P. 379–391.
- Nichols J., Gardner R.L.* Heterogeneous differentiation of external cells in individual isolated early mouse inner cell masses in culture // *Development*. 1984. V. 80. № 1. P. 225–240.
- Niwa H. et al.* A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells // *Nat*. 2009. V. 460. № 7251. P. 118–122.
- Ohtsuka S., Nakai-Futatsugi Y., Niwa H.* LIF signal in mouse embryonic stem cells // *JAK-STAT*. 2015. V. 4. № 2. P. 1–9.
- Okae H. et al.* Derivation of Human Trophoblast Stem Cells // *Cell Stem Cell*. 2018. V. 22. № 1. P. 50–63.e6.
- Okano M. et al.* DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development // *Cell*. 1999. V. 99. № 3. P. 247–257.
- Okita K., Yamanaka S.* Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 2011. V. 366. № 1575. P. 2198–207.
- Oshima R.G. et al.* Intermediate filament protein synthesis in preimplantation murine embryos // *Dev. Biol*. 1983. V. 99. № 2. P. 447–455.
- Pachnis V., Mankoo B., Costantini F.* Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis // *Development*. 1993. V. 119. № 4.
- Papaioannou V.E., Gardner R.L., McBurney M.W.* Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis // *J. Embryol. Exp. Morphol*. 1978. V. 44.
- Pauken C.M., Capco D.G.* Regulation of cell adhesion during embryonic compaction of mammalian embryos: Roles for PKC and β -catenin // *Mol. Reprod. Dev*. 1999. V. 54. № 2. P. 135–144.
- Pierce G.B.* Teratocarcinoma // *Cancer Markers*. Totowa, NJ: Humana Press, 1980. P. 1–36.
- Pierce G.B.* The cancer cell and its control by the embryo. Rous-Whipple Award lecture. // *Am. J. Pathol*. 1983. V. 113. № 1. P. 117.
- Qiu D. et al.* Klf2 and Tfcp2l1, Two Wnt/ β -Catenin Targets, Act Synergistically to Induce and Maintain Naive Pluripotency // *Stem Cell Reports*. 2015. V. 5. № 3. P. 314–322.
- Raz R. et al.* Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. № 6. P. 2846–2851.
- Reiner J.M.* Organisers and Genes. By C.H. Waddington. 1940. Cambridge: at The University Press; N.Y.: The Macmillan Company // *Philos. Sci*. 1941. V. 8. № 3.
- Reyes de Mochel N.S. et al.* BMP signaling is required for cell cleavage in preimplantation-mouse embryos // *Dev. Biol*. 2015. V. 397. № 1. P. 45–55.
- Rivera-Pérez J.A., Magnuson T.* Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3 // *Dev. Biol*. 2005. V. 288. № 2. P. 363–371.
- Rodda D.J. et al.* Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2 // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280. № 26.
- Saitou M., Yamaji M.* Primordial Germ Cells in Mice // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2012. V. 4. № 11. P. a008375–a008375.
- Sato N. et al.* Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor // *Nat. Med*. 2004. V. 10. № 1. P. 55–63.
- Schindler M. et al.* Agarose microgel culture delineates lumenogenesis in naive and primed human pluripotent stem cells // *Stem Cell Reports*. 2021. V. 16. № 5. P. 1347–1362.
- Schoeftner S., Blasco M.A.* A “higher order” of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs // *EMBO J*. 2009. V. 28. № 16. P. 2323–2336.
- Seoane J., Le H. Van, Massagué J.* Myc suppression of the p21Cip1 Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage // *Nature*. 2002. V. 419. № 6908. P. 729–734.
- Shahbazi M.N. et al.* Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues // *Nat. Cell Biol*. 2016. V. 18. № 6. P. 700–708.

- Shahbazi M.N. et al.* Pluripotent state transitions coordinate morphogenesis in mouse and human embryos // *Nat.* 2017 5527684. 2017. V. 552. № 7684. P. 239–243.
- Shakiba N. et al.* CD24 tracks divergent pluripotent states in mouse and human cells // *Nat. Commun.* 2015 61. 2015. V. 6. № 1. P. 1–11.
- Shao Y. et al.* A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development // *Nat. Commun.* 2017 81. 2017. V. 8. № 1. P. 1–15.
- Shelby H., Shelby T., Wernig M.* Somatic Lineage Reprogramming // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2022. V. 14. № 10. P. a040808.
- Smith A.* Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum // *Development.* 2017. V. 144. № 3. P. 365–373.
- Smith A.G. et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides // *Nature.* 1988. V. 336. № 6200. P. 688–690.
- Sokol S.Y.* Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling // *Development.* 2011. V. 138. № 20. P. 4341–4350.
- Stadtfield M. et al.* A reprogrammable mouse strain from gene-targeted embryonic stem cells // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. № 1. P. 53–55.
- Stadtfield M., Hochedlinger K.* Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications // *Genes Dev.* 2010. V. 24. № 20. P. 2239–2263.
- Stavridis M.P. et al.* A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification // *Development.* 2007. V. 134. № 16. P. 2889–2894.
- Stevens L.C.* The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos // *Dev. Biol.* 1970a. V. 21. № 3. P. 364–382.
- Stevens L.C.* Experimental Production of Testicular Teratomas in Mice of Strains 129, A/He, and Their F1 Hybrids // *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 1970b. V. 44. № 4. P. 923–929.
- Stevens L.C.* Experimental Production of Testicular Teratomas in Mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. United States.* 1964. V. 52. P. 654–661.
- Stevens L.C., Little C.C.* Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1954. V. 40. № 11. P. 1080–1087.
- Storm M.P. et al.* Regulation of nanog expression by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling in murine embryonic stem cells // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 9. P. 6265–6273.
- Storm M.P. et al.* Characterization of the Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Transcriptome in Murine Embryonic Stem Cells: Identification of Novel Regulators of Pluripotency // *Stem Cells.* 2009. V. 27. № 4. P. 764–775.
- Sugimoto M. et al.* A Simple and Robust Method for Establishing Homogeneous Mouse Epiblast Stem Cell Lines by Wnt Inhibition // *Stem Cell Reports.* 2015. V. 4. № 4. P. 744–757.
- Tabar V., Studer L.* Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress // *Nat. Rev. Genet.* 2014. V. 15. № 2. P. 82–92.
- Takahashi K. et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors // *Cell.* 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
- Takahashi K., Yamanaka S.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors // *Cell.* 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
- Tam P.P., Loebel D.A., Tanaka S.S.* Building the mouse gastrula: signals, asymmetry and lineages // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006. V. 16. № 4. P. 419–425.
- Tanaka S.S. et al.* IFITM/mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion // *Dev. Cell.* 2005. V. 9. № 6. P. 745–756.
- Tang F. et al.* Tracing the Derivation of Embryonic Stem Cells from the Inner Cell Mass by Single-Cell RNA-Seq Analysis // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 6. № 5. P. 468–478.
- Taniguchi K. et al.* Lumen Formation Is an Intrinsic Property of Isolated Human Pluripotent Stem Cells // *Stem Cell Reports.* 2015. V. 5. № 6. P. 954–962.
- Tesar P.J. et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells // *Nat.* 2007 4487150. 2007. V. 448. № 7150. P. 196–199.
- Theunissen T.W. et al.* Systematic Identification of Culture Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency // *Cell Stem Cell.* 2014. V. 15. № 4. P. 471–487.
- Thomson J.A. et al.* Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts // *Science (80-.)*. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
- Toyooka Y. et al.* Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture // *Development.* 2008. V. 135. № 5. P. 909–918.
- Toyooka Y.* Trophoblast lineage specification in the mammalian preimplantation embryo // *Reprod. Med. Biol.* 2020. V. 19. № 3. P. 209–221.
- Vallier L., Alexander M., Pedersen R.A.* Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells // *J. Cell Sci.* 2005. V. 118. № 19. P. 4495–4509.
- Veillard A.-C. et al.* Stable Methylation at Promoters Distinguishes Epiblast Stem Cells from Embryonic Stem Cells and the In Vivo Epiblasts // *Stem Cells Dev.* 2014. V. 23. № 17. P. 2014–2029.
- Waddington C.H.* The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. With an appendix by H. Kacser. // *Strateg. genes A Discuss. some some Asp. Theor. Biol. With an Append. by H. Kacser.* 1957. V. 8. № 3.
- Wallingford M.C., Angelo J.R., Mager J.* Morphogenetic analysis of peri-implantation development // *Dev. Dyn.* 2013. V. 242. № 9. P. 1110–1120.
- Wang X. et al.* Epigenetic Reprogramming During Somatic Cell Nuclear Transfer: Recent Progress and Future Directions // *Front. Genet.* 2020. V. 11. № March. P. 1–13.
- Wang X. et al.* Formative pluripotent stem cells show features of epiblast cells poised for gastrulation // *Cell Res.* 2021. V. 31. № 5. P. 526–541.
- Weberling A., Zernicka-Goetz M.* Trophectoderm mechanics direct epiblast shape upon embryo implantation // *Cell Rep.* 2021. V. 34. № 3. P. 108655.

- Wernig M. et al.* c-Myc Is Dispensable for Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 2. № 1. P. 10–12.
- Wilmut I. et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // *Nat.* 1997 3856619. 1997. V. 385. № 6619. P. 810–813.
- Wobus A.M. et al.* Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo // *Exp. Cell Res.* 1984. V. 152. № 1. P. 212–219.
- Yamamoto M. et al.* Nodal antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo // *Nat.* 2004 4286981. 2004. V. 428. № 6981. P. 387–392.
- Yamanaka Y., Lanner F., Rossant J.* FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst // *Development*. 2010. V. 137. № 5. P. 715–724.
- Yanagida A. et al.* Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation // *Cell Stem Cell*. 2021. V. 28. № 6. P. 1016–1022.e4.
- Ye S. et al.* Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfcp2l1 // *EMBO J.* 2013. V. 32. № 19. P. 2548–2560.
- Yeh C.Y. et al.* Capturing Pluripotency and Beyond // *Cells*. 2021. V. 10. P. 3558. 2021. V. 10. № 12. P. 3558.
- Yu L. et al.* Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells // *Nat.* 2021 5917851. 2021. V. 591. № 7851. P. 620–626.
- Zalzman M. et al.* Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells // *Nat.* 2010 4647290. 2010. V. 464. № 7290. P. 858–863.
- Zhou H. et al.* Cell Stem Cell Brief Report Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins // *Stem Cell*. V. 4. P. 381–384.

Transformation of Pluripotency States during Morphogenesis of Mouse and Human Epiblast

V. K. Abdye^{1, *}, E. V. Alpeeva¹, E. N. Kalistratova², E. A. Vorotelyak¹, and A. V. Vasiliev^{1, 2}

¹*Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

²*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia*

*e-mail: mailto:vepa@gmail.com

The pluripotent status of a cell *in vivo* is spatio-temporally regulated within embryogenesis and is determined by the processes of self-renewal, endless proliferation and differentiation into all cell types of the body. Previously, the pluripotency was characterized using teratocarcinoma cells. Then this term was applied to the embryonic cells of the preimplantation mouse embryo. Preimplantationally formed mouse and human pluripotent stem cells (PSCs) appear to exist until gastrulation. One of the main events in the early mammalian development is the differentiation of the inner cell mass of the blastocyst (ICM) into a hypoblast and an epiblast, which develops into the embryo itself. Continuous and dynamic transformation of pluripotency states in development coincides with the morphogenetic processes, which are involved in the formation and maturation of the epiblast. Thus, blastocyst ICM cells differ in epigenetic and transcription patterns from their daughter cells forming the peri/post-implantation epiblast. With the onset of gastrulation movements, the maturation of epiblast cells ends with their differentiation into cells of three germ layers. This review considers the historical aspects of the study of cell pluripotency, various sources of PSCs, mechanisms and signaling pathways that support self-renewal and pluripotency in PSC cultures. In addition, we summarize and conceptualize data on morphogenetic processes that are involved in the formation of naive ICM cells *in vivo* and the subsequent maturation of mouse and human epiblast cells associated with the transformation of their pluripotency states.

Keywords: mammalian embryogenesis, morphogenesis, blastocyst ICM, epiblast, BMP, FGF, WNT signaling pathways, pluripotent stem cells, iPSCs, ESCs, naive PSCs, primed PSCs, reprogramming

КСИЛОГЕНЕЗ, ФОТОСИНТЕЗ И ДЫХАНИЕ ДЕРЕВЬЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ, РАСТУЩИХ В ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ (РОССИЯ)

© 2023 г. Г. Ф. Антонова^а, *, В. В. Стасова^а, Г. Г. Суворова^б, В. А. Осколков^б

^аИнститут леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, ул. Академгородок, 50, Красноярск, 660036 Россия

^бСибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, ул. Лермонтова, 132, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: antonova_cell@mail.ru

Поступила в редакцию 06.04.2023 г.

После доработки 18.07.2023 г.

Принята к публикации 06.08.2023 г.

Основными факторами, влияющими на образование древесины у растений, являются фотосинтез и дыхание, обеспечивающие ростовые процессы ассимилятами и энергией. Температура и осадки влияют на фотосинтез и дыхание и, соответственно, на ростовые процессы в дереве. Целью нашего исследования было охарактеризовать взаимосвязь ростовых процессов (активность камбия и депонирование биомассы) в стволах *Pinus sylvestris* L. (сосны обыкновенной) с фотосинтетической активностью кроны и дыханием ствола в годы с контрастными летне-погодными условиями. Формирование клеток ксилемы и флоэмы, накопление биомассы клеточных стенок, продуктивность фотосинтеза и ствольное дыхание изучали у деревьев *P. sylvestris*, произрастающей в Восточной Сибири (Россия). Мы оценивали количество клеток в зонах дифференциации и морфологические параметры клеток, продуцируемых камбием; определяли на отдельных этапах формирования древесины годичных колец активность камбия, накопление биомассы в стенках трахеид и их связь с фотосинтетической продуктивностью кроны и затратами на ствольное дыхание. Оказалось, что деление клеток камбия в сторону ксилемы или флоэмы зависит от сочетания температуры и осадков в отдельные периоды сезона, а также от реакции фотосинтеза и дыхания на эти факторы. Накопление биомассы имело бимодальный характер с максимумами в июне (развитие ранней древесины) и преимущественно в августе (развитие толстостенных поздних трахеид). Это соответствовало оптимальному сочетанию температуры и влажности воздуха, обеспечивающему достаточный приток ассимилятов и их низкий расход на дыхание. Мы также показали, что камбиальная активность и накопление биомассы в стенках клеток годичных колец древесины зависят от кумулятивного влияния температуры и осадков на фотосинтез и дыхание ствола в ходе вегетационного периода. Варьирование внешних факторов изменяет баланс между поступлением фотоассимилятов и их утилизацией. В результате фотоассимиляты используются не только для синтеза биомассы клеточных стенок, но и частично превращаются в запасные вещества, в частности, в крахмал. Наше исследование расширяет представления о процессах развития растения, которые приводят к формированию древесины под воздействием внешних факторов.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L., активность камбия, биомасса, фотосинтез, дыхание, температура, осадки

DOI: 10.31857/S0475145023050038, **EDN:** KABNSZ

ВВЕДЕНИЕ

Продуктивность древесных растений, их рост и накопление биомассы годичных колец зависят от углеродного баланса продуктов фотосинтеза и их затрат на дыхание, связанных как с ростом новообразованных, так и поддержанием живых органов и тканей в стебле. Было изучено влияние температурного и водного стресса на фотосинтез и дыхание растущих деревьев (Gordon, Larson, 1968; Загирова, Кузин, 1998; Болондинский, Кай-

бияйнен, 2003; Deslauriers, Morin, 2005; Gruber et al., 2009; Begum et al., 2013; Deslauriers et al., 2014; Суворова, 2009; Alam et al., 2017; Chan et al., 2018). Следующие признаки были использованы для установления связи между продуктивностью роста деревьев и затратами на дыхание за сезон: диаметр ствола дерева, ширина радиального прироста на образцах, извлеченных из ствола дерева (Ryan 1990; Lavigne et al., 2004; Zha et al., 2004; Acosta et al., 2008; Chan et al., 2018), объем живых

клеток заболони (Ryan, Waring, 1992), количество дифференцирующихся клеток ксилемы (Lavigne et al., 2004; Gruber et al., 2009; Zabuga, Zabuga, 2014), массу проростков или вегетативных органов (Забуга, Забуга, 2006; Zabuga, Zabuga, 2014).

У хвойных реальная биомасса содержится в стенках трахеид ранней и поздней древесины, радиальный диаметр и толщина стенок которых различны. Их формирование и развитие в течение вегетационного периода происходят раздельно во времени и пространстве, и каждый из ростовых процессов по-разному реагирует на внешние факторы в соответствии с физиологическим состоянием клеток и биохимическими реакциями в клетках (Antonova, Stasova, 1993; 2015). Очевидно, что потребность в продуктах фотосинтеза (ассимилятах) для создания структуры клеточных стенок и затраты на дыхание (поток CO_2) также должны быть разными. Следует ожидать изменения не только общего дыхания, дыхания роста и дыхания поддержания, но и соотношения между дыханием и фотосинтезом в зависимости от внешних условий и степени развития клеток ксилемы. Понимание клеточных процессов и вклада в них фотосинтеза, контролируемого температурой, необходимо для лучшего понимания механизмов роста деревьев (Ryan, 2011).

Цена стволового дыхания может также зависеть от объема живых клеток флоэмы как транспортной сети для доставки углеводов из фотосинтезирующих и/или запасующих тканей в зоны активного роста и метаболизма (Savage et al., 2016). У европейской ели из северной Швеции 75 и 80% объема живых клеток в стеблях находится во флоэме (Stockfors, Linder, 1998). В стволах 200-летних деревьев сосны обыкновенной, произрастающих в России (60° с.ш., 89° в.д.), количество живых клеток в лубе составляло 55–69% и зависело от условий вегетационного периода и скорости роста по диаметру (Астраханцева, Антонова, 2011).

Отложение биомассы в стенках трахеид ранней и поздней древесины при формировании годовых колец в стволах сосны обыкновенной в Восточной Сибири и связь этих процессов с фотосинтетической продуктивностью кроны и дыханием ствола в зависимости от температуры воздуха и осадков изучались для погодных условий в 1999 г. (Суворова и др., 2015). Климатические условия региона очень контрастны. Летом, когда протекают основные ростовые процессы, осадки и температура могут сильно различаться в отдельные периоды вегетационного сезона. По сравнению с 1999 г., в сезоне 2001 г. в июне были очень высокие температуры, а в июле выпало необычно много осадков. Для лучшего понимания взаимосвязи между камбиальной активностью, накопле-

нием биомассы в клетках ксилемы, фотосинтезом и дыханием важно определить динамику этих процессов в течение вегетационного периода при различных погодных условиях.

Целью исследования было: 1) оценить активность камбия и депонирование биомассы в стволах *Pinus sylvestris* L. и взаимосвязь этих процессов с фотосинтетической активностью кроны и дыханием ствола в отдельные сезонные периоды 2001 г.; 2) сравнить камбиальную активность и накопление биомассы в контрастных летне-погодных условиях 1999 и 2001 гг. и проанализировать зависимость процессов от активности фотосинтеза и стволового дыхания при формировании годовых колец в эти сезоны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Формирование годовых колец наблюдали у 25-летних деревьев *Pinus sylvestris* L., произрастающих в искусственном насаждении на экспериментальной территории Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН), расположенной в 80 км от юго-западного побережья оз. Байкал (Россия).

Из стволов 10–12 сосен в сезоны 1999 и 2001 гг. специальным пробойником извлекали керны (диаметром 0.8 см) каждые 8–11 дней на высоте около 1.3 м над землей, избегая кольцевания ствола. Отмершую наружную кору удаляли перед отбором проб. Образцы содержали все слои сформировавшейся флоэмы и не менее 2–3 сформировавшихся слоев ксилемы. На место отбора проб сразу наносили масляную краску, защищающую дерево от контакта с кислородом воздуха и вредителями.

Количество клеток в 4–5 радиальных рядах годовых колец древесины двух предыдущих сезонов подсчитывали на срезах кернов, окрашенных 0.05% водным раствором крезил-виолета (Антонова, Шебеко, 1981). Для дальнейших наблюдений использовали десять деревьев, у которых количество клеток в радиальных рядах описывалось кривой Гаусса. Такой подход к выбору деревьев минимизирует стандартные отклонения, поскольку выбранные деревья одинаково реагируют на внешние воздействия. Этот метод отбора деревьев и отбора проб использовался ранее (Antonova, Stasova, 1993; 1997).

На двух поперечных срезах каждого керна подсчитывали количество клеток флоэмы и ксилемы в зонах роста клеток расширением, вторичного утолщения стенки и в сформированных слоях ксилемы. Все клетки, имеющие примерно одинаковые малые радиальные размеры, оценивались как клетки камбиальной зоны. Начало видимого

увеличения диаметра клеток принимали за начало радиального расширения клеток. Завершение роста радиального диаметра и начало формирования вторичной клеточной стенки определяли по появлению границ ямок и закруглению углов клеток (Murmanis, Sachs, 1969). Окончание зоны созревания определяли по отсутствию видимых следов цитоплазмы в просветах трахеид. Все измерения проводились на 8–10 радиальных рядах (по 3–4 ряда каждого керна) трахеид с большим радиальным диаметром, поскольку они отражают реальные ростовые процессы. Это важно, поскольку трахеиды (веретеновидные клетки) проникают между концами других клеток при их интрузивном росте, и на поперечных срезах могут присутствовать клетки с узкими радиальными диаметрами.

На срезах подсчитывали клетки в камбиальной зоне, новообразованной флоэме и ксилеме в зонах роста расширением, вторичного утолщения стенки и зонах зрелой ксилемы. Полученные данные использовали для оценки количества начальных делений клеток камбием в сторону ксилемы или флоэмы и на этой основе активности камбия в каждый период по методу (Mahmood, 1971). Согласно этому методу, одно деление инициальной клетки камбия дает две материнские клетки ксилемы, которые, в свою очередь, дают четыре клетки ксилемной ткани. Напротив, одно деление инициали камбия в сторону флоэмы дает две клетки флоэмы. Количество клеток в радиальных рядах подсчитывали с помощью светового микроскопа при увеличении в 100 раз.

На каждой стадии дифференциации измеряли радиальные и тангентальные размеры трахеид и их люменов с помощью окуляр-микрометра при 950-кратном увеличении. Число измерений было 70–80 (десять деревьев, по два среза каждой сердцевины и 3–4 ряда трахеид). Радиальные и тангентальные размеры трахеид в зоне вторичного утолщения использовали для расчета площади поперечного сечения стенок клеток. Площади принимали за показатель накопленной в стенках клеток биомассы. Этот показатель использовался в наших предыдущих исследованиях (Antonova, Stasova, 1993; 1997) для оценки биомассы, отложенной в клеточных стенках древесины годовых колец. Разница площадей поперечного сечения клеточных стенок между последующим и наблюдаемым периодами представляет собой биомассу, накопленную за отдельный период вегетации.

Поглощение углекислого газа кронами деревьев и дыхание стволов измеряли на 10-летних соснах, растущих в древостое, расположенном близко к указанному выше. Поглощение CO_2 2х-летними побегами регистрировали каждый дневной час в

течение 3–4 дней каждую неделю. Данные суммировались: 1) по дням каждого периода, 2) по периодам.

Дыхание ствола дерева регистрировали на высоте 1.3 м в течение суток многоканальным прибором, смонтированным на базе инфракрасного газоанализатора “Инфралит-4” (Щербатюк, 1990). Данные, полученные за каждый час, суммировались: 1) за дневное и ночное время каждого периода, 2) за сутки каждого периода, 3) за период. Данные по дыханию нормализовали к 10°C . Температурный коэффициент дыхания (Q_{10}) измеряли в середине октября, когда все ростовые процессы в дереве завершились.

Температура воздуха и осадки регистрировались каждый час, а затем рассчитывалась как средняя за сутки и за период. Связь составляющих продукционных процессов (накопление биомассы, фотосинтез, дыхание) с погодными условиями каждого сезонного периода рассчитывали с помощью программы MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Камбиальная активность и погодные условия

Вегетационные периоды 1999 и 2001 гг. различались по температуре воздуха и осадкам по летним погодным условиям. В 2001 г. высокая температура воздуха наблюдалась в июне (дневная температура до 30°C) и низкая – в июле. В июне 2001 г. среднемесячная температура воздуха в июне была на 4°C выше, а в июле менее чем на 1.5°C ниже по сравнению с июлем 1999 г. В 1999 и 2001 гг. количество осадков в июне составило 129 мм и 51 мм, в июле – 139 и 246.3 мм, в августе – 29.3 и 80.7 мм соответственно. Средние значения температуры и осадков в отдельные периоды 1999 (а) и 2001 (б) лет представлены на рис. 1.

Камбиальная активность, определенная по количеству делений камбиальных инициалей в сторону ксилемы и/или флоэмы, и накопление биомассы, рассчитанное по приросту площади поперечного сечения клеточной стенки, в 2001 г. представлены на рис. 2.

На рис. 2 и последующих рисунках показана продукция клеток ксилемы и флоэмы камбием в первые дни июня. Однако очевидно, что реакция камбия происходила в первой-второй декаде мая, когда температура воздуха колебалась от 8 до 14°C . Для сосны обыкновенной дневных температур выше порога 5°C достаточно, чтобы инициировать камбиальную активность (Seo et al., 2008). У хвойных, таких как *Larix decidua*, *P. cembra* и *P. abies*, камбиальная активность и дифференциация ксилемы происходят выше порога среднесуточной температуры, который колебался от 5.6 до

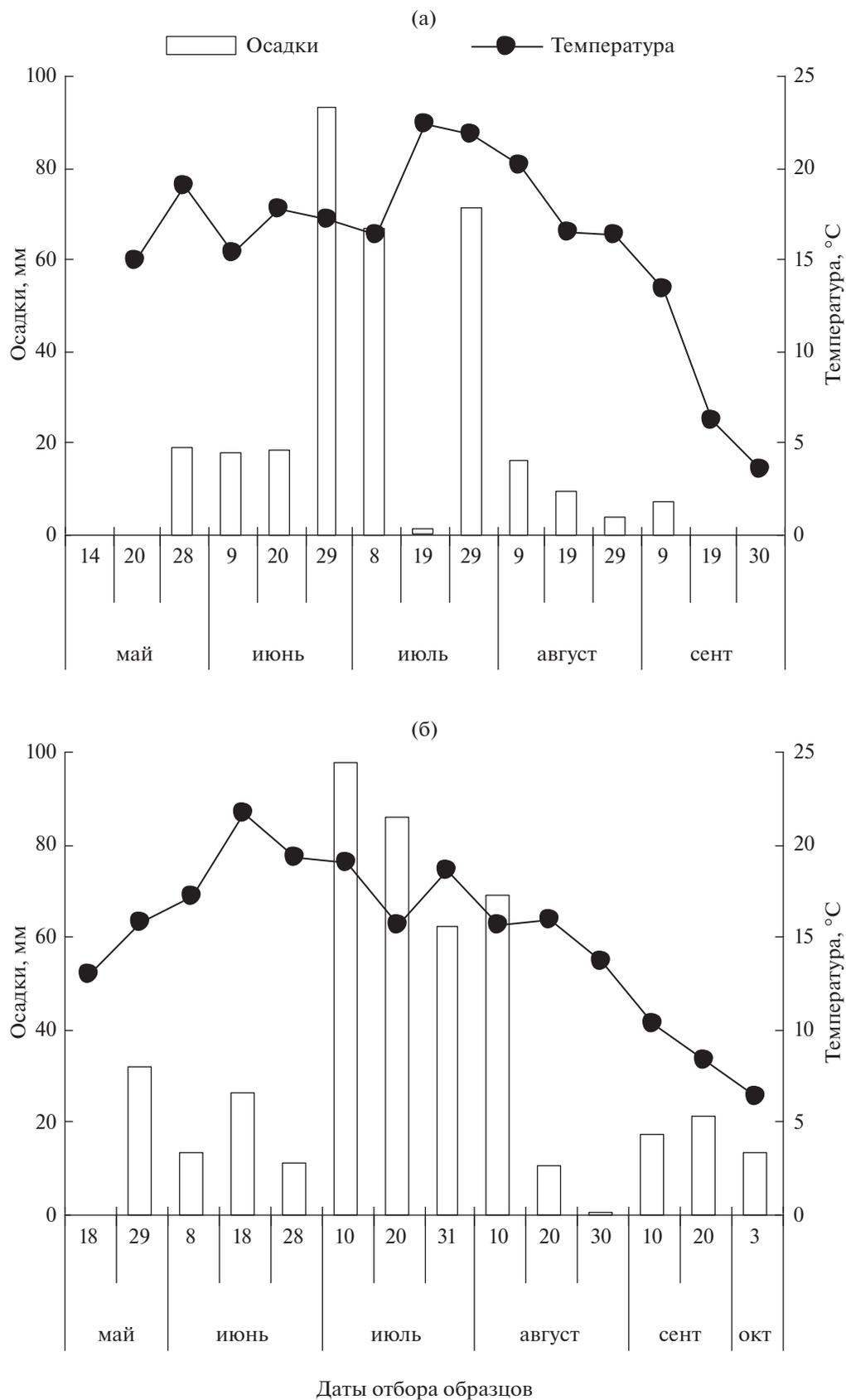


Рис. 1. Средние значения температуры и сумма осадков в отдельные периоды 1999 (а) и 2001 (б) гг.

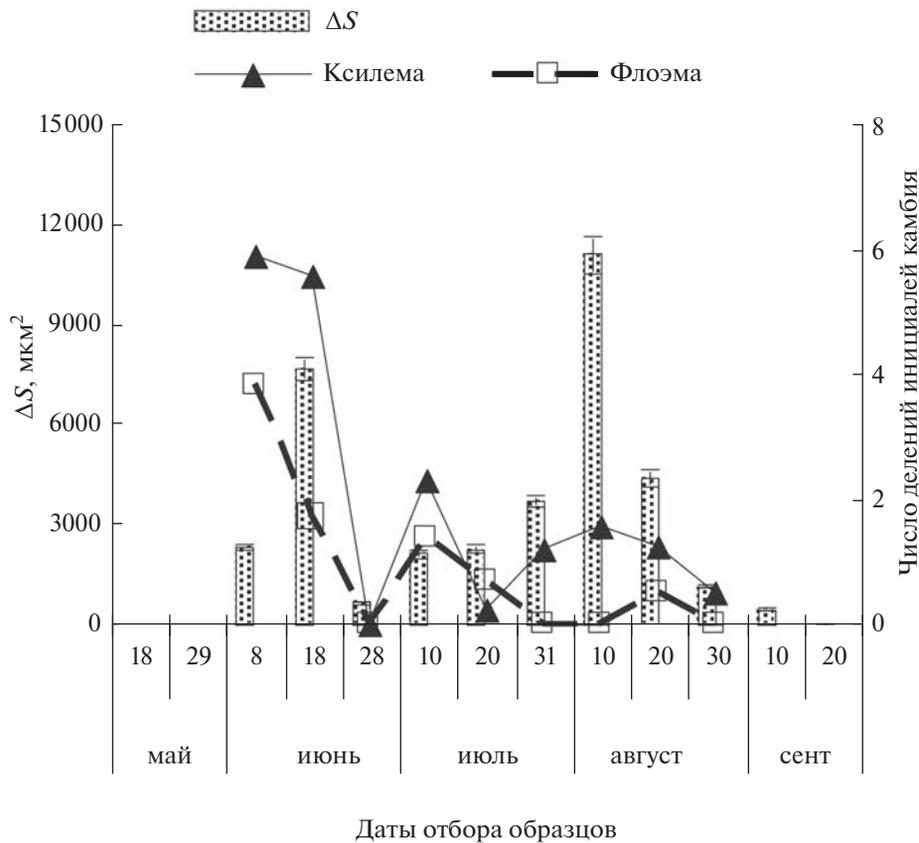


Рис. 2. Камбиальная активность, как число делений инициальных клеток камбия в сторону ксилемы и/или флоэмы, и прирост площади поперечного сечения клеточной стенки (ΔS , мкм²) в отдельные периоды 2001 г.

8.5°C (Rossi et al., 2007, 2008). Пороговые температуры различаются для разных видов, даже если деревья растут в одинаковых климатических условиях (Begum et al., 2013). По нашим наблюдениям (Antonova, Stasova, 1993; 2015) оптимальная дневная температура для деления камбиальных клеток в стволе сосны обыкновенной составляет 18–20°C.

Температура воздуха (17–18°C) в начале июня 2001 г. и достаточное накопление влаги в почве в зимне-весенний период стимулировали деление камбиальных инициалей как в сторону ксилемы, так и в сторону флоэмы (рис. 2). Повышение среднесуточной температуры воздуха до $T = 21.7^\circ\text{C}$ и дневной температуры до 30°C во второй декаде июня (рис. 1) провоцировало резкое снижение активности камбия (рис. 2). Повышенная температура воздуха особенно негативно влияет на образование клеток флоэмы. Температура воздуха выше 15°C угнетает деление клеток камбия в сторону флоэмы (Antonova, Stasova, 2015). Повышение максимальной суточной температуры до 27–29°C и значительное уменьшение количества осадков в

последней декаде июня резко снижали продукцию камбием клеток флоэмы и ксилемы (рис. 2). Обильные осадки в начале июля (рис. 1) стимулировали деление инициалей камбия в сторону флоэмы. Последние производные флоэмы, продуцируемые камбием, появились в середине августа.

Деление камбия в сторону ксилемы особенно активно происходило в начале июня, в течение всего июля и в начале августа 2001 г., тогда как в 1999 г. это явление происходило только в июне и августе (рис. 2). Высокая активность камбия в начале июня 2001 г. была обусловлена умеренной температурой воздуха и достаточной влажностью почвы. В начале июля активность камбия возросла в результате обильных осадков и дневной температуры воздуха, не превышающей 21–22°C (рис. 1). Это находится в диапазоне оптимальном для транспорта веществ через плазмалемму (20–25°C) (Carr, 1976; Gamalei et al., 1996). Сильные осадки до и после конца июля–начала августа 2001 г. в сочетании с оптимальной температурой воздуха способствовали образованию клеток ксилемы в этот период.

Влияние температуры на ростовые процессы

Деление камбиальных инициалей в сторону ксилемы объясняется специфичным сочетанием факторов в каждой 8–11-дневной части вегетационного периода. В течение всего вегетационного периода 2001 г. продукция клеток ксилемы имела слабую положительную связь с температурой воздуха ($R^2 = 0.25$, $P < 0.05$), тогда как в июле и августе связь была сильной ($R^2 = 0.84$, $P < 0.001$). В июле это может быть обусловлено обильными осадками, а в августе – низкими температурами. У пихты бальзамической в Канаде (Квебек) влияние температуры воздуха на образование трахеид было отмечено во время развития ранней древесины (с конца мая до середины июля) (Deslauriers, Morin, 2005).

В отличие от ксилемы флоэма имела отрицательную корреляцию с температурой воздуха. В засушливый 1999 г. температура воздуха отрицательно коррелировала ($R^2 = 0.48$ при $P < 0.05$) с делением камбиальных инициалей в сторону флоэмы (Суворова и др., 2015). В 2001 г., напротив, наблюдали увеличение числа клеток флоэмы, особенно в июле. Как отмечалось (Gričar, Čufar, 2008; Fajstavr et al., 2020), формирование флоэмы контролируется скорее эндогенными причинами, чем факторами окружающей среды. По данным Fajstavr et al. (2020), ткань флоэмы менее чувствительна к экзогенным факторам. То же было отмечено (Miller et al., 2020) при изучении сезонной динамики формирования ксилемы и флоэмы ели европейской по градиенту высот. У сосны обыкновенной формирование флоэмы начинается при более низкой температуре воздуха по сравнению с клетками ксилемы (Астраханцева, Антонова, 2011; Swidrak et al., 2014).

Дневные и ночные температуры воздуха в каждый из периодов вегетации по-разному влияли на деление камбия в сторону ксилемы и/или флоэмы. В ночное время в июне камбиальные клетки делились преимущественно в сторону флоэмы ($R^2 = 0.37$, $P < 0.05$), а продукция клеток ксилемы практически отсутствовала ($R^2 = 0.015$, $P < 0.05$). В июле основным регулятором деления камбиальных клеток на стороне ксилемы была дневная температура воздуха ($R^2 = 0.91$ против $R^2 = 0.64$ при образовании клеток флоэмы). В августе дневные и особенно ночные температуры положительно влияли на продукцию клеток ксилемы. Очевидно, эти различия коррелируют с изменениями содержания воды, запасенной в тканях деревьев, и зависят, в свою очередь, от температуры воздуха, транспирации, влажности почвы (Кайбияйнен и др., 1981; Schulze et al., 1985; Oberhuber et al., 2015), т.е. от градиента водного потенциала в тканях древесины.

Изучение почасового радиального роста ствола семи видов деревьев умеренного пояса показало, что деревья растут в основном ночью, а реакция роста на водный потенциал почвы сильно зависит от времени суток (Zweifel et al., 2021). Наши наблюдения за суточным ростом клеток показали, что интенсивный рост трахеид сосны растяжением происходит в любое время суток и зависит от температурного режима как дня, так и ночи, а также водообеспеченности тканей ствола (Antonova et al., 1995).

Влияние водного режима на ростовые процессы

Градиент водного потенциала в тканях дерева имеет решающее значение для деления клеток камбия и особенно для камбиальных производных ксилемы путем растяжения (Nonami, Bouer, 1990; Cosgrove, 1997). В условиях 2001 г. деление клеток камбия продолжалось до середины августа (рис. 2). Клетки, образованные камбием в мае и июне, формируют вторичные клеточные стенки в июле и включаются в ранний слой ксилемы. За это время завершается, как правило, формирование раннего слоя ксилемы (Antonova, Stasova, 1993; 2015). Трахеиды, продуцируемые камбием в июле, развиваются далее как трахеиды поздней древесины. В Восточной Сибири, особенно в засушливые годы, деятельность камбия прекращается, как правило, в начале–середине августа.

В августе осадки и благоприятные температуры могут спровоцировать возобновление камбиальной активности и образование клеток с большими радиальными диаметрами. В результате в годичных кольцах древесины появляются ложные годичные кольца. Например, такие раннеподобные трахеиды были отмечены в зоне роста позднего слоя *Pinus pinea* L. (Balzano et al., 2018). В июне 2001 г. осадки оказали положительное влияние на деление камбиальных инициальных клеток в сторону ксилемы ($R^2 = 0.34$, $P < 0.05$). Корреляция была сильнее в июле ($R^2 = 0.45$, $P < 0.05$) и особенно в августе ($R^2 = 0.6$, $P < 0.05$). В последнем случае связь более адекватно описывалась полиномиальным уравнением, согласно которому оптимальными для образования клеток ксилемы являются суточная температура воздуха 14–15°C и осадки 50–60 мм.

Засуха провоцирует изменение гидравлических свойств формируемой древесины и уменьшение прироста годичных колец (McDowell, 2011; Deslauriers et al., 2014). Сильная зависимость радиального прироста деревьев *Pinus sylvestris* от летней засухи отмечена в лесостепных экотонах юга Сибири (Tabakova et al., 2020). Вторичный рост средиземноморских хвойных деревьев (*Pinus*

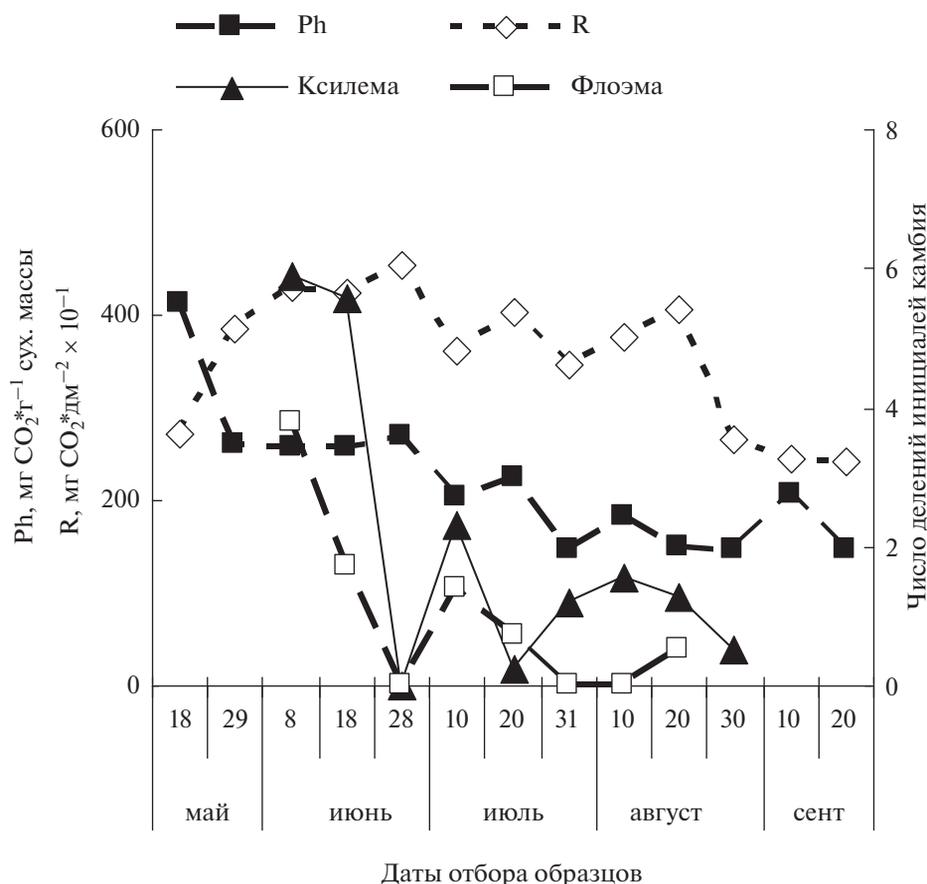


Рис. 3. Камбиальная активность как число делений инициалей камбия в сторону флоэмы и/или ксилемы, фотосинтез (Ph) и общее дыхание (R) в отдельные периоды 2001 г.

pinaster) вдоль градиента континентальной засушливости в основном зависел от наличия воды и объяснял до 64.7% дисперсии роста ранней древесины (Argzac et al., 2018). В засушливых районах, таких как район Средиземноморья, засуха может быть вызвана не только недостатком осадков, но и высокой температурой воздуха. Эти условия вызывают дефицит давления пара (Williams et al., 2012) и, следовательно, снижает водный потенциал. Недостаток влаги изменяет многие физиологические и биохимические процессы в развивающихся растительных клетках и, как следствие, их морфологические параметры. Мета-анализ реакции растений на водный стресс выявил увеличение количества активных форм кислорода (АФК) и изменение содержания ферментативных и неферментативных антиоксидантов (Sun et al., 2020). Водный статус тканей деревьев влияет на лигнификацию трахеид как ранней, так и поздней древесины, а также на структуру лигнина сосны обыкновенной (Antonova et al., 2019).

Камбиальная активность и фотосинтез

Зависимость между фотосинтезом, общим дыханием и продукцией камбием клеток ксилемы и флоэмы в отдельные периоды 2001 г. показана на рис. 3.

Продукция камбием клеток ксилемы имела относительно слабую положительную связь с фотосинтезом в течение всего вегетационного периода ($R^2 = 0.21$, $P < 0.05$). Однако в летние месяцы наблюдалась другая зависимость. В июне и июле она была неясной или отрицательной, а в августе зависимость достоверно возрастала ($R^2 = 0.42$, $P < 0.05$). Очевидно, что корреляция между фотосинтезом и делением камбиальных клеток на ксилему контролируется как внутренними, так и внешними факторами. Отрицательная корреляция, обнаруженная для июня и июля, может быть связана с высокими дневными температурами воздуха, подавляющими фотосинтез. По данным Щербатюка и соавт. (1990), оптимальная температура для видимого фотосинтеза сосны обыкновенной, про-

израстающей в насаждении у озера Байкал, составляет 16°C. В августе, хотя температура воздуха была благоприятна для фотосинтеза, есть еще одна область, требующая ассимилятов. В это время происходит активный синтез веществ во вторичных стенках толстостенных трахеид поздней древесины и, следовательно, наблюдается некоторое напряжение в потреблении фотосинтетатов.

Корреляция между делением клеток камбия в сторону флоэмы и фотосинтезом должна быть положительной, поскольку клетки флоэмы обеспечивают транспорт продуктов фотосинтеза. Однако прямой связи между этими показателями за весь сезон практически не было, хотя наблюдалась значимая нелинейная зависимость ($R^2 = 0.32$, $P < 0.05$). Как упоминалось выше, оптимальная температура для деления камбиальных инициалей в сторону флоэмы составляет 15°C (Antonova, Stasova, 2015). В июне 2001 г., особенно в третьей декаде, связь между фотосинтезом и активностью камбия во флоэме была отрицательной ($R^2 = 0.24$, $P < 0.01$) из-за высокой температуры (рис. 16). Такая же отрицательная зависимость ($R^2 = 0.48$, $P < 0.05$) наблюдалась и в погодных условиях 1999 г. из-за доступности влаги и особенно температуры. В начале июля 2001 г. обильные осадки и понижение дневных температур воздуха способствовали фотосинтезу и усилению деления камбиальных инициалей в сторону флоэмы (рис. 3). За счет этого увеличивается количество клеток в транспортной сети и, как следствие, усиливается поступление продуктов фотосинтеза. Поэтому деление камбиальных инициалей в сторону флоэмы показало сильную положительную корреляцию с фотосинтезом ($R^2 = 0.96$, $P < 0.001$) в начале июля 2001 г.

Деление клеток и рост растяжением требуют определенного уровня водного потенциала (Nonami, Bouer, 1990; Cosgrove, 1997; Antonova, Stasova 1993; 2015). Недавно было показано прямое влияние водного потенциала на тургорное расширение клеток (Caban et al., 2020). Наши данные показывают, что зависимость образования клеток ксилемы/флоэмы камбием от фотосинтеза возникает при определенном сочетании температуры и осадков.

Камбиальная активность и дыхание

Дыхательная активность и динамика делений камбиальных клеток в сторону ксилемы и/или флоэмы представлены на рис. 3. В сезоне 2001 г. корреляция между дыханием и камбиальной активностью была отрицательной в июне и июле ($R^2 = 0.48$, $P < 0.05$) и положительной в августе с $R^2 = 0.78$ ($P < 0.001$). У деревьев сосны обыкновенной в бореальных условиях обнаружена положительная линейная зависимость между среднемесячным

дыханием ствола дерева в течение вегетационного периода и скоростью роста по диаметру ствола (т.е. образованием и расширением клеток камбия) (Забуга, Забуга, 1985; Загирова, Кузин, 1998; Zha et al., 2004, 2004). Как и в случае фотосинтеза, корреляция между дыханием и активностью камбия варьировала в зависимости от периодов вегетации. Корреляция была отрицательной в июне и июле ($R^2 = 0.48$, $P < 0.05$) и положительной в августе ($R^2 = 0.78$, $P < 0.001$). Очень сильная зависимость между числом живых клеток ксилемы и выделением CO_2 в августе была обнаружена у *Pinus cembra* L. в Центральной части Альп, хотя активность камбия прекратилась (Gruber et al., 2009). В условиях Восточной Сибири (Россия) деление камбия продолжалось до конца августа (рис. 2). В этот период происходит утолщение вторичной стенки поздних трахеид. Синтез компонентов клеточной стенки требует много энергии, особенно трахеид поздней древесины, которые намного толще, чем у клеток ранней древесины. Таким образом, высокий уровень выделения CO_2 в августе (рис. 3) свидетельствует в основном о накоплении биомассы во вторичных стенках поздних трахеид. Затраты дыхания на продукцию клеток ксилемы камбием (и радиальный рост) в это время меньше. Корреляция между дыханием и делением камбиальных клеток в сторону флоэмы в течение вегетации 2001 г. была слабоположительной ($R^2 = 0.16$, $P < 0.05$). Согласно (Ryan, 1990), живые клетки флоэмы *P. contorta* и *P. cembra* составляют лишь 7% всех ствольных клеток и не вносят существенного вклада в выделение CO_2 в течение вегетационного периода. В условиях холодного климата, когда количество клеток флоэмы в годичных кольцах роста увеличивается, как это наблюдается на северных территориях (Stockfors, Linder, 1998; Gričar, Čufar, 2008; Астраханцева, Антонова, 2011), взаимосвязь между дыханием и продукцией камбиальных клеток флоэмы может усиливаться.

Отложение биомассы и фотосинтез

Основная биомасса годичных колец накапливается во вторичных стенках трахеид. Первичные стенки трахеид, образованные камбием, содержат 7–8% всей биомассы, накопленной в годичном слое древесины за вегетационный период (Grozdzits, Ifyu, 1984). В условиях Восточной Сибири формирование годичных колец древесины в стволах сосны обыкновенной продолжается с начала/середины мая до конца/середины сентября. Начало и конец образования колец зависят от температуры воздуха. Накопление веществ в стенках трахеид ранней древесины обычно происходит в июне–июле, а в поздней — с конца июля до сере-

дины/конца сентября (Antonova, Stasova, 1993; 1997). Стенки трахеид ранней древесины содержат меньше биомассы, чем поздней, что напрямую зависит от продолжительности развития клеток в зоне вторичного утолщения (Антонова; Стасова, 1992; Antonova, Stasova, 2015).

В 1999 г. годовые кольца в стволах начали формироваться в начале мая, и этот процесс продолжался до середины сентября. В вегетационный период 2001 г. трахеиды ранней древесины (рост и вторичное утолщение стенки) развивались с конца мая до конца июля, а трахеиды поздней древесины — с конца июня до середины сентября. Накопление биомассы, выраженное в приросте площади поперечного сечения стенок трахеид, и изменения фотосинтеза и дыхания в отдельные периоды сезонов 1999 и 2001 гг. представлены на рис. 4.

В 1999 и 2001 гг. динамика накопления биомассы в стенках трахеид годовых слоев древесины в стволах сосны обыкновенной была бимодальной с максимумами в июне и августе (рис. 4), хотя в июле этих сезонов имелись различия по температуре и влажности. (рис. 1). Бимодальная динамика депонирования биомассы наблюдалась в период ежегодного формирования древесины в *Larix sibirica* Ldb. (Antonova, Stasova, 1997) и отмечалось (Qaderi et al., 2019). Это обусловлено различиями во времени развития первичной и вторичной стенок трахеид ранней и поздней древесины при формировании древесины у хвойных и сочетанием внешних факторов в эти периоды (Antonova, Stasova, 2015).

Фотосинтез в июне, июле и августе 2001 г. был в 1.6, 1.5 и 1.1 раза выше, чем в 1999 г. Однако в июне 2001 г. прирост площади клеточной стенки (ΔS) составил только 0.89 от данных 1999 г. В июле площадь клеточных стенок в годовых слоях 2001 г. была в 1.82 раза больше, чем в том же месяце 1999 г. (8110 против 4456 мкм²). Процессы синтеза при развитии вторичных стенок ранних трахеид протекали более интенсивно в июле 2001 г. из-за увеличения количества осадков и понижения температуры воздуха. В августе 2001 г. выпадение биомассы составило 0.75 по сравнению с 1999 г., из-за разницы в осадках (80.7 и 29.3 мм соответственно).

В 2001 г. корреляция между приростом биомассы и фотосинтезом была отрицательной в июне ($R^2 = 0.38, P < 0.05$) и июле ($R^2 = 0.86, P < 0.001$) и положительной в августе ($R^2 = 0.93, P < 0.001$). В августе–сентябре связь более адекватно описывалась полиномиальной кривой ($R^2 = 0.98, P < 0.05$). Это предполагает оптимальный уровень фотосинтеза, за пределами которого его продукты могут быть использованы в каком-либо другом процессе. В 1999 г. корреляция между приростом биомассы и

фотосинтезом была положительной в мае–июне ($R^2 = 0.89, P < 0.05$) и августе ($R^2 = 0.94, P < 0.001$) и отрицательной в июле ($R^2 = 0.12, P < 0.05$).

Связь между депонированием биомассы и фотосинтезом в разное время сезона не всегда ясна, хотя очевидно, что синтетические процессы в клетках зависят от субстратов, поступающих в результате фотосинтеза. Это свидетельствует о конкуренции за фотоассимиляты в ростовых процессах в изменяющихся условиях. Следует также иметь в виду, что накопление биомассы зависит от дыхания и его компонентов, энергия которых расходуется на клеточные процессы.

Отложение биомассы и дыхание

Суммарное дыхание, рассчитанное для отдельных периодов вегетационного периода (рис. 4), специфически связано с процессами роста клеток.

В сезоне 1999 г. корреляция между депонированием биомассы и дыханием отличалась от таковой в 2001 г. из-за изменения внешних факторов, в основном осадков (рис. 1а). Она была положительной ($R^2 = 0.25$ при $P < 0.05$) на протяжении всей вегетации, очень высокой в мае–июне ($R^2 = 0.92, P < 0.001$), заметно снижалась в июле ($R^2 = 0.38, P < 0.05$) и снова повышалась в августе–сентябре ($R^2 = 0.60, P < 0.05$). Особенно сильная корреляция между отложением веществ клеточных стенок и дыханием, обнаруженная для мая, предположительно, была связана с благоприятными осадками и температурой воздуха, которые обеспечивали все ростовые процессы продуктами фотосинтеза.

В 2001 г. накопление биомассы во вторичных стенках трахеид слабо положительно коррелировало с дыханием ($R^2 = 0.14, P < 0.05$), если рассчитывать на весь вегетационный период. Аналогичная связь наблюдалась в июне ($R^2 = 0.13, P < 0.05$), тогда как в июле она усиливалась ($R^2 = 0.66, P < 0.05$). Увеличение зависимости в июле вероятно связано с различиями между активностью физиологических процессов и их потребностью в энергии. В июле это необходимо для синтеза веществ вторичных стенок трахеид ранней древесины. Однако, они имеют более тонкую стенку по сравнению с трахеидами поздней древесины. Поэтому повышение дыхания может быть результатом других биохимических процессов. В августе–сентябре, в период вторичного утолщения стенок трахеид поздней древесины, связь между накоплением биомассы и дыханием становится положительной ($R^2 = 0.40, P < 0.05$). У сосны обыкновенной южной тайги корреляция между радиальным приростом ствола и GPP несколько ослабевает в конце лета по сравнению с его началом (Chan et al., 2018).

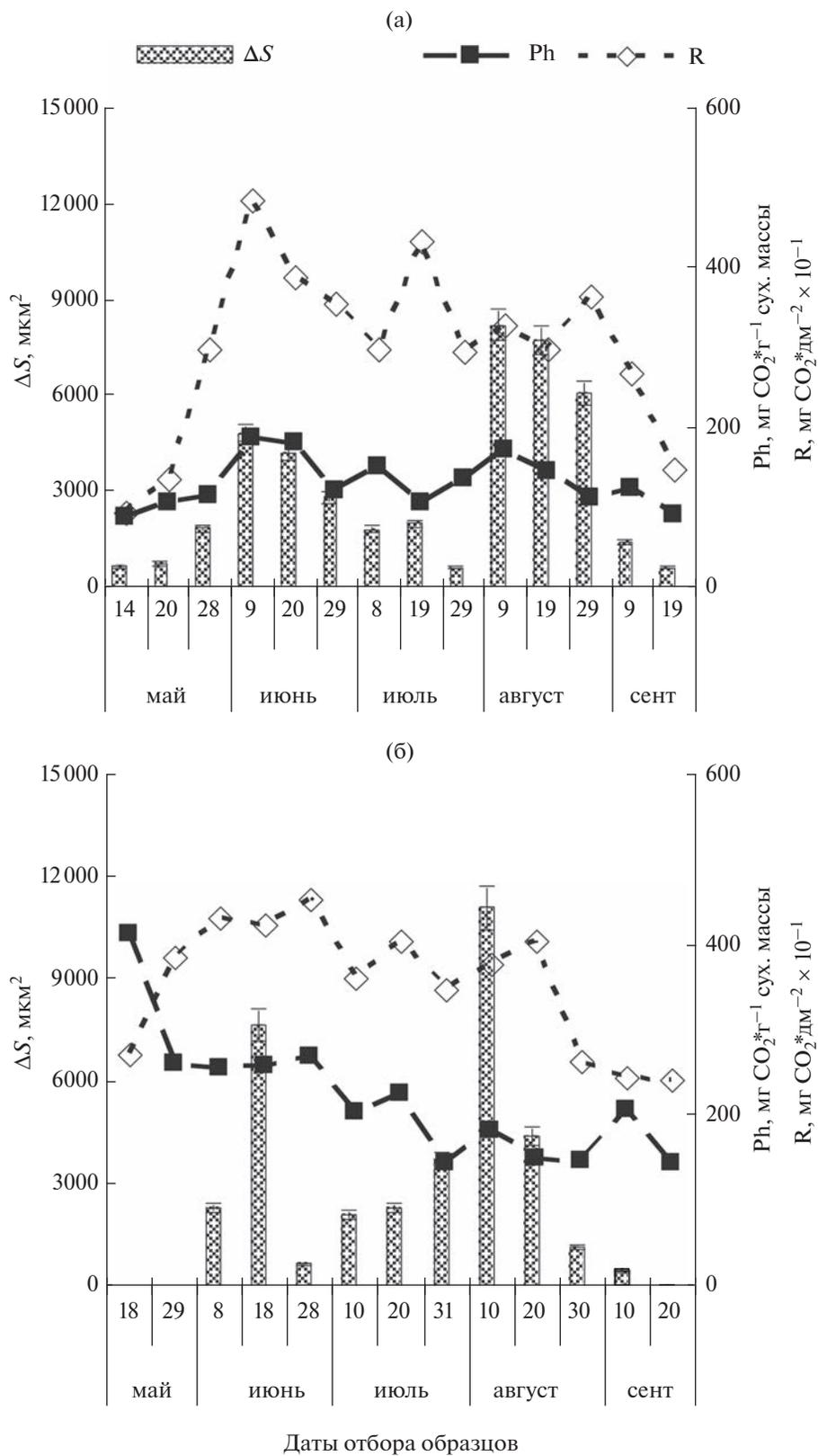


Рис. 4. Накопление биомассы в стенках трахеид (ΔS , $\mu\text{км}^2$), фотосинтез (Ph) и общее дыхание (R) в отдельные периоды 1999 (а) и 2001 (б) гг.

Это свидетельствует о том, что другие процессы в дереве, кроме синтеза компонентов стенок, потребляют энергию в этот период времени.

Сравнение данных 1999 и 2001 гг. показало, что общее дыхание в июне 1999 г. было в 0.94 раза меньше, чем в июне 2001 г., а прирост площади вторичной клеточной стенки был больше в 1.12 раза. Продуктивность фотосинтеза в июне 2001 г. была в 1.6 раза выше, чем в 1999 г. В июле 2001 г. дыхание было всего в 1.08 раза выше, чем в 1999 г., тогда как прирост биомассы в 2001 г. был в 1.82 раза выше, чем в 1999 г. В августе 2001 г. продуктивность фотосинтеза была выше в 1.46 раза, чем в 1999 г. При этом прирост площади вторичных клеточных стенок был в 1.3 раза больше в 1999 г., чем в августе 2001 г., хотя продуктивность фотосинтеза и дыхания были ниже (0.89 и 0.9 от значений 2001 г. соответственно). Значительно более высокая биомасса, накопленная в стенках клеток в августе 1999 г. по сравнению с 2001 г., показывает, что продукты фотосинтеза расходуются в основном на накопление биомассы. Снижение депонирования биомассы в августе 2001 г. произошло, вероятно, из-за обильных осадков (рис. 1) и низкой активности биохимических процессов в этих условиях. По-видимому, дыхание роста и поддержания также изменяются при изменении внешних факторов в эти месяцы, что должно влиять на депонирование биомассы.

Полученные данные указывают, что депонирование биомассы в клетках годичных колец в течение сезона зависит от колебаний фотосинтеза (Ph) и дыхания (R), а их соотношение зависит от температуры и влагообеспеченности. Изменение отношения Ph/R в зависимости от температуры показано на рис. 5.

В начале сезонного роста высокое значение отношения Ph/R при относительно низкой температуре указывает на значительный избыток продуктов фотосинтеза по сравнению с затратами на дыхание (рис. 5). Повышение температуры воздуха уменьшало соотношение, т.е. потребление ассимилятов на дыхание превышало их поступление от фотосинтеза. В начале июня 1999 г. понижение температуры воздуха, наоборот, усилило поступление фотоассимилятов и относительно уменьшило их потребление ростовыми процессами. В результате накопление биомассы в клеточных стенках увеличивалось (рис. 4а). В вегетационный период 2001 г. влияние температуры воздуха на Ph/R было слабо выражено из-за осадков в июле, в отличие от всего остального сезона, за исключением сентября (рис. 5б). Связь между депонированием биомассы, субстраты для которой поступают в результате фотосинтеза, и затратами на дыхание, энергетическим показателем этого процесса, также может быть выражена от-

ношением CO_2 , поглощенного при фотосинтезе, к CO_2 , выделившемуся при дыхании. Изменения соотношения фотосинтез/дыхание (Ph/R) и биомассы в клеточных стенках за сезоны 1999 и 2001 гг. представлены на рис. 6.

Среднемесячные значения Ph/R в 2001 г. были выше, чем в 1999 г. (0.60, 0.51 и 0.46 для июня, июля и августа соответственно). Отношение прироста биомассы в 2001/1999 гг. в эти месяцы составило 0.89, 1.82 и 0.75 соответственно. Это указывает, что накопление биомассы в стенках клеток не всегда зависит от Ph/R (рис. 6б) и что в деревьях существуют другие процессы, влияющие на стволовое дыхание и утилизацию фотоассимилятов. Максимальное отложение биомассы проходило в августе обоих сезонов, когда завершались некоторые ростовые процессы в дереве, и основным субстрат-зависимым процессом было накопление веществ во вторичных стенках трахеид поздней древесины. Неожиданно высокое отношение Ph/R в июле 1999 г. и довольно высокий уровень в 2001 г. при отсутствии значительных затрат на синтез биомассы свидетельствуют о других физиологических процессах, в которых используются фотоассимиляты. Увеличение Ph/R отмечалось также в начале сентября 2001 г., когда завершались все ростовые процессы у деревьев.

Одним из процессов может быть синтез/распад крахмала. Изменения запасенных крахмальных гранул и капель липидов до реактивации камбия и во время формирования клеток ксилемы, а также увеличение содержания крахмала в конце вегетационного периода отмечались (Sauter, van Cleve, 1994; Судачкова и др.; Oribe et al., 2003; Hoch, Körner, 2003; Begum et al., 2010, 2013).

Стратегия развития тропических деревьев в отношении накопления крахмала и липидов была подробно изучена (Herrera-Ramirez et al., 2021). Мы наблюдали изменения содержания крахмала во флоэме (клетки лучей и осевой паренхимы) и ксилеме (клетки лучей и смоляных ходов). Крахмал, ранее накопленный в клетках ксилемы за счет активации фотосинтеза с началом вегетационного периода, распался к концу мая–началу июня. Крахмальные гранулы в клетках ксилемы вновь могут появиться в середине–конце августа, когда фотоассимиляты используются не только для вторичного утолщения трахеид поздней древесины, но и для синтеза крахмала (и липидов) в качестве запаса углерода. Крахмал в структурных компонентах флоэмы более подвижен. Динамика содержания крахмала (в баллах) в клетках лучей и осевой паренхимы флоэмы в сезоны 1999 и 2001 гг. представлена на рис. 7.

Исчезновение крахмала в лучах и осевой паренхиме флоэмы в июле 1999 г. (рис. 7а) и одно-

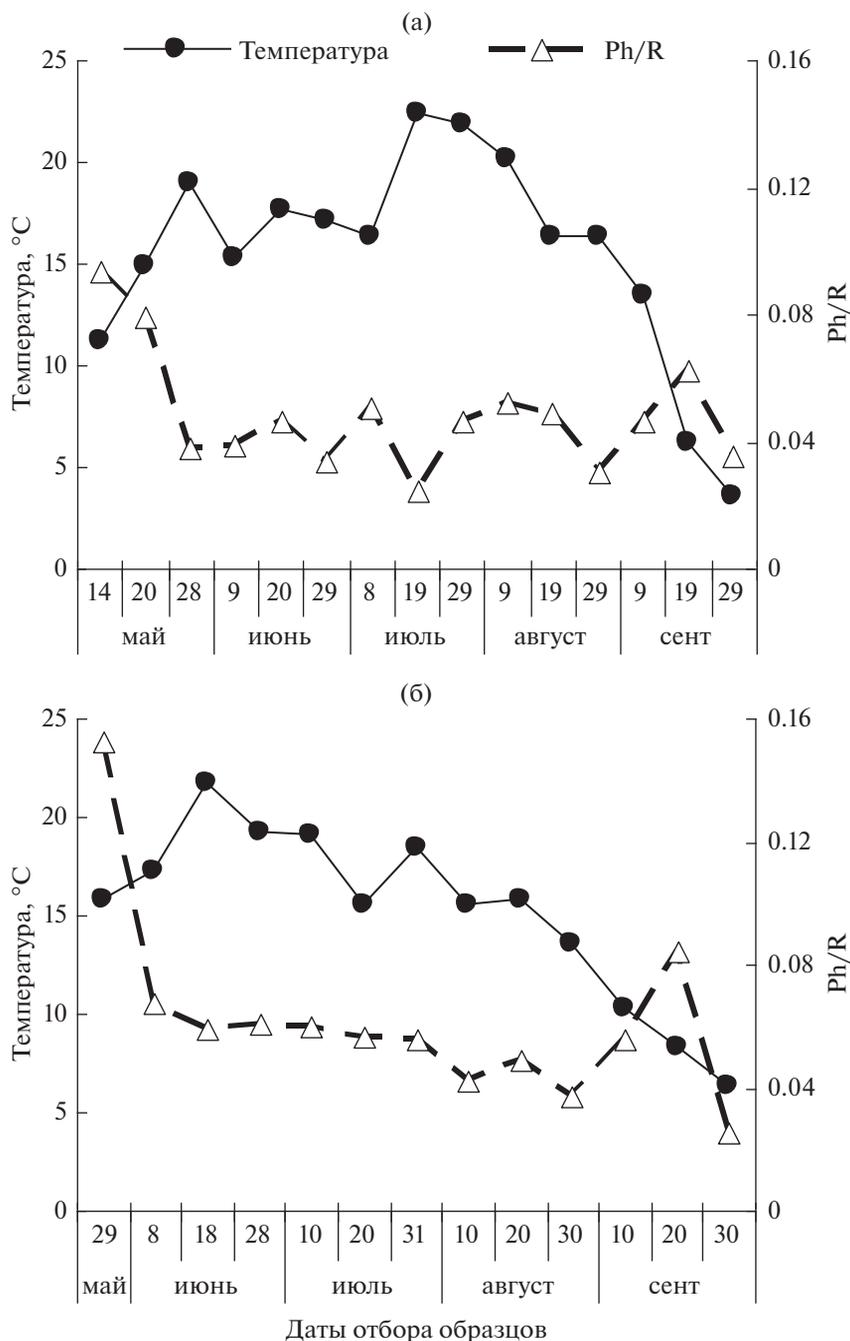


Рис. 5. Изменения температуры (средней за период) и отношения фотосинтез/дыхание (Ph/R) в отдельные периоды 1999 (а) и 2001 (б) гг.

временное необычное усиление общего дыхания (рис. 4а) могут свидетельствовать об окислении крахмала, отложившегося в клетках лучей флоэмы. В течение вегетационного периода 2001 г. содержание крахмала во флоэме менялось в зависимости от погодных условий (рис. 7б). К началу июля наблюдалось исчезновение крахмальных

зерен в лучевых клетках и увеличение в осевых клетках паренхимы. Значительные осадки в июле усилили фотосинтез. Содержание крахмала и размер их зерен в клетках луба сначала снижались, а затем к августу неуклонно возрастали. В августе 2001 г. усилилось дыхание, уменьшилось отложение биомассы в клеточных стенках ксилемы

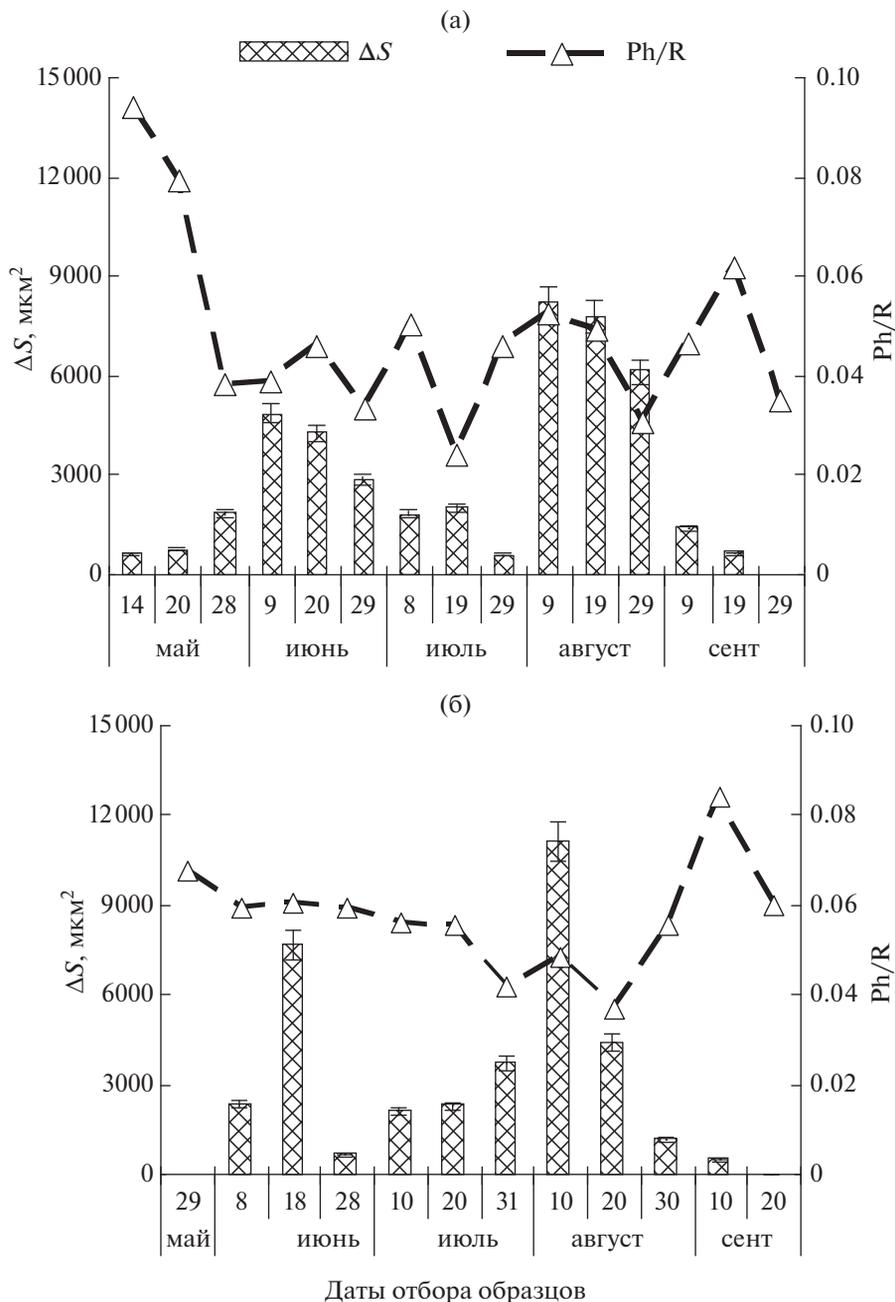


Рис. 6. Отношение фотосинтез/дыхание (Ph/R) и прирост площади поперечного сечения стенок трахеид (ΔS , мкм²) в отдельные периоды 1999 (а) и 2001 (б) лет.

(рис. 4б), и избыток фотоассимилятов отложился в виде крахмала как в клетках флоэмы (рис. 7б), так и в лучах ксилемы.

Таким образом, внешние факторы регулируют баланс между поступлением фотоассимилятов и расходом энергии на физиологические и биохимические процессы. Это, в свою очередь, влияет на накопление биомассы в клеточных стенках

ксилемы сосны и запасание углерода как источника энергии для ростовых процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые изучена продукция клеток ксилемы и флоэмы камбием и накопление биомассы в стенках клеток ксилемы, продуктивность фотосинтеза и стволового дыхания у деревьев сосны обык-

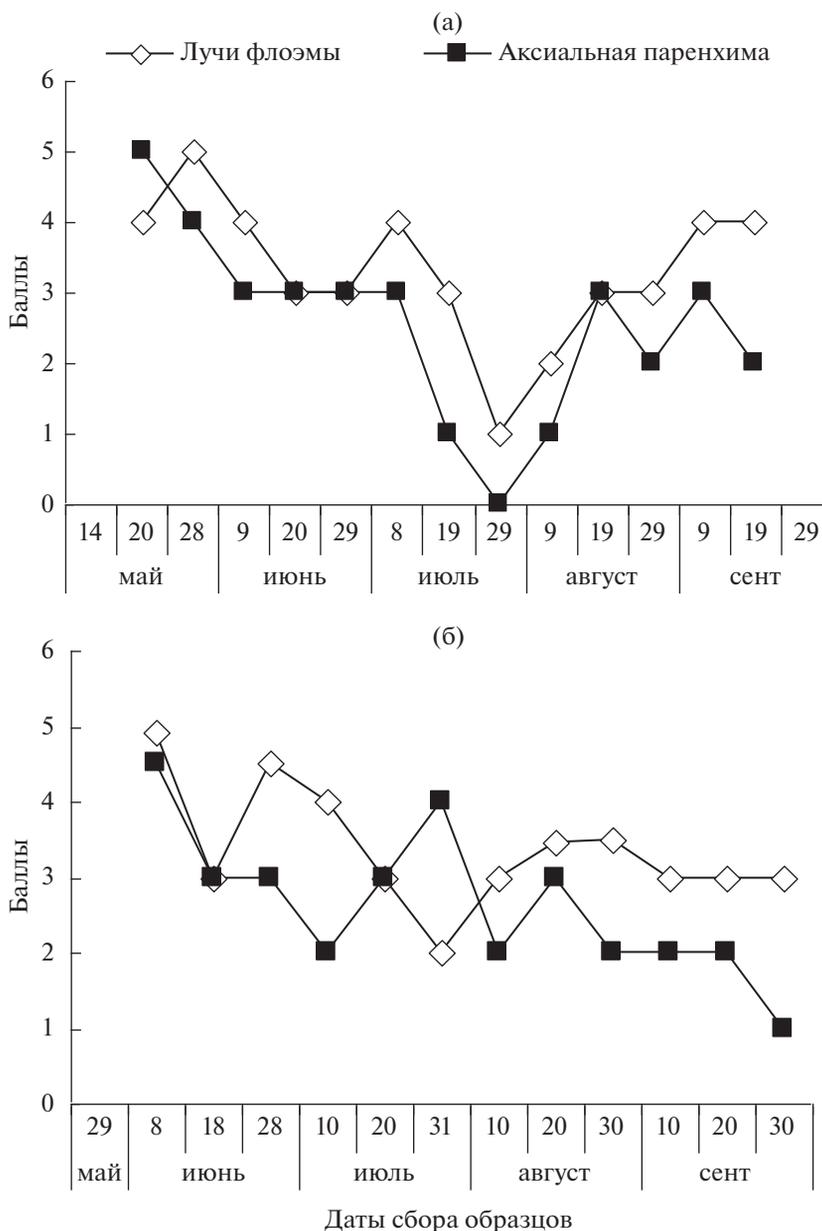


Рис. 7. Содержание крахмала (баллы) в лучах и осевой паренхиме флоэмы в 1999 (а) и 2001 (б) гг.

новенной, произрастающих в Восточной Сибири (Россия) в отдельные периоды двух сезонов с контрастными летне-погодными условиями. Деятельность камбия, продуцирующего клетки ксилемы и флоэмы, зависела от температуры и осадков, но прежде всего от их совместного действия на фотосинтез и дыхание в течение всего сезона. Изменения внешних факторов одновременно модулируют фотосинтез и дыхание, что, в свою очередь, влияет на деятельность камбия и развитие его производных. Накопление биомассы в стенках клеток развивающейся ксилеме стволов

сосны обыкновенной проходило в мае–июне и, главным образом, в августе при развитии толстостенных трахеид поздней древесины. Каждый из этих временных интервалов характеризовался оптимальными температурами как для фотосинтеза, так и для дыхания, что положительно сказывалось на отложении биомассы в клеточных стенках. Модификация внешних факторов изменяет баланс между поступлением ассимилятов и их расходом на энергетические затраты, что, в свою очередь, влияет на использование продуктов фотосинтеза для накопления биомассы в клеточных

стенках деревьев сосны обыкновенной. Снижение потребности в фотоассимилятах для биосинтеза структурных компонентов стенок трахеид приводит к их избытку, который запасается в виде крахмала как источник энергии для ростовых процессов. Наши данные убедительно показали, что накопление биомассы в стенках трахеид годичных колец сосны контролируется сочетанием температуры воздуха и осадков, влияющих как на фотосинтез, так и на дыхание. Такой подход к оценке влияния внешних факторов на фотосинтез и дыхание позволяет лучше понимать ростовые процессы в дереве и развитие клеток ксилемы в фазах дифференциации.

Очевидно, что такие компоненты дыхания, как дыхание роста и дыхание поддержания, изменяются в зависимости от температуры воздуха и влагообеспеченности и, в свою очередь, влияют на депонирование биомассы в стенках трахеид.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа частично поддержана Грантом № 30.24-2013 комплексного проекта “Живая природа” (№ 01201354989 о государственной регистрации) Программы фундаментальных исследований Президиума РАН и выполнена частично по Проекту фундаментальных исследований (№ 0356-2019-0025) СО РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данном исследовании люди и животные в качестве объектов не использовались.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Г.Ф. Антонова (концепция, анализ/интерпретация данных, написание рукописи, рисунки), В.В. Стасова (морфометрический анализ), Г.Г. Суворова (замысел, проведение эксперимента, сбор данных), В.А. Осолков (сбор данных). Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Антонова Г.Ф., Шебеко В.В. Использование крезилового фиолетового для изучения формирования древесины // Химия древесины. 1981. № 4. С. 102–105.

Антонова Г.Ф., Стасова В.В. Развитие годичного яруса в стволовой древесине *Pinus sylvestris* L. и *Larix sibirica* L. // Лесоведение. 1992. № 5. С. 19–27.

Астраханцева Н.В., Антонова Г.Ф. Морфологические изменения в структуре ксилемы и флоэмы в стволах деревьев сосны обыкновенной разной скорости роста // Материалы: Международной конферен-

ции “Structural and functional deviations from normal growth and development of plants under the influence of environmental factors” June 20–24, 2011. Институт леса Карельского научного центра. Петрозаводск, 2011. С. 16–21.

- Болондинский В.К., Кайбиянен Л.К. Динамика фотосинтеза в сосновых насаждениях // Физиология растений. 2003. № 50. С. 105–114.
- Забуга В.Ф., Забуга Г.А. Взаимосвязь дыхания и радиального роста ствола у сосны обыкновенной // Физиология растений. 1985. № 32. С. 718.
- Забуга В.Ф., Забуга Г.А. Дыхание растущих побегов сосны обыкновенной // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 1. С. 68–74.
- Загирова С.В., Кузин С.Н. Камбиальная активность и CO₂-обмен в стволе *Pinus sylvestris* // Физиология растений. 1998. Т. 45. С. 735–740.
- Кайбиянен Л.К., Сазонова Т.А., Тимов П.В. Транспирационные потоки в ксилеме сосны и динамика потребления влаги // Лесоведение. 1981. № 2. С. 27–34.
- Щербатюк А.С. Многоканальные установки с CO₂-газоанализаторами для лабораторных и полевых исследований // Инфракрасные газоанализаторы в изучении газообмена растений. М.: Наука, 1990. С. 38–54.
- Щербатюк А.С., Янькова Л.С., Русакова Л.В. Эколого-физиологические особенности газообмена у хвойных // Лесоведение. 1990. № 4. С. 3–10.
- Судачкова Н.Е., Милютин И.Л., Семенова Г.П. Определение аккумулирующих функций внутренней коры и древесины лиственницы Гмелина (*Pinaceae*) при воздействии низкотемпературных и гипоксических стрессов в ризосфере // Ботанический журнал. 2001. Т. 6. № 1. С. 89–97.
- Суворова Г.Г. Фотосинтез хвойных деревьев в условиях Сибири // Новосибирск: “ГЕО” “ГЕО”, 2009. 192 с.
- Суворова Г.Г., Осолков В.А., Стасова В.В., Антонова Г.Ф. Соотношение ростовой активности, затрат дыхания и фотосинтетической эффективности кроны сосны обыкновенной // Известия Иркутского государственного университета. 2015. Серия “Биология. Экология” № 11. С. 2–12.
- Alam S.A., Huang J.-G., Start K.J. et al. Photosynthetic Productivity on the Radial Growth of White Spruce in Western Canada // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1915. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01915>
- Acosta M., Pavelka M., Pokorny R. et al. Seasonal Variation in CO₂ Efflux of Stems and Branches of Norway Spruce Trees // Annals of Botany. 2008. V. 101. P. 469–477. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm304>
- Antonova G.F., Stasova V.V. Effects of environmental factors on wood formation in Scots pine stems // Trees. 1993. V. 7. P. 214–219. <https://doi.org/10.1007/BF00202076>
- Antonova G.F., Cherkashin V.P., Stasova V.V., Varaksina T.V. Daily dynamics in xylem cell Radial growth of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) // Trees. 1995. V. 10. P. 24–30. <https://doi.org/10.1007/bf00197776>

- Antonova G.F., Stasova V.V.* Effects of environmental factors on wood formation in larch (*Larix sibirica* Ldb.) stem // *Trees*. 1997. V. 11. P. 462–468.
<https://doi.org/10.1007/PL00009687>
- Antonova G.F., Varaksina T.N., Zheleznicenko T.V., Bazhenov A.V.* Changes in lignin structure during earlywood and latewood formation in Scots pine stems // *Wood Science and Technology*. 2019. V. 53. P. 927–952.
<https://doi.org/10.1007/s00226-019-01108-w>
- Antonova G.F., Stasova V.V.* Seasonal distribution of processes responsible for radial diameter and wall thickness of Scots pine tracheids // *Siberian J. Forest Science*. 2015. № 2. P. 33–40.
- Arzac A., Rozas V., Rozenberg P., Olano J.M.* Water availability controls *Pinus pinaster* xylem growth and density: A multiproxy approach along its environmental range // *Agricultural and Forest Meteorology*. 2018. V. 250–251. P. 171–180.
<https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.12.257>
- Balzano A., Čufar K., Battipaglia G. et al.* Xylogenesis reveals the genesis and ecological signal of IADFs in *Pinus pinea* L. and *Arbutus unedo* L. // *Ann Bot*. 2018. V. 121. P. 231–242.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcy008>
- Begum S., Nakaba S., Oribe Y., Kubo T., Funada R.* Changes in the localization and levels of starch and lipids in cambium and phloem during cambial reactivation by artificial heating of main stems of *Cryptomeria japonica* trees // *Ann Bot*. 2010. V. 106. P. 885–895.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcq185>
- Begum S., Nakaba S., Yamagishi Y., Oribe Y., Funada R.* Regulation of cambial activity in relation to environmental conditions: Understanding the role of temperature in wood formation of trees // *Physiol Plantarum*. 2013. V. 147. P. 46–54.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01663.x>
- Cabon A., Fernández-de-Uña L., Gea-Izquierdo G.* Water potential control of turgor-driven tracheid enlargement in Scots pine at its xeric distribution edge // *New Phytol*. 2020. V. 225. P. 209–221.
<https://doi.org/10.1111/nph.16146>
- Carr D.J.* Plasmodesmata in growth and development // In: *Gunning BES, Robards AW* (Eds.). *Intercellular communication in plants: studies on plasmodesmata*. Berlin, Springer. 1976 P. 243–290.
- Chan T., Berninger F., Kolari P., Nikinmaa E., Hölttä T.* Linking stem growth respiration to the seasonal course of stem growth and GPP of Scots pine // *Tree Physiol*. 2018. V. 38. № 9. P. 1356–1370.
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpy040>
- Cosgrove D.J.* Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement // *Plant Cell*. 1997. V. 9. P. 1031–1041.
- Denne M.* Xylem development in conifers. // In: *Proceed of symposium “Physiology of tree crops”, 25–26 March 1969*. Bristol, L, NY Acad. Press. 1970. P 83–97.
- Deslauriers A., Morin H.* Intra-annual tracheid production in balsam fir stems and the effect of meteorological variables // *Trees*. 2005. V. 19. P. 402–408.
<https://doi.org/10.1007/s00468-004-0398-8>
- Deslauriers A., Beaulieu M., Balducci L. et al.* Impact of warming and drought on carbon balance related to wood formation in black spruce // *Ann Bot*. 2014. V. 114. P. 335–345.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcu111>
- Fajstavr M., Giagli K., Vavrčík H. et al.* The cambial response of Scots pine trees to girdling and water stress // *IAWA J*. 2020. V. 51. № 4. P. 1–27.
<https://doi.org/10.14214/sf.1760>
- Gamalei Yu.V., Pakhomova M.V., Syutkina A.V.* Regulation of assimilate translocation by plasmodesmata: effect of temperature and water stress // In: *Lucas W., Zichron-Yakov* (Eds), *Basic and applied research in plasmodesmal biology*. Israel. 1996. P. 132–134.
- Gordon J.C., Larson P.R.* Seasonal Course of Photosynthesis, Respiration, and Distribution of ¹⁴C in Young *Pinus resinosa* Trees as Related to Wood Formation // *Plant Physiol*. 1968. V. 43. P. 1617–1624.
- Gričar J., Čufar K.* Seasonal dynamics of phloem and xylem formation in silver fir and Norway spruce as affected by drought // *Russ. J. Plant. Physiol*. 2008. V. 55. P. 538–543.
<https://doi.org/10.1134/S102144370804016X>
- Grozdzits G.A., Iffju G.* Differentiation of tracheid in developing secondary xylem of *Tsuga canadensis* (L.) Carr. Changes in morphology and cell wall structure // *Wood Fiber Sci*. 1984. V. 16. P. 20–36.
- Gruber A.J., Wieser G., Oberhuber W.* Intra-annual dynamics of stem CO₂ efflux in relation to cambial activity and xylem development in *Pinus cembra* // *Tree Physiology*. 2009. V. 29. № 5. P. 641–649.
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpp001>
- Herrera-Ramírez D., Sierra C.A., Römermann C. et al.* Starch and lipid storage strategies in tropical trees relate to growth and mortality // *New Phytologist*. 2021. V. 230. P. 139–154
<https://doi.org/10.1111/nph.17239>
- Hoch G., Körner C.* The carbon charging of pines at the climatic treeline: a global comparison // *Oecologia*. 2003. V. 135. P. 10–21.
<https://doi.org/10.1007/s00442-002-1154-7>
- Lavigne M.B., Little C.H.A., Ridin R.T.* Changes in stem respiration rate during cambial reactivation can be used to refine estimates of growth and maintenance respiration // *New Phytol*. 2004. V. 162. P. 81–93.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01004.x>
- Mahmood A.* Number of initial division as a measure of activity in the early cambial growth in *Pinus*. // *Pak. J. For*. 1971. V. 21. № 1. P. 27–42.
- Maier C.A., Zarnoch S.J., Dougherty P.M.* Effects of temperature and tissue nitrogen on dormant season stem and branch maintenance respiration in a young loblolly pine (*Pinus taeda*) plantation // *Tree Physiol*. 1998. V. 18. P. 11–20.
<https://doi.org/10.1093/treephys/18.1.11>
- Mäkelä A., Valentine H.T.* The ratio of NPP to GPP: evidence of change over the course of stand development //

- Tree Physiol. 2001. V. 21. № 14. P. 1015–1030.
<https://www.researchgate.net/publication/11786808>
- Miller T.W., Stangler D.F., Larysch E. et al. Plasticity of seasonal xylem and phloem production of Norway spruce along an elevational gradient // *Trees*. 2020. V. 24. P. 43–52.
<https://doi.org/10.1007/s00468-020-01997-6>
- McDowell N.G. Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality // *Plant Physiol*. 2011. V. 155. P. 1051–1059.
<https://doi.org/10.1104/pp.110.170704>
- Murmanis L., Sachs J.B. Seasonal development of secondary xylem in *Pinus strobes* L. // *Wood Sci. Technol*. 1969. V. 3. P. 177–193.
- Nonami H., Boyer J.S. Primary events regulating stem growth at low water potentials // *Plant Physiol*. 1990. V. 93. P. 1601–1609.
<https://doi.org/10.1104/pp.93.4.1601>
- Qaderi M.M., Martel A.B., Dixon S.L. Environmental Factors Influence Plant Vascular System and Water Regulation // *Plants*. 2019. V. 8. № 3. P. 65
<https://doi.org/10.3390/plants8030065>
- Oberhuber W., Kofler W., Schuster R., Wieser G. Environmental effects on stem water deficit in co-occurring conifers exposed to soil dryness // *Int. J. Biometeorol*. 2015. V. 59. P. 417–426.
<https://doi.org/10.1007/s00484-014-0853-1>
- Oribe Y., Funada R., Kubo T. Relationships between cambial activity, cell differentiation and the localization of starch in storage tissues around the cambium in locally heated stems of *Abies sachalinensis* (Schmidt) Masters // *Trees*. 2003. V. 17. P. 185–192.
<https://doi.org/10.1007/s00468-002-0231-1>
- Rossi S., Deslauriers A., Anfodillo T. Evidence of threshold temperatures for xylogenesis in conifers at high altitudes // *Oecologia*. 2007. V. 152. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1007/s00442-006-0625-7>
- Rossi S., Deslauriers A., Gričar J. et al. Critical temperatures for xylogenesis in conifers of cold climates // *Glob. Ecol. Biogeogr*. 2008. V. 17. P. 696–707.
<https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2008.00417.x>
- Ryan M.G. Growth and maintenance respiration in stems of *Pinus contorta* and *Picea engelmannii* // *Can. J. For. Res*. 1990. V. 20. P. 48–57.
<https://doi.org/10.1139/x90-008>
- Ryan M.G., Waring R.H. Maintenance respiration and stand development in a subalpine lodgepole pine forest // *Ecology*. 1992. V. 73. P. 2100–2108.
<https://doi.org/10.2307/1941458>
- Ryan M.G., Gower S.T., Hubbard R.M., Waring R.H., Gholz H.L., Wendell P., Cropper W.P., Running S.W. Woody tissue maintenance respiration of four conifers in contrasting climates // *Oecologia*. 1995. V. 101. P. 133–140.
<https://doi.org/10.1007/BF00317276>
- Ryan M.G. Temperature and tree growth // *Tree Physiol*. 2011. V. 30. P. 667–668.
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpq033>
- Sauter J.J., Van Cleve R. Storage, mobilization and interrelation of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees // *Trees: Structure and Function*. 1994. V. 8. № 6. P. 297–304.
- Savage J.A., Clearwater M.J., Haines D. et al. Allocation, stress tolerance and carbon transport in plants: How does phloem physiology affect plant ecology? // *Plant Cell Env*. 2016. V. 39. P. 709–725.
<https://doi.org/10.1111/pce.12602>
- Seo J.W., Eckstein D., Jalkanen R., Rickebusch S., Schmitt U. Estimating the onset of cambial activity in Scots pine in northern Finland by means of the heat-sum approach // *Tree Physiol*. 2008. V. 28. P. 105–112.
<https://doi.org/10.1093/treephys/28.1.105>
- Schulze E.-D., Čermák J., Matyssek R. Canopy transpiration and flow rate fluxes in the xylem of the trunk of *Larix* and *Picea* trees—a comparison of xylem flow, porometer and cuvette measurements // *Oecologia (Berlin)* 1985. V. 66. № 4. P. 475–483.
- Stockfors J., Linder S. Effect of nitrogen on the seasonal course of growth and maintenance respiration in stems of Norway spruce trees // *Tree Physiol*. 1998. V. 18. P. 155–166.
- Sun Y., Wang C., Chen H.Y.H., Ruan H. Response of Plants to Water Stress: A Meta-Analysis // *Front Plant Sci*. 2020. V. 11. P. 978.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00978>
- Swidrak I., Gruber A., Oberhuber W. Xylem and phloem phenology in co-occurring conifers exposed to drought // *Trees*. 2014. V. 28. P. 1161–1171.
<https://doi.org/10.1007/s00468-014-1026-x>
- Tabakova M., Arzac A., Martínez E., Kirdeyanov A.V. Climatic factors controlling *Pinus sylvestris* radial growth along a transect of increasing continentality in southern Siberia // *Dendrochronologia*. 2020. V. 62. P. 125709.
<https://doi.org/10.1016/j.dendro.2020.125709>
- Williams A.P., Allen C.D., Macalady A.K. et al. Temperature as a potent driver of regional forest drought stress and tree mortality // *Nature Climate Change*. 2012. V. 3. P. 292–297.
- Zabuga V.F., Zabuga G.A. Assessment of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Respiration at Culmination Stage of Its Current Growth in Forest_Steppe Zone of Pre_Baikal Area // *Contemporary Problems of Ecology*. 2014. V. 7. № 1. P. 72–83.
- Zha T., Kellomäki S., Wang K., Ryyppö A., Niinistö S. Seasonal and annual stem respiration of Scots pine trees under boreal conditions // *Annals of Botany*. 2004. V. 94. P. 889–896.
- Zweifel R., Sterck F., Braun S. et al. Why trees grow at night // *New Phytologist*. 2021. V. 231. № 6. P. 2174–2185
<https://doi.org/10.1111/nph.175521>

Xylogenesis, Photosynthesis and Respiration in Scots Pine Trees Growing in Eastern Siberia (Russia)

G. F. Antonova^{1,*}, V. V. Stasova¹, G. G. Suvorova², and V. A. Oskolkov²

¹*Sukachev Institute of Forest, SB of RAS, Krasnoyarsk, Russia*

²*Siberian Institute of Physiology and Biochemistry of Plants, SB of RAS, Irkutsk, Russia*

*e-mail: antonova_cell@mail.ru

Wood formation (xylogenesis) in trees depends on photosynthesis and respiration. Temperature and precipitation affect photosynthesis and respiration and accordingly growth processes in a tree. We studied xylem and phloem cell formation, cell wall biomass accumulation, photosynthesis productivity, and trunk respiration in Scots pine trees growing in eastern Siberia (Russia) in the years with contrasting summer-weather conditions. The number of cells in the differentiation zones and the morphological parameters of the cells produced by the cambium were determined on samples taken mainly after 10 days of the growing season from the trunks of 10 trees. The activity of cambium and the accumulation of cell wall biomass at individual stages of tree ring wood formation and their relationship to the photosynthetic productivity of the crown and the cost of stem respiration were assessed. The division of cambial cells into xylem or phloem sides depended on the combination of temperature/precipitation in separate periods of the season and on reactions of photosynthesis and respiration to these factors. Biomass accumulation was bimodal with maxima in June (development of early wood) and predominantly in August (development of thick-walled late tracheids). This was due to the optimal combination of air temperature and moisture, which provided a sufficient influx of assimilates and their low consumption by respiration. It is shown that cambial activity and accumulation of biomass in the cell walls of Scots pine annual wood rings depend on the cumulative effect of temperature and precipitation on photosynthesis and stem respiration throughout the growing season. Fluctuations in external factors changed the balance between the inflow of photoassimilates and their utilization. As a result, photoassimilates were used not only for the synthesis of cell wall biomass, but were also partly converted to reserve substances, in particular, into starch. Our study expands understanding of the internal processes that lead to the formation of wood under the influence of external factors.

Keywords: *Pinus sylvestris* L., cambium activity, biomass, photosynthesis, respiration, temperature, precipitation

ИНДУКТОР СТРЕССА ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ДИТИОТРЕИТОЛ ВЛИЯЕТ НА МОРФОЛОГИЮ И ПОДВИЖНОСТЬ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА И КЛЕТОК ФИБРОСАРКОМЫ ЛИНИИ HT1080

© 2023 г. Е. П. Турищева^а, *, Г. А. Ашниева^а, М. С. Вильданова^а, Е. А. Смирнова^а

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

*e-mail: kitten-caterina@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.07.2023 г.

После доработки 09.08.2023 г.

Принята к публикации 10.08.2023 г.

Некоторые индукторы стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) способны влиять на подвижность нормальных и опухолевых клеток. Однако неизвестно, какие механизмы опосредуют такой эффект и является ли он следствием стресса ЭПР. Целью нашей работы являлось исследование влияния индуктора стресса ЭПР дитиотреитола (ДТТ) на морфологические признаки, отражающие локомоторные свойства клеток, а также непосредственно на миграторные свойства культивируемых дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы HT1080 человека. Мы показали, что ДТТ вызывает нарушение организации актинового цитоскелета в обоих типах клеток, что сопровождается изменением клеточной поверхности и формы клеток, а также уменьшением площади их распластывания. Кроме того, в дермальных фибробластах наблюдалось уменьшение количества фокальных контактов. ДТТ также снижал подвижность дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы. Для анализа клеточной подвижности и определения момента возникновения ее изменения мы разработали метод, показавший, что изменение миграторных свойств клеток фибросаркомы при культивировании с ДТТ начиналось раньше, чем в дермальных фибробластах. Таким образом, активация стресса ЭПР с помощью ДТТ сопровождается изменением организации актинового цитоскелета и подвижности в нормальных и опухолевых клетках человека. Следовательно, стресс ЭПР, запускаемый различными индукторами с разными механизмами действия, влияет на подвижность нормальных и опухолевых клеток, что необходимо учитывать при разработке противоопухолевых препаратов, вызывающих гибель клеток через активацию стресса ЭПР.

Ключевые слова: дитиотреитол, подвижность клеток, фибробласты, клетки фибросаркомы, стресс ЭПР

DOI: 10.31857/S0475145023050063, EDN: KAKJKK

ВВЕДЕНИЕ

Определенные химические вещества и условия окружающей среды могут нарушать биосинтетические процессы в клетках, вызывая избыточное образование и накопление в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) поврежденных и неправильно уложенных белков, что приводит к состоянию, которое называется стресс ЭПР (Oslowski, Urano, 2011; Sicari et al., 2020; Турищева и др., 2022). В ответ на стресс ЭПР в клетке развивается физиологическая адаптивно-компенсаторная реакция, известная как ответ на неправильно свернутые белки, или UPR. Если с помощью активации UPR удастся восстановить нормальное функционирование ЭПР, то клетка выживает, если этого не происходит, то активируется клеточная гибель.

Протеостаз является частью общего механизма поддержания клеточного гомеостаза, и поэтому нерегулируемый стресс ЭПР рассматривается как важный фактор, который может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний (Hetz, Saxena, 2017) и туморогенезу (Limia et al., 2019). Отмечается, что UPR может становиться важным фактором в злокачественной трансформации и росте опухолей путем влияния на миграцию и инвазию опухолевых клеток, ремоделирование внеклеточного матрикса, модификацию клеточных адгезий, эпителиально-мезенхимный переход, модуляцию сигнальных путей, связанных с подвижностью клеток, т.е. на все процессы, в которых задействован цитоскелет (Limia et al., 2019).

В настоящее время накоплено много данных, касающихся молекулярных механизмов актива-

ции стресса ЭПР, сигнальных каскадов, ведущих к выживанию или гибели клеток, а также способов индукции стресса ЭПР (Corazzari et al., 2017; Almanza et al., 2019; Турищева и др., 2022). Экспериментальными индукторами стресса ЭПР являются самые разные химические агенты. Среди наиболее распространенных — туникамицин, который нарушает N-гликозилирование белков в ЭПР (Yoo et al., 2018); тапсигаргин, ингибирующий работу каналов SERCA в ЭПР и тем самым вызывающий нарушение метаболизма кальция (Wu et al., 2019); бортезомиб — специфический ингибитор протеасом 20S, блокирующий систему ЭПР-ассоциированной деградации белка (ERAD) и вызывающий накопление неправильно уложенных белков в ЭПР (Brüning et al., 2009), и дитиотреитол (ДТТ), нарушающий формирование S—S связей у синтезируемых белков (Ren et al., 2018).

Следует отметить, что некоторые индукторы стресса ЭПР являются медицинскими препаратами. Так, например, туникамицин — антибиотик (Ren et al., 2018), бортезомиб — противоопухолевый препарат, используемый для лечения множественной миеломы и некоторых неходжкинских лимфом (Curran, McKeage, 2009), тапсигаргин — также противоопухолевый агент (Wu et al., 2019) и потенциальный противовирусный препарат (Al-Beltagi et al., 2021). Но помимо влияния на протеостаз эти вещества могут оказывать влияние на разные клеточные функции и характеристики. Это особенно важно в связи с тем, что, например, при терапии и лечении опухолевых заболеваний воздействию подвергаются не только патологически измененные, но и нормальные клетки организма. Так, например, показано, что тапсигаргин индуцирует апоптоз в опухолевых клетках линии A549, однако у выживших клеток вызывает изменение формы и нарушение организации актинового цитоскелета (Wang et al., 2014). Туникамицин может способствовать апоптозу и повышать чувствительность раковых клеток к химиотерапии и лучевой терапии (Jung et al., 2012; Wu et al., 2018), таким образом устраняя эффект устойчивости к химиотерапевтическим препаратам. В других исследованиях было показано, что туникамицин усиливает миграцию опухолевых клеток кишечника (Gundamaraju et al., 2021), что будет также способствовать более активному метастазированию. Бортезомиб индуцирует аутофагическую гибель в культивируемых клетках эндотелия человека HUVES, при этом клетки вытягиваются, становятся веретеноподобными и отростчатыми, наблюдается вакуолизация цитоплазмы (Belloni et al., 2010). Анализ данной литературы дает основания полагать, что при действии туникамицина (Kohn et al., 1979), тапсигаргина (Földi et al., 2013) и бортезомиба (Brüning et al., 2009; Belloni et al., 2010) происходит изменение формы культивируемых

нормальных и опухолевых клеток, причем этот эффект носит обратимый характер.

Однако, с чем связаны такие изменения формы клеток в ответ на индукцию стресса ЭПР, неизвестно. Кроме этого, вопрос о том, отличается ли реакция на стресс ЭПР у нормальных и патологически измененных клеток, представляет и практический интерес. В связи с этим целью нашей работы было исследовать влияние распространенного экспериментального индуктора стресса ЭПР — ДТТ — на морфологические признаки, отражающие локомоторные свойства клеток (клеточная поверхность, форма и площадь клеток, состояние актинового цитоскелета, контакты клеток с субстратом), а также непосредственно на миграторные свойства культивируемых нормальных и опухолевых клеток человека соединительнотканного происхождения — дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы НТ1080.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток

Клетки выращивали в стандартных условиях (+37°C и 5% CO₂). Дермальные фибробласты человека, предоставленные Е.Р. Андреевой (Институт медико-биологических проблем, РАН), культивировали в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (FBS, Biosera, Франция), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко) и 60 мкг/мл антибиотика гентамицина (Белмедпрепараты, Беларусь). Клетки фибросаркомы человека линии НТ1080, предоставленные И.И. Киреевым (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова), культивировали в среде DMEM (ПанЭко) с теми же добавками. Клетки пассировали смесью растворов трипсина (ПанЭко) и Версена (ПанЭко) в соотношении 3 : 7. При проведении экспериментов дермальные фибробласты и клетки фибросаркомы высаживали в чашки Петри в концентрации 30000 и 40000 кл./мл, соответственно, или в чашки Петри с покровными стеклами в концентрации 25000 и 30000 кл./мл, соответственно, и культивировали в течение 24 ч. Через 24 ч кондиционированную среду в чашках Петри заменяли на свежую среду, содержащую 2 мМ ДТТ (Pan-ReasAppliChem, Германия). В контрольных чашках Петри кондиционированную среду заменяли на свежую среду без ДТТ. Срок культивирования клеток в присутствии ДТТ составлял 24 ч.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Покровные стекла с клетками промывали фосфатно-солевым буферным раствором PBS (pH 7.4, Merck, США) 5 мин и затем фиксировали 2.5% раствором глутарового альдегида (Ted Pella

Inc., США) в течение 1 ч. Затем клетки на стеклах отмывали от фиксатора с помощью PBS 3 раза по 5 мин и обезвоживали в холодном (+4°C) этаноле возрастающей концентрации (от 40 до 96% с шагом в 10%, 2 смены каждой концентрации по 10 мин). Далее образцы проводили по смесям ацетона (Реахим, Россия) с этанолом с последовательно возрастающей концентрацией ацетона (1 : 3, 1 : 1, 3 : 1; 3 смены каждой смеси по 5 мин). Затем образцы помещали в чистый ацетон на 1 ч и высушивали в критической точке. Высушенные образцы покрывали 1–2 нм Au–Pd пленкой. Образцы анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (ускоряющее напряжение 20 кВ; SEI mode, JEOL, Япония).

Цитохимическое и иммуноцитохимическое маркирование

Клетки на покровных стеклах фиксировали 4% раствором формальдегида (Реахим), разведенным в PBS. Далее для **цитохимического** выявления полимеризованного F-актина клетки на стеклах инкубировали с 0.005 мг/мл фаллоидина, меченого TRITC (тетраметилродамин В изотиоцианат) (Merck), во влажной камере при +37°C в течение 30 мин. Для **иммуноцитохимического маркирования** фиксированные формальдегидом клетки пермеабелизовали с помощью 0.1% Triton X-100 (Serva, Германия). Для выявления винкулина использовали первичные мышинные моноклональные антитела к винкулину (Merck) и вторичные моноклональные антитела козы к IgG мыши (Thermo Fisher Scientific, США). Ядра визуализировали с помощью DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) (Merck); препараты заключали в Mowiol (Hoechst, Германия). Образцы анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Zeiss, Германия) (объектив $\times 63$ PlanApo NA 1.40 Oil), снабженного черно-белой цифровой камерой Carl Zeiss AxioCam (Zeiss AxioCam 202 mono, Германия), и моторизованного инвертированного флуоресцентного фазово-контрастного микроскопа (Keyence BZ-9000E BIOREVO, Boston Microscopes, США) (объектив $\times 60$ PlanApo NA 1.40 Oil).

Прижизненная съемка клеток

Прижизненную съемку проводили с использованием специальной инкубационной камеры, поддерживающей температуру среды на уровне +37°C. Синие и фиолетовые области спектра света, использовавшегося для освещения камеры, отсекали с помощью светофильтров. Клетки в необходимой концентрации высаживали в чашки Петри. Спустя 24 ч культивирования кондиционированную среду заменяли свежей средой, содержащей 2 мМ ДТТ (для экспериментальных чашек

Петри), или не содержащей ДТТ (для контрольных чашек Петри). Далее чашки Петри устанавливали в камеру для прижизненных наблюдений. Съемка клеток в чашке Петри производилась каждые 90 мин в течение суток с момента начала эксперимента.

Обработка и анализ результатов

Обработка полученных изображений проводилась при помощи программного обеспечения (ПО) Fiji. Изменение площади распластывания клеток оценивалось при измерении площади поверхности, ограниченной клеточным контуром. Траектории движения отдельных клеток были получены с помощью плагина MTrackJ. Референсной точкой при отслеживании клеток служил геометрический центр ядра (ГЦЯ) каждой из них. ГЦЯ – это центр тяжести для множества центров масс однородной геометрической фигуры на плоскости, коей и является изображение клеточного ядра. Визуализация и коллажирование полученных треков клеточной подвижности проводились при помощи среды создания и редактирования изображений CorelDRAW.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных выборочных значений площади распластывания, количества фокальных контактов и параметров клеточной подвижности проводился при помощи встроенных пакетов ПО Graphpad 8.0. Сравнительный анализ контрольных и экспериментальных групп проводился с использованием непараметрического двустороннего U-критерия Манна–Уитни. При получении p -значения ≤ 0.05 различия считались статистически значимыми.

Для анализа клеточной подвижности и определения момента возникновения ее изменения мы разработали метод, являющийся адаптацией $\Delta\Delta St$ метода. Основная идея нашего метода заключается в количественной максимизации детектируемых отличий, связанных с изменением характера подвижности фибробластов и клеток линии HT1080. При анализе мы ввели следующие метрики: средняя скорость в контрольной и экспериментальной группах, метрика разности усредненных значений скорости контрольной и экспериментальной групп по модулю (ΔV) и метрика отличия каждого индивидуального измерения от ΔV ($\Delta\Delta V$). При дальнейшем возведении вещественного числа (в нашем случае эту роль взяла на себя экспонента) в степень $\Delta\Delta V_{(эксп)} - \Delta\Delta V_{(C1/C2/C3)}$ дифференцирующий эффект масштабируется для последующей интерпретации. Таким образом, для каждого измерения скорости при действии ДТТ были получены величины $(\exp \Delta\Delta V_{(эксп)} - \Delta\Delta V_{(C1/C2/C3)})$, распре-

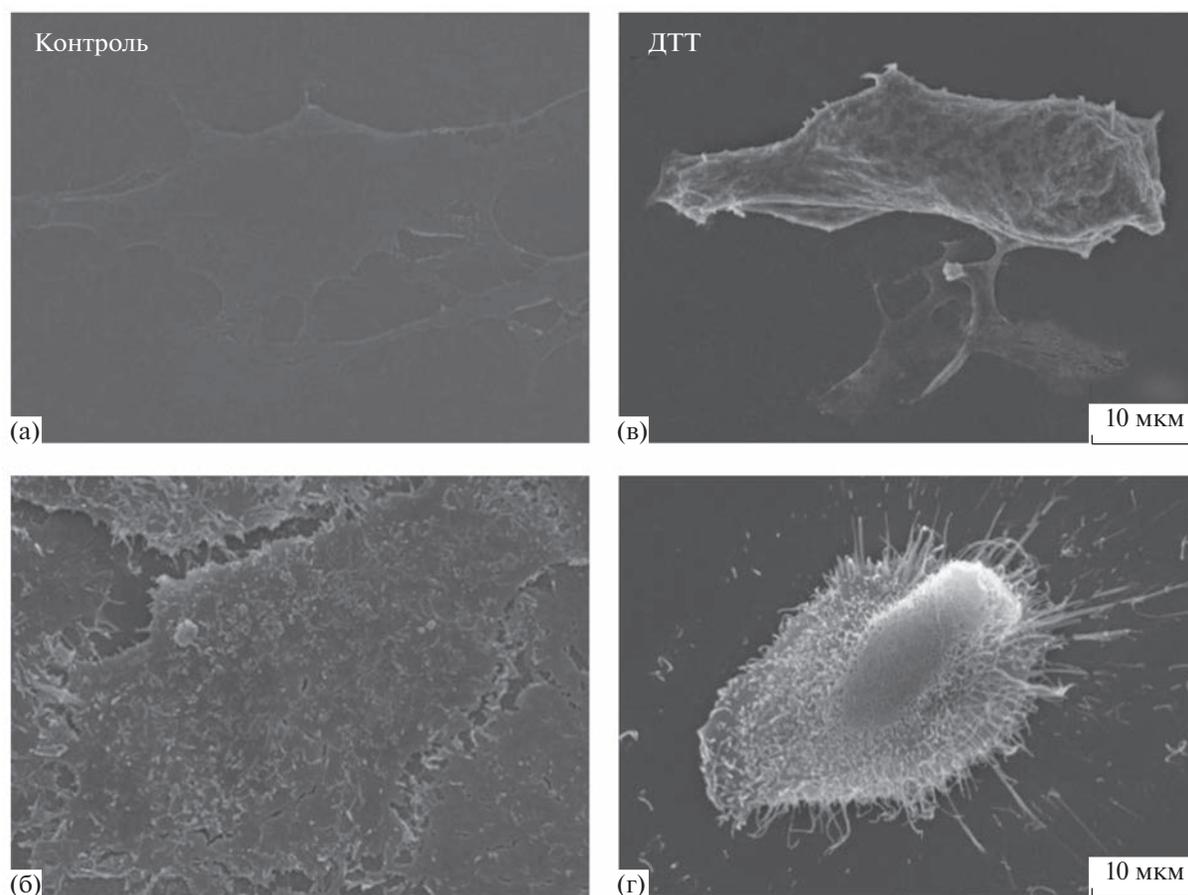


Рис. 1. Влияние ДТТ на форму, распластанность и микрорельеф клеточной поверхности дермальных фибробластов (а, в) и клеток фибросаркомы (б, г), СЭМ. (а, б) Контроль; (в, г) 24 ч воздействия ДТТ. Масштабный отрезок – 10 мкм.

деление которых приведено на рис. 8. Затем каждый столбец из экспериментальной группы измерений был выделен цветом с использованием условного форматирования этих величин ($\exp \Delta \Delta V_{(\text{эксп})} - \Delta \Delta V_{(C1/C2/C3)}$). Подробнее метод описан в разделе “РЕЗУЛЬТАТЫ”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ клеточной поверхности

С помощью СЭМ мы проанализировали поверхность дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы НТ1080 (рис. 1) в нормальных условиях культивирования и при действии ДТТ.

В нормальных условиях культивирования в популяции дермальных фибробластов (рис. 1а) присутствовали клетки разной формы: веретеновидные, отростчатые, с разной степенью поляризации. Клеточные отростки имели разную длину и заканчивались филоподиями. Все клетки были тонкими, хорошо распластанными, со сглаженным микрорельефом поверхности. После воздействия ДТТ наблюдалось изменение формы и рельефа по-

верхности дермальных фибробластов (рис. 1в): клетки становились более выпуклыми и “поджатыми”, их отростки – более толстыми и рельефными, на дорзальной поверхности клеток появлялись бугристые и складчатые образования.

В популяции клеток фибросаркомы в нормальных условиях культивирования (рис. 1б) присутствовали клетки разной формы, также с разной степенью поляризации и распластывания. Дорзальная поверхность клеток была покрыта множеством микроворсинок и складок. После воздействия ДТТ наблюдалось изменение формы и рельефа поверхности клеток фибросаркомы (рис. 1г): клетки поджимались и становились более выпуклыми, на их поверхности отмечались многочисленные филоподии и вздутия, морфологически похожие на те, которые формируются при блеббинге.

Таким образом, ДТТ вызывал поджимание клеток и изменение формы у обоих типов клеток. Наблюдалось также изменение поверхности фибробластов и клеток фибросаркомы, но эти изменения носили разный характер.

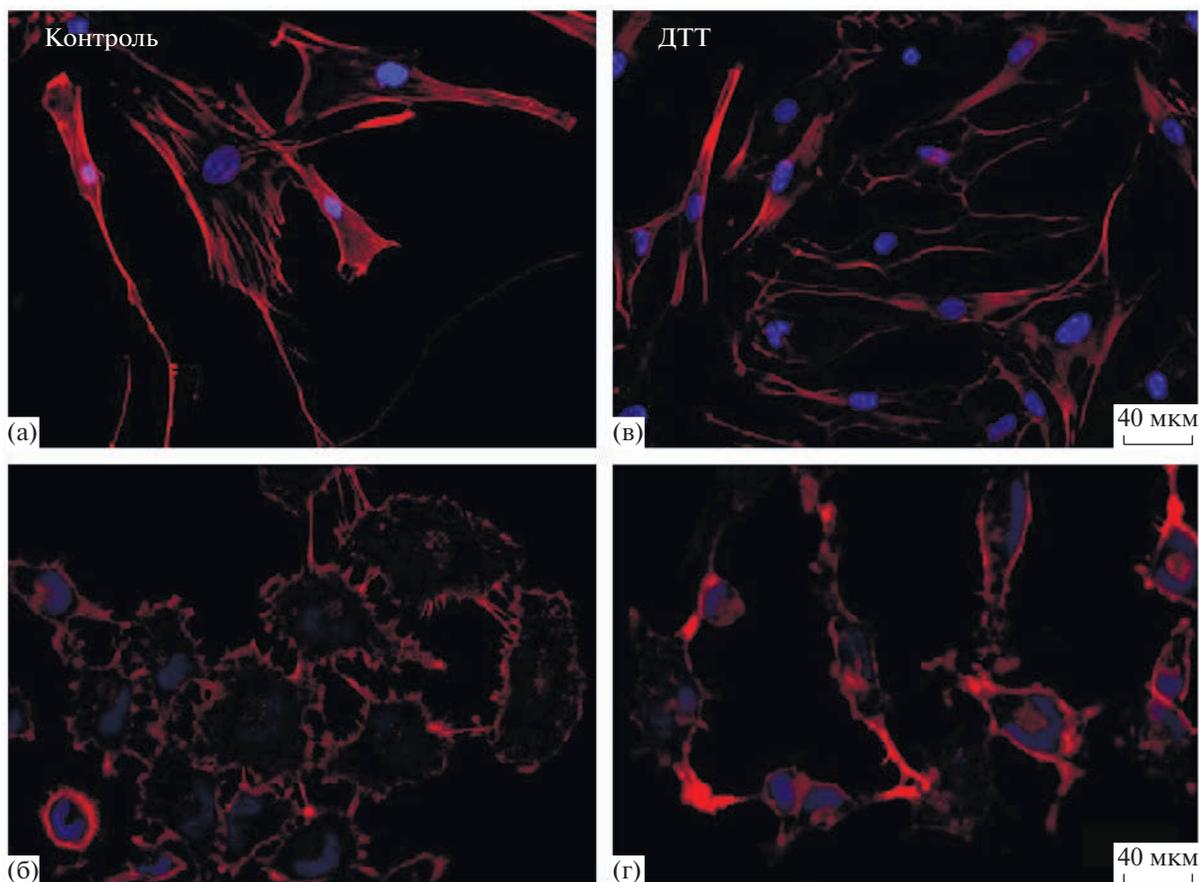


Рис. 2. Влияние ДТТ на состояние актиновых филаментов дермальных фибробластов (а, в) и клеток фибросаркомы (б, г). Цитохимическое выявление актиновых филаментов с помощью фаллоидина, конъюгированного с TRITC (красный; ядра окрашены в синий цвет DAPI). (а, б) Контроль; (в, г) 24 ч воздействия ДТТ. Масштабный отрезок – 40 мкм.

Анализ актинового цитоскелета

Изменения формы и поверхности клеток связаны с состоянием актинового цитоскелета. Поэтому мы проанализировали актиновый цитоскелет дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы в нормальных и экспериментальных условиях культивирования.

В нормальных условиях культивирования в дермальных фибробластах на переднем крае поляризованных клеток выявлялась плотная сеть актиновых филаментов, в центральной части клеток сеть была более разреженная (рис. 2а). Актин также выявлялся в клеточных отростках и филоподиях. В центральной и хвостовой части клеток присутствовали толстые и прямые пучки актиновых филаментов, по-видимому, представляющие собой стресс-фибриллы. При действии ДТТ наблюдалась дезорганизация системы актиновых филаментов (рис. 2в): пучки актина, характерные для контрольных клеток, стали менее выраженными или отсутствовали. Кроме того, выявление актиновых филаментов в кортикальной зоне отчетливо указывало на то, что клетки меня-

ли свою форму и характер распластывания на субстрате, а также становились отростчатыми.

В клетках фибросаркомы в нормальных условиях культивирования выявлялась хорошо выраженная сеть кортикального актина и более разреженная сеть актина в центральной части клеток (рис. 2б). Пучки актиновых филаментов не выявлялись или были короткими и хаотически ориентированными. Между соседними клетками часто были видны тонкие выросты, содержащие актин и тянущиеся от одной клетки к другой в виде мостика. При действии ДТТ клетки фибросаркомы становились более поджатыми и отростчатыми (рис. 2г). Наблюдалось усиление окрашивания актина как в зоне кортекса, так и в центральной части клеток, что, по-видимому, связано с уменьшением площади распластывания и поджиманием клеток. Длинные нитевидные выросты, тянущиеся между соседними клетками, при действии ДТТ сохранялись.

Таким образом, ДТТ вызывал нарушение организации актинового цитоскелета только в дермальных фибробластах.

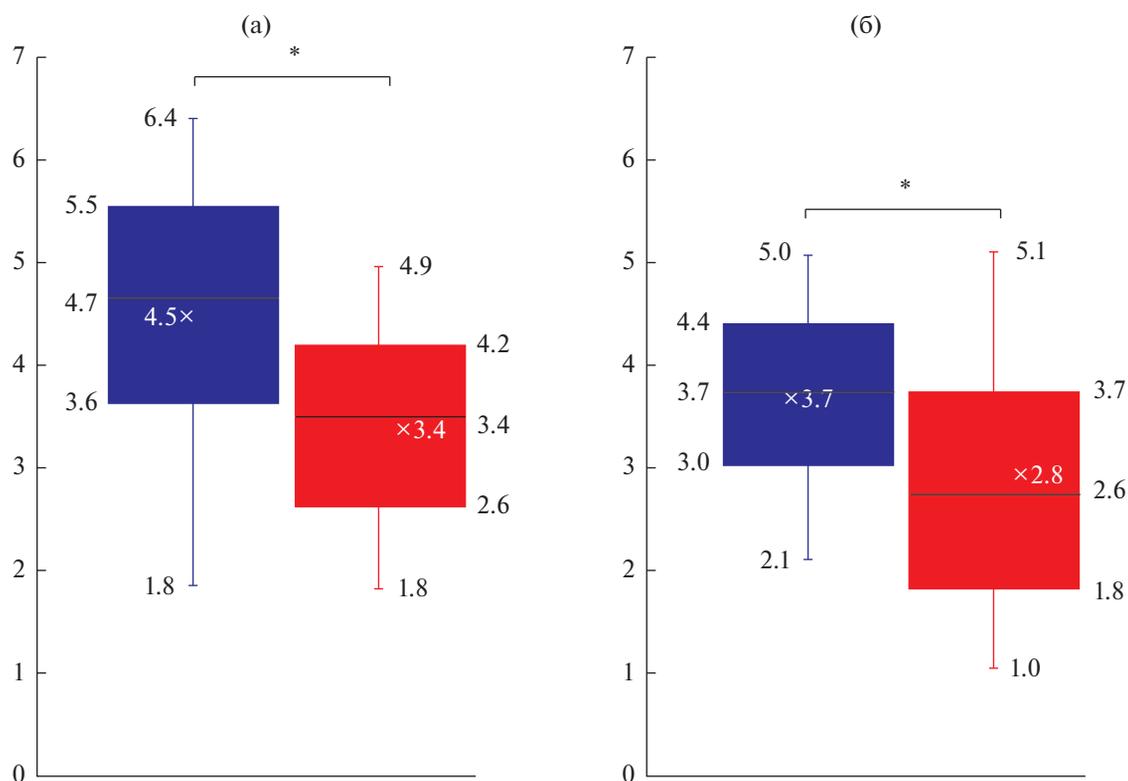


Рис. 3. Измерение площади дермальных фибробластов (а) и клеток фибросаркомы (б) в нормальных условиях культивирования (синий) и при действии ДТТ (красный). Площадь выражена в условных единицах, где $1 \approx 100 \text{ мкм}^2$. Объем контрольной выборки дермальных фибробластов $n = 56$, объем экспериментальной выборки дермальных фибробластов $n = 82$. Объем контрольной выборки клеток фибросаркомы НТ1080 $n = 154$, объем экспериментальной выборки клеток фибросаркомы $n = 75$. * – $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни.

Оценка площади клеток

Хорошо выявляемый при маркировании фаллоидином кортикальный слой актина позволил оценить изменение площади дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы после воздействия ДТТ.

Было проанализировано 56 фибробластов в нормальных условиях культивирования и 82 фибробласта после воздействия ДТТ. Оказалось, что ДТТ вызывал уменьшение площади распластывания дермальных фибробластов в 1.3 раза (рис. 3а).

Анализ 154 клеток фибросаркомы в нормальных условиях культивирования и 75 клеток фибросаркомы после воздействия ДТТ показал, что в этих клетках ДТТ также вызывал уменьшение площади распластывания в 1.3 раза (рис. 3б).

Таким образом, при действии ДТТ происходило уменьшение площади распластывания дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы НТ1080 в 1.3 раза.

Характеристика фокальных контактов

Поскольку в дермальных фибробластах при действии ДТТ мы наблюдали дезорганизацию

пучков актиновых филаментов, а стресс-фибриллы у фибробластов могут быть связаны с фокальными контактами (Tojkander et al., 2012), с помощью иммуоцитохимического выявления винкулина мы проанализировали распределение фокальных контактов в дермальных фибробластах. В нормальных условиях культивирования фокальные контакты были распределены по вентральной поверхности клеток и выявлялись в клеточных отростках (рис. 4а, 4б). ДТТ вызывал перераспределение фокальных контактов в дермальных фибробластах (рис. 4в, 4г): в распластанных и отростчатых клетках фокальные контакты присутствовали преимущественно в клеточных отростках, а в сильно поджатых клетках – наоборот, в центральной части клеток. Кроме того, при действии ДТТ количество фокальных контактов на клетку уменьшалось в 4 раза (рис. 4д). Следовательно, ДТТ вызывал уменьшение числа фокальных контактов у дермальных фибробластов.

В клетках фибросаркомы использование антител к винкулину выявило диффузное окрашивание цитоплазмы в теле клеток и точечные фокальные контакты по краям ламеллы (рис. 5а, 5б). После культивирования с ДТТ такое окрашивание ци-

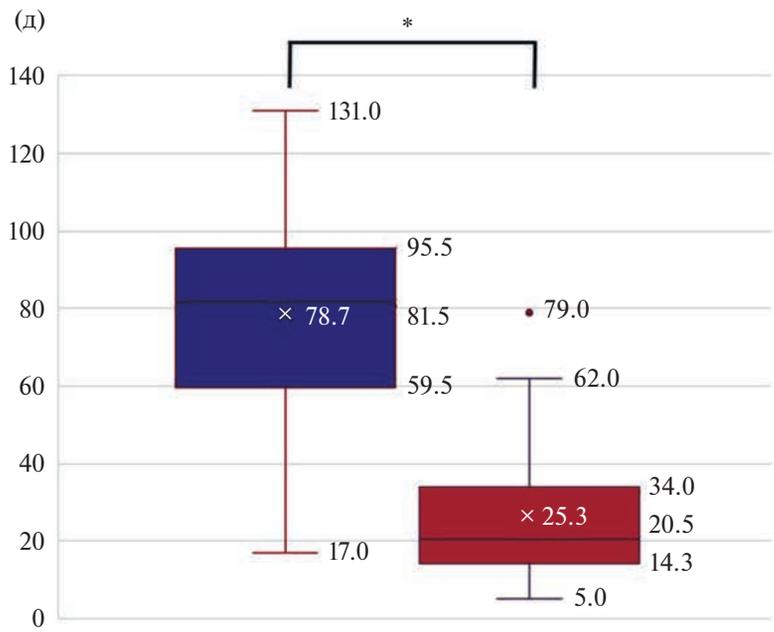
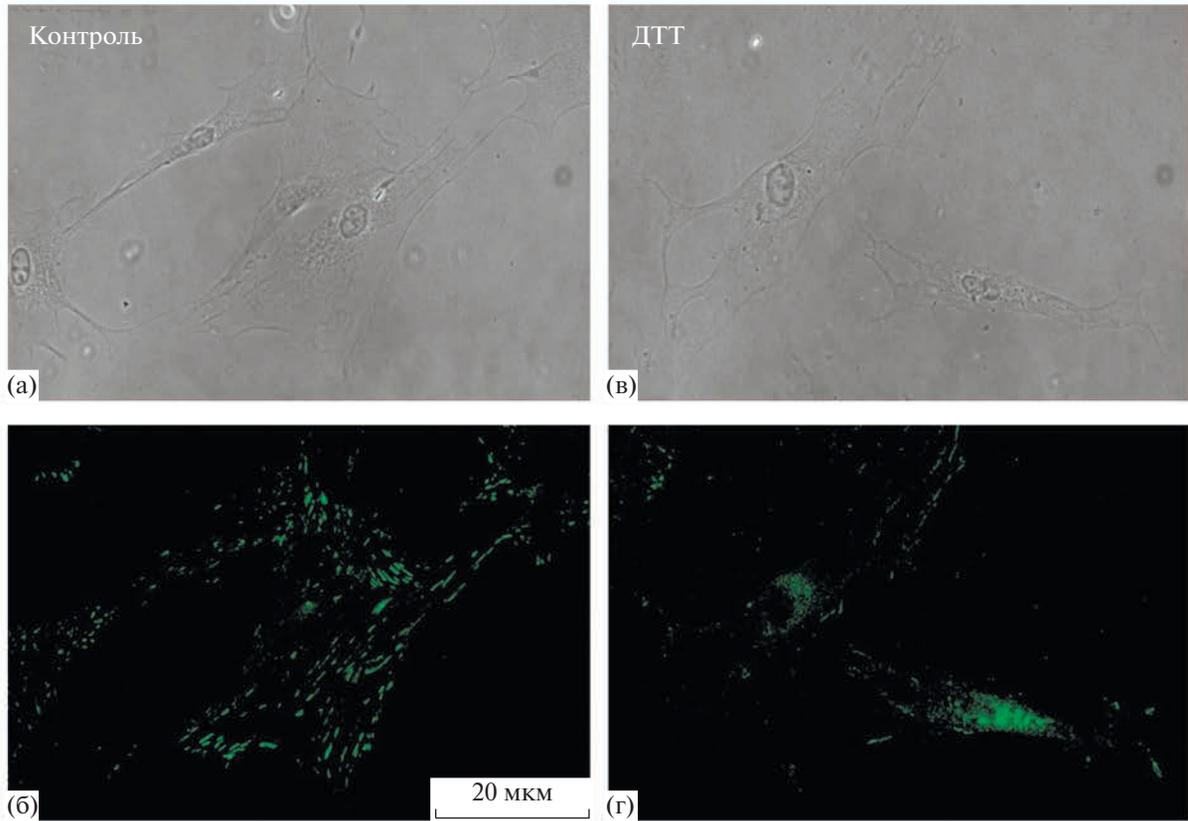


Рис. 4. Влияние ДТГ на распределение и количество фокальных контактов в дермальных фибробластах. (а, в) Фазовый контраст; (б, г) иммуноцитохимическое выявление винкулина (зеленый). (а, б) Контроль; (в, г) 24 ч воздействия ДТГ. Масштабный отрезок (а–г) – 20 мкм. (д) Подсчет количества фокальных контактов на клетку в нормальных условиях культивирования (синий) и при действии ДТГ (красный). Объем контрольной выборки $n = 44$, объем экспериментальной выборки $n = 32$. * – $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни.

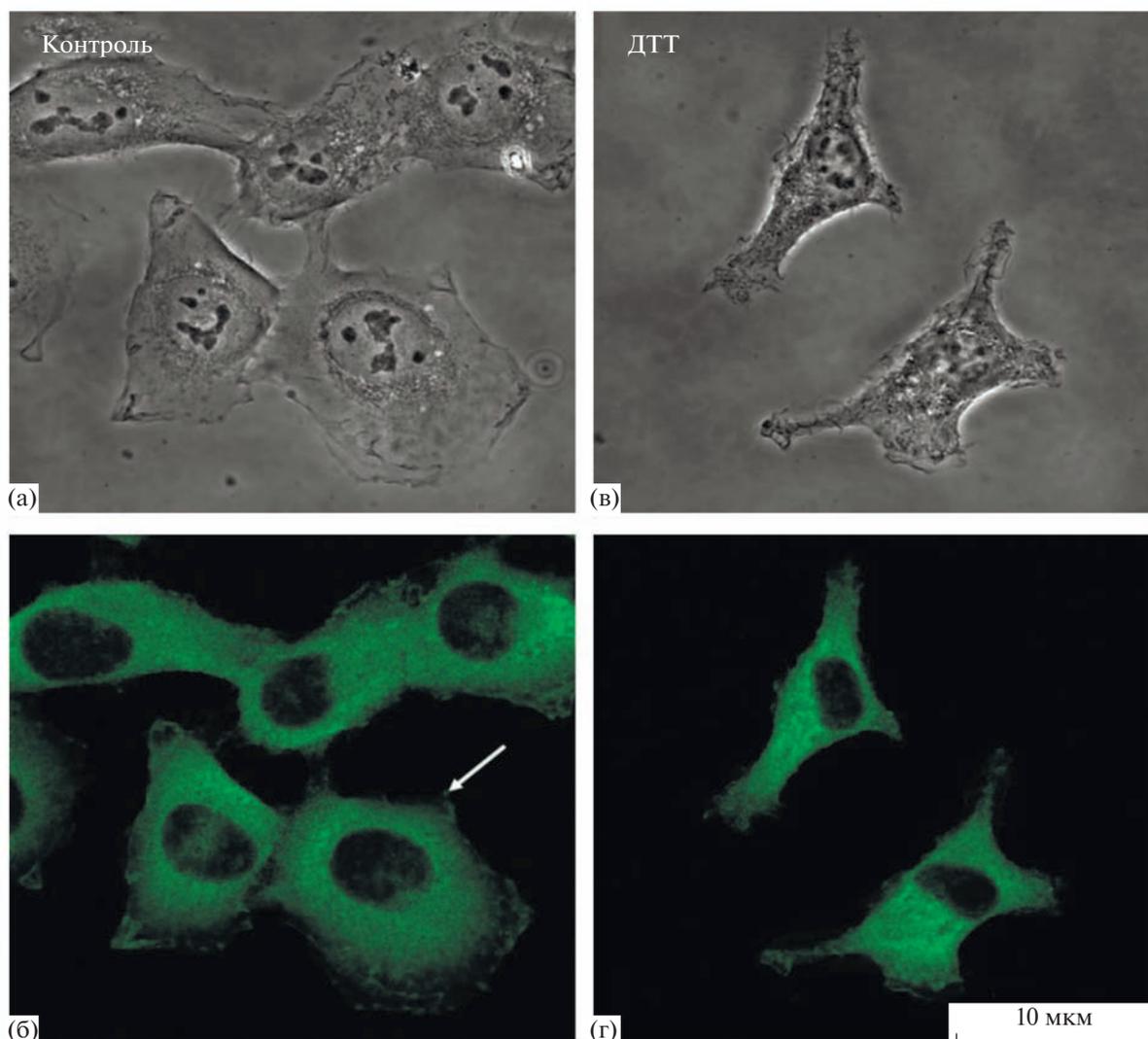


Рис. 5. Выявление винкулина в клетках фибросаркомы HT1080. (а, в) Фазовый контраст; (б, г) иммуноцитохимическое выявление винкулина (зеленый). (а, б) Контроль; (в, г) 24 ч воздействия ДТТ. Стрелкой показан фокальный контакт. Масштабный отрезок – 10 мкм.

топлазмы сохранялось. Диффузное окрашивание цитоплазмы не позволило нам оценить количество и распределение фокальных контактов на вентральной стороне клеток (рис. 5в, 5г).

Оценка параметров клеточной подвижности

Система актиновых филаментов отвечает за поддержание формы клеток и клеточную подвижность. В связи с этим с помощью прижизненных наблюдений мы проанализировали движение фибробластов и клеток фибросаркомы в нормальных условиях культивирования и в присутствии ДТТ (рис. 6 и 7), а также оценили возможность корреляции между изменением формы и подвижностью клеток. Для этого каждые 90 мин в течение

22.5 ч производилась съемка полей зрения и на полученных изображениях отмечалось положение каждой клетки. Затем с помощью плагина MTrackJ программы Fiji были получены траектории движения отдельных клеток и произведен анализ параметров клеточной подвижности. Изменение координат клеток в двумерном пространстве оценивалось с помощью перевода изображений трекинга в цифровой формат с последующей статистической обработкой полученных графов клеточной подвижности, которая заключалась в оценке изменений длины сегментов графа за выбранную единицу времени, выраженных в пикселях и минутах соответственно (Sharma et al., 2020).

Съемка проводилась в течение 24 ч, при этом обработка результатов осуществлялась в рамках

от 0 до 22.5. Подобный промежуток был выбран для облегчения визуализации получаемых данных и исключения из анализа средовых артефактов, возникающих за 40 мин до завершения 24-часового периода непрерывной съемки. Далее приведены результаты выбранного временного диапазона (0–22.5 ч).

В нормальных условиях культивирования дермальные фибробласты сохраняли распластанную морфологию в течение всего периода наблюдений (22.5 ч) (рис. 6а–6в). Отмечался ненаправленный характер движения клеток (рис. 6г). Среднее пройденное клетками расстояние за 22.5 ч составляло 296.75 пикселей. При наблюдении за движением фибробластов в течение 22.5 ч после добавления ДТТ (рис. 6д–6ж) было обнаружено, что через 9–10 ч культивирования с ДТТ 22 из 25 проанализированных клеток изменяли морфологию, становились более поджатыми и выпуклыми (рис. 6е). Кроме того, у большинства клеток через 9–10 ч изменялся характер движения, в частности, наблюдалось уменьшение среднего расстояния, пройденного отдельной клеткой за 22.5 ч (рис. 6з), на 36.15 пикселей. Среднее проходное расстояние за 90 мин (средняя скорость) после 9 ч культивирования с ДТТ снижалась на 7.16 пикселей по сравнению с контролем.

Таким образом, ДТТ вызывал снижение подвижности дермальных фибробластов, по хронологии совпадавшее с уменьшением площади распластанности этих клеток. По-видимому, события, развивающиеся в клетке под воздействием ДТТ, связаны с изменением как морфологических, так и миграторных параметров.

Анализ движения клеток фибросаркомы показал, что в нормальных условиях культивирования эти клетки сохраняли распластанную морфологию в течение всего периода наблюдений (22.5 ч) (рис. 7а–7в). Отмечался ненаправленный характер движения клеток (рис. 7г). Среднее пройденное клетками расстояние за 22.5 ч составляло 247.82 пикселя. При наблюдении за движением клеток фибросаркомы в течение 22.5 ч после добавления ДТТ (рис. 7д–7ж) было обнаружено, что после 6–7 часов культивирования с ДТТ 18 из 25 проанализированных клеток тоже изменяли морфологию, становясь более поджатыми и выпуклыми, или шарообразными (рис. 7е). Кроме того, после 6–7 ч культивирования с ДТТ у 20 из 25 проанализированных клеток изменялся и характер движения. В частности, клетки проявляли осцилляторный (колебательный) характер движения, который выражался в хаотической смене направления движения (cell stalling). Кроме этого, отмечалось уменьшение среднего расстояния, пройденного отдельной клеткой, на 99.12 пиксе-

лей (рис. 7з). Средняя скорость после 6 ч культивирования с ДТТ снижалась на 6.23 пикселя по сравнению с контролем.

Таким образом, ДТТ вызывал снижение подвижности клеток фибросаркомы, по хронологии совпадавшее с уменьшением площади распластанности этих клеток. Наблюдалось падение величины среднего пройденного расстояния при небольшом изменении средней скорости клеток. Подобный эффект объясняется значимым ускорением клеток фибросаркомы в начале миграции и резким затормаживанием ближе к концу проведения наблюдений.

Полученные качественные характеристики изменения параметров клеточной подвижности были валидированы с помощью адаптации $\Delta\Delta C$ метода. В рамках экспериментального подхода для каждой клетки был получен набор значений, отражающих скорость ее движения в установленные промежутки времени. Всего анализу подверглись 50 клеток при описании подвижности фибробластов (25 контроль и 25 ДТТ+) и 50 клеток для НТ1080 (25 контроль и 25 ДТТ+). Каждая клетка в контрольных и экспериментальных группах считалась техническим повтором. Ниже мы приводим схему обработки значений для количественного обоснования особенностей клеточной подвижности при действии ДТТ для обеих клеточных линий.

1) Подсчет среднего значения скорости для каждого технического повтора в контрольной и опытной группе.

$$V_{avj} = \text{sum}(X_{ij})/n,$$

где j – порядковый номер технического повтора (клетки), X_{ij} – значение скорости j -ой клетки в каждом i -ом временном промежутке, а n – количество разбиений временного континуума.

2) Подсчет ΔV как модуля разницы между V_{avj} контроля и V_{avj} экспериментальной группы.

$$\Delta V = |V_{avj}C - V_{avj}E|,$$

где $V_{avj}C$ – средняя разница для j -того технического повтора в контроле, а $V_{avj}E$ – средняя разница j -того технического повтора в экспериментальной группе.

3) Подсчет значений $\Delta\Delta V$ для обеих анализируемых групп

$$\Delta\Delta V = X_{ij} - \Delta V,$$

где X_{ij} – значение скорости j -ой клетки в каждом i -ом временном промежутке в контроле или экспериментальной группе.

4) Для наглядности и масштабирования результатов полученные значения для каждого тех-

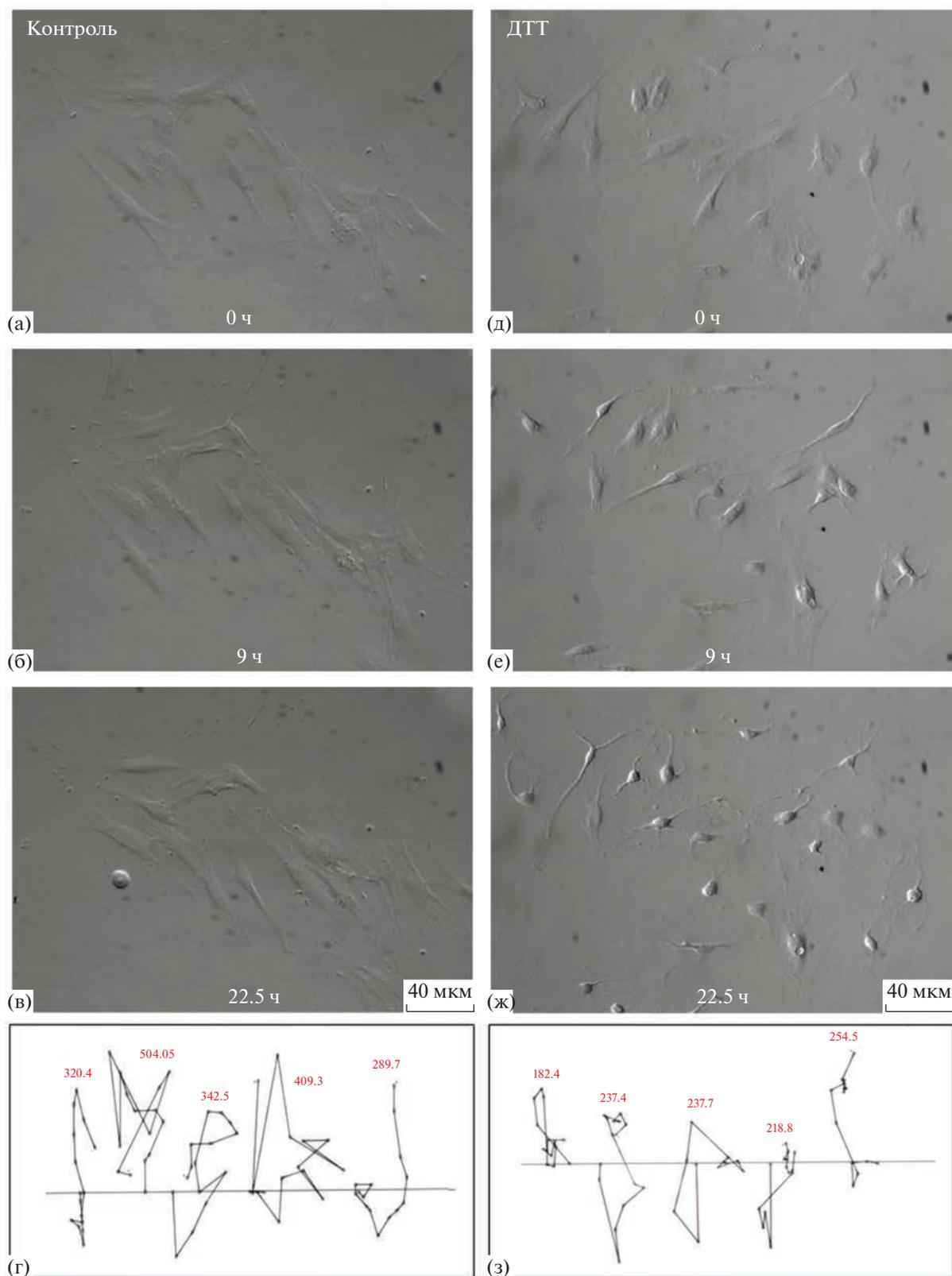


Рис. 6. Прижизненные наблюдения за поведением дермальных фибробластов в течение 22.5 ч. (а–г) Контроль; (д–з) 22.5 ч воздействия ДТТ. (а–в, д–ж) Фазовый контраст, масштабный отрезок 40 мкм. (г, з) Репрезентативные траектории движения отдельных клеток, полученные с помощью плагина MTrackJ программы Fiji. Положение клеток отмечалось каждые 90 мин (расстояние между двумя соседними точками). Красным цветом отмечен пройденный клетками путь.

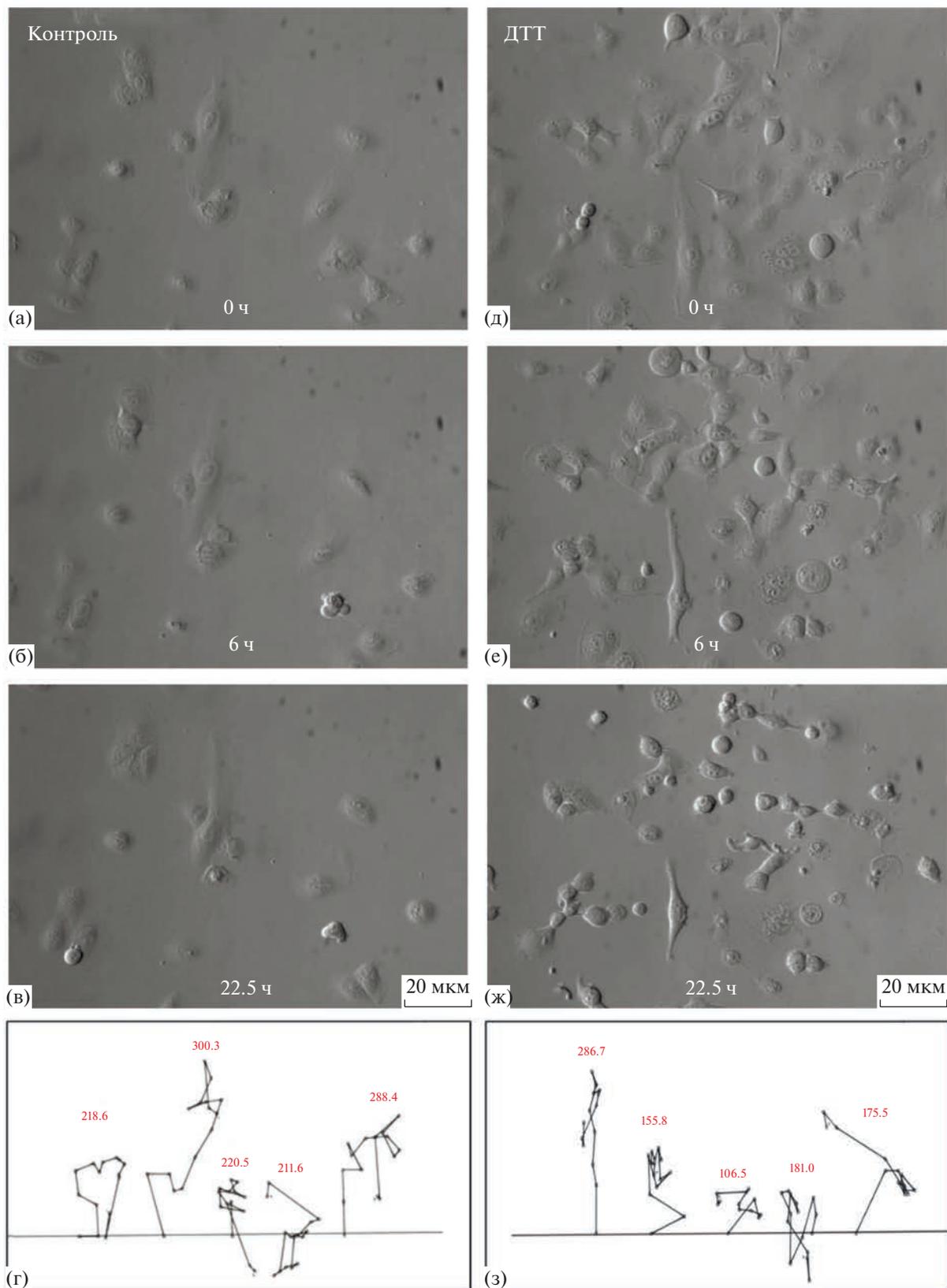


Рис. 7. Прижизненные наблюдения за поведением клеток фибросаркомы в течение 22.5 ч. (а–г) Контроль; (д–з) 22.5 ч воздействия ДТТ. (а–в, д–ж) Фазовый контраст, масштабный отрезок 20 мкм. (г, з) Репрезентативные траектории движения отдельных клеток, полученные с помощью плагина MTrackJ программы Fiji. Положение клеток отмечалось каждые 90 мин (расстояние между двумя соседними точками). Красным цветом отмечен проходимый клетками путь. Длина пути выражена в пикселях.

(а)

exp(ΔΔVal_C)			exp(ΔΔVal_C1)					exp(ΔΔVal_C2)					exp(ΔΔVal_C3)					Время, ч
C1	C2	C3	ДТТ1	ДТТ2	ДТТ3	ДТТ4	ДТТ5	ДТТ1	ДТТ2	ДТТ3	ДТТ4	ДТТ5	ДТТ1	ДТТ2	ДТТ3	ДТТ4	ДТТ5	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
3,00324	1,95285	0,19046	1,69857E-07	0,00169	2,4E-09	5594,2366	497868,9484	2,6E-07	0,00261	3,65815E-09	8603,22	765659	2,7E-06	0,02671	3,8E-08	88211,5	780534	3
0,03461	0,6918	116,32	1042,879675	6,66281	0,02481	24,787539	1,41803E-05	52,1717	0,33332	0,001240974	1,24004	7,1E-07	0,31029	0,00198	7,4E-06	0,00738	4,2E-09	4,5
3,26795	5,36106	0,07487	6,4783E-07	6,3E-10	8,6E-11	5,6010967	0,000212783	3,9E-07	1,8E-10	5,21635E-11	3,41427	0,00013	2,8E-05	2,8E-08	3,7E-09	244,487	0,00929	6
5,66911	0,00845	55,0164	5,21343E-13	5,7E-14	2,2E-10	1,365E-11	2,25877E-14	3,5E-10	3,8E-11	1,48013E-07	1E-08	1,5E-11	5,4E-14	5,9E-15	2,3E-11	1,6E-12	2,3E-15	7,5
0,04246	104,31	0,56788	3,52986E-07	49117,2	1,3E-05	0,0164795	7,51029E-06	1,4E-10	19,9926	5,23009E-09	6,7E-06	3,1E-09	2,6E-08	3672,26	9,6E-07	0,00123	5,6E-07	9
0,00672	0,17043	15456	0,000964934	4,6E-08	7,2E-08	4,688E-07	3,77285E-08	3,8E-05	1,8E-09	2,85199E-09	1,8E-08	1,5E-09	4,2E-10	2E-14	3,1E-14	2E-13	1,6E-14	10,5
0,00447	7089,36	0,50649	3,75495E-05	7,4E-06	8E-08	13034,437	3,85215E-08	2,4E-11	4,7E-12	5,01956E-14	0,00822	2,4E-14	3,3E-07	6,5E-08	7E-10	115,025	3,4E-10	12
0,00364	6019,74	0,49947	1,87139E-08	1,8E-13	3,6E-10	2,099E-07	3,87445E-13	1,1E-14	1,1E-19	2,16011E-16	1,3E-13	2,3E-19	1,4E-10	1,3E-15	2,6E-12	1,5E-09	2,8E-15	13,5
0,87493	33429,4	0,00111	1,89542E-10	2,2E-15	1,4E-08	8,877E-14	8,50596E-15	5E-15	5,7E-20	3,6862E-13	2,3E-18	2,2E-19	1,5E-07	1,7E-12	1,1E-05	6,9E-11	6,7E-12	15
0,0002	165227	6,48748	4,40438E-05	6,2E-11	8,8E-08	1,145E-12	9,14777E-11	5,3E-14	7,5E-20	1,06357E-16	1,4E-21	1,1E-19	1,4E-09	1,9E-15	2,7E-12	3,5E-17	2,8E-15	16,5
2,6E-05	3,8E+07	41,6773	0,052076416	7,5E-10	0,0001	4,035E-07	1,36044E-10	3,5E-34	5,1E-22	6,78493E-17	2,7E-19	9,2E-23	3,2E-08	4,7E-16	6,2E-11	2,5E-13	8,4E-17	18
0,00631	359,017	2,35978	8,77288E-07	2E-12	1,1E-07	3,623E-10	4,72943E-11	1,5E-11	3,5E-17	1,92051E-12	6,4E-15	8,3E-16	2,3E-09	5,3E-15	2,9E-10	9,7E-13	1,3E-13	19,5
2E-05	3,2E+09	0,05854	2,41455E-12	1,1E-18	1,3E-16	3,205E-18	4,37464E-18	1,5E-26	6,8E-33	8,14196E-31	2E-32	2,7E-32	8,2E-16	3,7E-22	4,4E-20	1,1E-21	1,5E-21	21
0,43016	139,659	0,03414	8,53552E-11	5E-16	4E-16	1,135E-15	1,89557E-19	2,6E-23	1,5E-18	1,24325E-18	3,5E-18	5,8E-22	1,1E-09	6,3E-15	5,1E-15	1,4E-14	2,4E-18	22,5

(б)

exp(ΔΔVal_C)			exp(ΔΔVal_C1)					exp(ΔΔVal_C2)					exp(ΔΔVal_C3)					Время, ч
C1	C2	C3	ДТТ1	ДТТ2	ДТТ3	ДТТ4	ДТТ5	ДТТ1	ДТТ2	ДТТ3	ДТТ4	ДТТ5	ДТТ1	ДТТ2	ДТТ3	ДТТ4	ДТТ5	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
39,4259	22,4126	0,00341	7,19798E-15	1,5E-08	1,8E-15	5,939E-18	5,75187E-20	1,3E-14	2,7E-08	3,13052E-15	1E-17	1E-19	8,3E-11	0,00018	2,1E-11	6,9E-14	6,7E-16	3
0,01123	0,1244	6039,85	1,47548E-10	6,1E-11	1,4E-11	2,491E-09	1,43069E-12	1,3E-11	5,5E-12	1,2194E-12	2,2E-10	1,3E-13	2,7E-16	1,1E-16	2,5E-17	4,6E-15	2,7E-18	4,5
0,08364	1,74532	9,81528	8,16937E-10	8,7E-10	8,9E-06	2,644E-09	2,7727E-08	3,9E-11	4,2E-11	4,2522E-07	1,3E-10	1,3E-09	7E-12	7,4E-12	7,6E-08	2,3E-11	2,4E-10	6
103,845	0,01445	3,80799	8,80908E-08	1,1E-05	1,5E-08	4,688E-10	6,6098E-9	0,00063	0,08191	0,000108377	3,4E-06	4,8E-06	2,4E-06	0,00031	4,1E-07	1,3E-08	1,8E-08	7,5
1,46899	0,10331	9,32943	1,40252E-07	5,4E-09	2,4E-09	1,796E-09	7,52045E-10	2E-06	7,7E-08	3,4064E-08	2,6E-08	1,1E-08	2,2E-08	8,5E-10	3,8E-10	2,8E-10	1,2E-10	9
540,528	0,16536	0,04817	6,07725E-13	2,9E-08	1,1E-13	1,021E-11	3,4748E-14	2E-09	9,4E-05	3,46045E-10	3,3E-08	1,1E-10	6,8E-09	0,00032	1,2E-09	1,1E-07	3,9E-10	10,5
0,35969	0,06759	102,442	4,71028E-10	0,00213	3,8E-09	4,796E-11	1,80428E-09	2,5E-09	0,01131	2,01572E-08	2,6E-10	9,6E-09	1,7E-12	7,5E-06	1,3E-11	1,7E-13	6,3E-12	12
0,58422	0,04576	110,181	8,41949E-12	2,5E-07	1,4E-09	6,425E-08	2,86962E-10	1,1E-10	3,2E-06	1,81196E-08	8,2E-07	3,7E-09	4,5E-14	1,3E-09	7,5E-12	3,4E-10	1,5E-12	13,5
0,00525	0,10614	789834	3,93014E-07	7,4E-05	2,4E-05	9,435E-08	4,27117E-06	1,9E-08	3,7E-06	1,19684E-06	4,7E-09	2,1E-07	2,6E-15	4,9E-13	1,6E-13	6,3E-16	2,8E-14	15
0,00123	0,50193	169010	3,1373E-10	3,1E-10	4,5E-08	1,213E-08	2,75503E-10	7,7E-13	7,5E-13	1,09654E-10	3E-11	5,5E-13	2,3E-18	2,2E-18	3,3E-16	8,8E-17	1,6E-18	16,5
0,03883	0,09747	1276,67	5,13996E-11	1,8E-12	1,3E-08	1,16E-12	8,83937E-13	2E-11	7,1E-13	5,26813E-09	4,6E-13	3,5E-13	1,6E-15	5,4E-17	4E-13	3,5E-17	2,7E-17	18
0,59699	0,02363	387,821	1,15997E-10	8,9E-08	0,00063	1,369E-10	3,85124E-10	2,9E-09	2,2E-06	0,015874264	3,5E-09	9,7E-09	1,8E-13	1,4E-10	9,7E-07	2,1E-13	5,9E-13	19,5
1,5E+11	7,3E-05	0,00857	7,90655E-31	1,6E-28	7,2E-28	3,229E-30	2,94975E-29	1,6E-15	3,2E-13	1,42615E-12	6,4E-15	5,9E-14	1,3E-17	2,7E-15	1,2E-14	5,5E-17	5E-16	21
0,01941	0,1362	6262,66	1,18251E-08	7,9E-08	0,00021	4,518E-10	1,78257E-07	1,2E-09	1,1E-08	3,02735E-05	6,4E-11	2,5E-08	3,7E-14	2,4E-13	6,6E-10	1,4E-15	5,5E-13	22,5

Рис. 8. Количественный анализ особенностей клеточной подвижности при обработке ДТТ. (а) Дермальные фибробласты, (б) клетки фибросаркомы. Красным цветом обозначены ячейки, в которых характер движения клетки в заданный промежуток времени отличался от контрольного значения (посчитано независимо для C1, C2 и C3). Зеленый цвет, напротив, указывает на отсутствие значительного отличия от контрольного измерения на заданном промежутке времени при выбранном дискриминирующем пороге (60-ая перцентиль). Все 5 выборок измерений, полученных при анализе действия ДТТ, сравнивались с каждой контрольной выборкой как для фибробластов, так и для клеток линии NT1080. Синим цветом в таблице обозначены столбцы, относящиеся к контрольным группам, оранжевым цветом обозначены экспериментальные группы, а бесцветный столбец отражает разбиение по времени проведения прижизненной съемки.

нического контроля были использованы для возведения экспоненты в соответствующую степень.

$$D = \exp(\Delta\Delta V_j),$$

где $\Delta\Delta V_j$ – разница между средней разницей j -го технического повтора в контроле или экспериментальной группе и $V_{av,j}$.

Полученные результаты были визуализированы в формате HeatMap, где каждая ячейка содержит значение D , величину, которая позволяет оценить скорость движения клетки по субстрату. При разбиении полученной выборки из контрольных и экспериментальных точек на перцентили по величинам D оказалось, что контрольная и экспериментальная группы образуют два множества значений с хорошо дискриминирующим порогом на уровне 60-ой перцентили (рис. 8). На рис. 8 красным цветом обозначены ячейки, в которых характер движения клетки в заданный промежуток времени отличался от контрольного значения

(посчитано независимо для C1, C2 и C3), то есть красным выделены значения выше порога. Зеленый цвет, напротив, указывает на отсутствие значительного отличия от контрольного измерения на заданном промежутке времени при выбранном дискриминирующем пороге.

Таким образом, в рамках реализованного эксперимента 22.5-часовой промежуток времени был разбит на 14 промежутков, каждый из которых обладает введенным нами индивидуальным параметром скорости. Дальнейшая статистическая обработка наборов индивидуальных скоростей каждого временного промежутка для каждой анализируемой клетки позволила нам не только подтвердить факт снижения эффективности продвижения клетки по субстрату, но и достаточно точно определить момент возникновения наблюдаемого эффекта. Для фибробластов статистически значимые изменения эффективности подвижности клеток наблюдаются с 9 ч культивирования с ДТТ,

тогда как у клеток линии НТ1080 падение активности было обнаружено уже через 6 ч в условиях экспериментального воздействия.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что индуктор стресса ЭПР ДТТ вызывает изменение формы и поверхности дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы НТ1080, а также влияет на организацию актинового цитоскелета, фокальных контактов и подвижность в этих клетках.

ДТТ вызывает стресс ЭПР, блокируя образование дисульфидных связей между остатками цистеина в белках, из-за чего нарушается их сворачивание и происходит накопление не свернутых белков в ЭПР (Osowski, Urano, 2011; Ren et al., 2018). В клетках человека дисульфидные связи присутствуют преимущественно в секретируемых белках, которые синтезируются в ЭПР, и практически отсутствуют в цитозольных белках (Weiss et al., 2022; Chang, Fu, 2023). Таким образом, ДТТ нарушает сворачивание преимущественно секреторных белков, синтезируемых в ЭПР.

Мы показали, что культивирование дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы линии НТ1080 в присутствии ДТТ в течение 24 ч вызывает сжатие этих клеток, изменение их формы и поверхности и уменьшение площади распластывания. Изменение формы клеток при действии индукторов стресса ЭПР не считается характерным морфологическим признаком стресса ЭПР и UPR, однако есть данные о поджатию нормальных и опухолевых клеток при действии некоторых индукторов стресса ЭПР, имеющих разный механизм активации стресса ЭПР (Kohn et al., 1979; Brüning et al., 2009; Belloni et al., 2010; Földi et al., 2013). Интересно, что при действии тапсигаргина на клетки нейробластомы изменение формы клеток сопровождалось снижением уровня синтеза белков, участвующих в поддержании и динамике актинового цитоскелета, таких как винкулин и эзрин (отвечает за сборку актиновых пучков) (Földi et al., 2013). Однако механизмы таких изменений формы до сих пор неизвестны.

Изменение рельефа поверхности клеток и их сжатие свидетельствуют о перестройках актинового цитоскелета, так как изменение состояния системы актиновых филаментов, в частности, кортикального актина и стресс-фибрилл, влияет на форму, рельеф поверхности и площадь распластывания клетки (Cleuren, Boonstra, 2012). Действительно, мы показали, что в дермальных фибробластах при действии ДТТ наблюдалась реорганизация актинового цитоскелета, в частности, пучки актина, характерные для контрольных клеток, становились менее выраженными или

отсутствовали. Кроме того, наблюдалось уменьшение числа фокальных контактов. По-видимому, изменение формы и поверхности фибробластов, а также уменьшение числа фокальных контактов, обусловлены реорганизацией актинового цитоскелета, вызванной действием ДТТ, так как деполимеризация и реорганизация актина может вызывать разборку фокальных контактов (Cleuren, Boonstra, 2012). В то же время известно, что стресс-фибриллы могут формироваться за счет полимеризации актина на фокальных контактах (Tojkander et al., 2012), поэтому отсутствие пучков актина, часть из которых, по-видимому, представляет собой стресс-фибриллы, при действии ДТТ может быть также вызвано уменьшением числа фокальных контактов.

В клетках линии НТ1080 реорганизацию актинового цитоскелета мы не обнаружили с помощью окрашивания TRITC-фаллоидином, однако сжатие этих клеток, изменение их формы и поверхности и уменьшение площади распластывания под действием ДТТ тоже происходило. По-видимому, в клетках НТ1080 при действии ДТТ происходит реорганизация кортикального актина, приводящая к изменению поверхности и площади распластывания клеток, которую мы не наблюдаем из-за ограничений разрешающей способности метода. Возможно, ДТТ влиял и на состояние фокальных контактов в клетках фибросаркомы, однако диффузное окрашивание цитоплазмы при выявлении винкулина, отмечаемое в литературе (Schwartz et al., 2013), не позволило сделать выводы об изменении количества фокальных контактов и их перераспределении.

Следует отметить, что актин и винкулин относятся к цитозольным белкам и, по-видимому, не имеют дисульфидных связей в своей структуре. Поэтому реорганизация актинового цитоскелета и уменьшение количества фокальных контактов после действия ДТТ, скорее всего, не связаны с влиянием ДТТ на структуру актина и винкулина. Однако нельзя исключать вероятность того, что ДТТ может оказывать влияние, не связанное с восстановлением дисульфидных связей белков. В этом случае возможно, что ДТТ нарушает функционирование белков, контролирующих состояние актиновой сети, т.е. актин-связывающих белков. Так, например, в мышечных фибробластах линии NIH-3T3 ингибитор Atp2/3 (Actin Related Protein 2/3 complex) СК666 вызывал переход сети актина в фибриллы в кортикальной зоне, а ингибитор формина SMIFH2 вызывал исчезновение стресс-фибрилл (Eghiaian et al., 2015). При действии ДТТ на фибробласты в нашем исследовании пучки актина, часть из которых, по-видимому, представляет собой стресс-фибриллы, отсутствовали или становились менее выраженными. Возможно, ДТТ

прямо или косвенно подавлял работу формина, который участвует в формировании стресс-фибрилл.

Система актиновых филаментов отвечает не только за поддержание формы клеток, но и за клеточную подвижность (Cleuren, Boonstra, 2012; Tojkander et al., 2012). Фибробласты перемещаются по 2D-субстрату с помощью полимеризации актина и формирования фокальных контактов (Sixt, 2012). Полимеризация актина в сторону плазматической мембраны обеспечивает силу, необходимую для формирования выступа (протрузии) плазматической мембраны (Cleuren, Boonstra, 2012). Поэтому высокая скорость роста актиновых филаментов очень важна для успешного перемещения клеток. Кроме того, актиновые филаменты формируют пучки – стресс-фибриллы, чаще всего способные сокращаться за счет связи с миозином II (Tojkander et al., 2012). Сократимые стресс-фибриллы обычно связаны с фокальными контактами. В связи с этим нарушение организации актинового цитоскелета и изменение количества фокальных контактов в дермальных фибробластах могут свидетельствовать о нарушении подвижности клеток. Действительно, мы показали, что ДТТ вызывал снижение подвижности дермальных фибробластов, по хронологии совпадавшее с уменьшением площади распластности этих клеток, вызванной реорганизацией актинового цитоскелета. Снижение подвижности при активации UPR было обнаружено также при действии индуктора стресса ЭПР туникамицина. Так было показано, что туникамицин подавлял миграцию дермальных фибробластов и кератиноцитов человека (Bachar-Wikstrom et al., 2020) и миграцию гладкомышечных клеток сосудов, вызванную тромбоцитарным фактором роста (Yi et al., 2012). Однако исследования состояния актинового цитоскелета или механизмов, опосредующих такую клеточную реакцию, не проводилось.

Опухолевая трансформация включает в себя реорганизацию цитоскелета (кортикально организованный актин) и фокальных контактов, снижение адгезивности к субстрату (Schwartz et al., 2013). Клетки фибросаркомы HT1080 способны и к мезенхимному (как фибробласты, с участием фокальных контактов), и к амeboидному типу движения (с помощью блябинга, без участия фокальных контактов) (Yamazaki et al., 2005). Для обоих типов движения необходимо участие актинового цитоскелета (Sixt, 2012; Limia et al., 2019). В связи с этим, обнаруженное нами снижение клеточной подвижности клеток HT1080 может быть связано с нарушением структурной целостности актиновой сети, что повлияло на эффективность продвижения клеток по субстрату. Влияние стресса ЭПР (UPR) на подвижность опухолевых

клеток до сих пор однозначно не определено (Urra et al., 2016). Есть данные как о стимулирующем влиянии участников сигнальных каскадов UPR на миграцию опухолевых клеток и активации эпителиально-мезенхимного перехода, так и данные об ингибирующем влиянии. Противоречивость данных может быть связана с различными клеточными линиями и индукторами UPR. Так, например, туникамицин усиливал миграцию опухолевых клеток кишечника человека линии LS174T (Gundamaraju et al., 2021), но при этом подавлял миграцию стволовых клеток рака молочной железы линии MCF 7 фенотипа CD44+/CD24– (Nami et al., 2016). Кроме того, активация стресса ЭПР с помощью β -азарона в опухолевых клетках мочевого пузыря человека линий 253J и 5637 приводила к подавлению их миграции (Liu et al., 2023). Мы обнаружили снижение подвижности клеток фибросаркомы, по хронологии совпадавшее с уменьшением площади распластности этих клеток, при этом наблюдалось значимое ускорение клеток фибросаркомы в начале миграции и резкое затормаживание ближе к концу проведения наблюдений. Возможно, индукция UPR с помощью ДТТ стимулировала подвижность клеток, однако другие воздействия ДТТ, не связанные непосредственно с активацией стресса ЭПР, приводили к снижению подвижности клеток фибросаркомы.

Существует несколько методов и подходов, используемых при измерении параметров движения клеток. Например, дифференциальное интерференционное контрастирование (DIC), фазовый контраст, time-lapse видеомикроскопия и трекинг (Sharma et al., 2020). Для проведения более точных измерений и количественной оценки эффекта используется метод трекинга, который подразумевает анализ кадров видеоряда за счет отслеживания пути движения клеток в рамках выделенного промежутка времени с использованием специального программного обеспечения. Для проведения количественной оценки широко используется подход, который заключается в оценке изменения отношения пути каждой отдельной клеточной единицы к ее перемещению. Метод позволяет отметить явные изменения в продвижении клеток по субстрату в рамках экспериментальной модели и дает статистически значимые и воспроизводимые результаты. Однако особенность метода, которая заключена в генерализации данных измерения и кумулятивной оценке эффективности продвижения по субстрату, не позволяет выявить точный момент возникновения эффекта, вызванного экспериментальным агентом (в нашем случае – ДТТ), и не подразумевает использование способов технологических методов повышения чувствительности проводимых изме-

рений. Разработанный нами метод позволяет значительно повысить чувствительность анализа и проводить оценку изменений клеточной подвижности не только в рамках полного экспериментального промежутка времени, но и на любом, сколь угодно малом, отрезке времени, задаваемом исследователем. При этом точность оценки может быть повышена за счет увеличения степени сегментации получаемых треков по времени, в зависимости от разрабатываемого дизайна и потребностей исследователя. Дополнительным преимуществом разработанного метода перед существующими способами оценки является устойчивость к выбросам в рамках анализируемой выборки клеток. Ранние или слишком поздние показатели снижения или увеличения эффективности клеточной подвижности достаточно просто отсеиваются на основании расчета коэффициента стандартного отклонения и стандартной ошибки среднего для анализируемой когорты, тогда как более конвенциональные методы требуют дополнительного раунда фильтрации данных.

Таким образом, разработанный метод позволяет провести количественную оценку и валидацию наблюдаемых качественных изменений характера подвижности клеток при действии разных агентов (в нашем случае – ДТТ), которое выражается в виде такого эффекта как cell-stalling (“застывание клетки”). Тем не менее, учитывая универсальность метода, мы предполагаем более широкое использование предлагаемой техники для количественной оценки изменения характера клеточной подвижности на 2D-субстратах. Так, адаптация адаптации $\Delta\Delta\text{St}$ метода может быть использована при исследовании влияния потенциально лекарственных агентов на подвижность нормальных и опухолевых клеток. Методология позволит выявить не только факт зависимости подвижности от экспериментального воздействия, но и провести сравнительный анализ степени эффективности используемых потенциально лекарственных агентов в зависимости от момента возникновения терапевтического эффекта.

Таким образом, мы показали, что индуктор стресса ЭПР ДТТ оказывает сходное влияние на морфологические признаки, отражающие локомоторные свойства клеток, а также непосредственно на миграторные свойства культивируемых дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы NT1080, вызывая реорганизацию актинового цитоскелета и фокальных контактов в этих клетках, сопровождающуюся изменением поверхности клеток, уменьшением площади их расплывания и снижением подвижности клеток. Поэтому при разработке противоопухолевых препаратов, вызывающих гибель клеток через активацию стресса ЭПР, следует учитывать влияние этих препаратов

на нормальные клетки, в том числе на мишени, не связанные непосредственно с активацией UPR.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН и ЦКП “Электронная микроскопия в науках о жизни” МГУ им. М.В. Ломоносова (УНУ “Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия”).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 19-015-00233 и 20-315-90118) в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300098-5.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящей работе не проводили какие-либо исследования с использованием животных или людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Е.П. Турищева, Е.А. Смирнова – концепция и руководство работой; Г.А. Ашников, М.С. Вильданова – проведение экспериментов; Е.П. Турищева, Г.А. Ашников, Е.А. Смирнова – обсуждение результатов исследования; Е.П. Турищева, Г.А. Ашников – написание текста; Е.А. Смирнова – редактирование текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Турищева Е.П., Вильданова М.С., Онищенко Г.Е. и др.* Роль стресса эндоплазматического ретикулума в дифференцировке клеток мезенхимного происхождения // Биохимия. 2022. Т. 87. № 9. С. 1203–1222.
- Al-Beltagi S., Preda C.A., Goulding L.V. et al.* Thapsigargin is a broad-spectrum inhibitor of major human respiratory viruses: coronavirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus // Viruses. 2021. V. 13. № 2. P. 234–252.
- Almanza A., Carlesso A., Chintia C. et al.* Endoplasmic reticulum stress signalling—from basic mechanisms to clinical applications // FEBS. 2019. V. 286. № 2. P. 241–278.
- Bachar-Wikstrom E., Manchanda M., Bansal R. et al.* Endoplasmic reticulum stress in human chronic wound healing: rescue by 4-phenylbutyrate // Int. Wound J. 2021. V. 18. № 1. P. 49–61.

- Belloni D., Veschini L., Foglieni C. et al.* Bortezomib induces autophagic death in proliferating human endothelial cells // *Exp. cell res.* 2010. V. 316. № 6. P. 1010–1018.
- Brüning A., Burger P., Vogel M. et al.* Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress, cell cycle arrest, and apoptosis // *Invest. new drugs.* 2009. V. 27. P. 543–551.
- Chang Z., Fu X.* Biogenesis of Secretory Proteins in Eukaryotic and Prokaryotic Cells // *Encyclopedia of cell biology* (second edititon). 2023. V. 1. P. 689–702.
- Cleuren Y.T., Boonstra J.* Actin: structure, function and disease // *Actin: Structure, Functions and Disease*, Conuelas VA, Minas DJ (eds.). 2012. P. 61–96.
- Corazzari M., Gagliardi M., Fimia G.M. et al.* Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, and cancer cell fate // *Front. oncol.* 2017. V. 7. P. 78–88.
- Curran M.P., McKeage K.* Bortezomib: a review of its use in patients with multiple myeloma // *Drugs.* 2009. V. 69. P. 859–888.
- Eghiaian F., Rigato A., Scheuring S.* Structural, mechanical, and dynamical variability of the actin cortex in living cells // *Biophys. J.* 2015. V. 108. № 6. P. 1330–1340.
- Földi I., Tóth A.M., Szabó Z. et al.* Proteome-wide study of endoplasmic reticulum stress induced by thapsigargin in N2a neuroblastoma cells // *Neurochem. Int.* 2013. V. 62. № 1. P. 58–69.
- Gundamaraju R., Vemuri R., Ambati R.R. et al.* Tunicamycin via ER stress mediated 6th hour time point aggravates cell migration, cell invasion and cell proliferation in colonic epithelial cells // *Advances in Cancer Biology-Metastasis.* 2021. V. 2. P. 100007.
- Hetz C., Saxena S.* ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration // *Nat. Rev. Neurol.* 2017. V. 13. № 8. P. 477–491.
- Jung Y.H., Lim E.J., Heo J. et al.* Tunicamycin sensitizes human prostate cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL receptors and downregulation of cIAP2 // *Int. J. Oncol.* 2012. V. 40. №. 6. P. 1941–1948.
- Kohno K., Hiragun A., Mitsui H. et al.* Effect of tunicamycin on cell growth and morphology of nontransformed and transformed cell lines // *Agric. Biol. Chem.* 1979. V. 43. №. 7. P. 1553–1561.
- Limia C.M., Sauzay C., Urra H. et al.* Emerging roles of the endoplasmic reticulum associated unfolded protein response in cancer cell migration and invasion // *Cancers.* 2019. V. 11. № 5. P. 631–655.
- Liu B., Dan W., Wei Y. et al.* β -asarone inhibits the migration, invasion, and EMT of bladder cancer through activating ER stress // *Cancer Medicine.* 2023. V. 12. P. 13610–13622.
- Nami B., Donmez H., Kocak N.* Tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress reduces in vitro subpopulation and invasion of CD44+/CD24-phenotype breast cancer stem cells // *Exp. Toxicol. Pathol.* 2016. V. 68. № 7. P. 419–426.
- Osowski C.M., Urano F.* Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system // *Methods Enzymol.* 2011. V. 490. P. 71–92.
- Ren B., Wang Y., Wang H. et al.* Comparative proteomics reveals the neurotoxicity mechanism of ER stressors tunicamycin and dithiothreitol // *Neurotoxicology.* 2018. V. 68. P. 25–37.
- Schwartz M.P., Rogers R.E., Singh S.P. et al.* A quantitative comparison of human HT-1080 fibrosarcoma cells and primary human dermal fibroblasts identifies a 3D migration mechanism with properties unique to the transformed phenotype // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 12. P. e81689.
- Sharma P., Lam V.K., Raub C.B. et al.* Tracking Single Cells Motility on Different Substrates // *Methods and protocols.* 2020. V. 3. № 3. P. 56–69.
- Sicari D., Delaunay-Moisan A., Combettes L. et al.* A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems // *FEBS.* 2020. V. 287. № 1. P. 27–42.
- Sixt M.* Cell migration: fibroblasts find a new way to get ahead // *J. Cell Biol.* 2012. V. 197. № 3. P. 347–349.
- Tojkander S., Gateva G., Lappalainen P.* Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles // *J. Cell Sci.* 2012. V. 125. № 8. P. 1855–1864.
- Urra H., Dufey E., Avril T. et al.* Endoplasmic reticulum stress and the hallmarks of cancer // *Trends Cancer.* 2016. V. 2. № 5. P. 252–262.
- Weiss K., Racho J., Riemer J.* Compartmentalized disulfide bond formation pathways // *Redox Chemistry and Biology of Thiols.* Academic Press, 2022. P. 321–340.
- Wu J., Chen S., Liu H. et al.* Tunicamycin specifically aggravates ER stress and overcomes chemoresistance in multidrug-resistant gastric cancer cells by inhibiting N-glycosylation // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2018. V. 37. № 1. P. 1–12.
- Wu L., Huang X., Kuang Y. et al.* Thapsigargin induces apoptosis in adrenocortical carcinoma by activating endoplasmic reticulum stress and the JNK signaling pathway: an *in vitro* and *in vivo* study // *Drug Des. Dev. Ther.* 2019. V. 13. P. 2787–2798.
- Yamazaki D., Kurisu S., Takenawa T.* Regulation of cancer cell motility through actin reorganization // *Cancer science.* 2005. V. 96. № 7. P. 379–386.
- Yi N., Chen S.Y., Ma A. et al.* Tunicamycin inhibits PDGF-BB-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells through induction of HO-1 // *Anat. Rec.* 2012. V. 295. № 9. P. 1462–1472.
- Yoo J., Mashalidis E.H., Kuk A.C. et al.* GlcNAc-1-P-transferase—tunicamycin complex structure reveals basis for inhibition of N-glycosylation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018. V. 25. № 3. P. 217–224.

Endoplasmic Reticulum Stress Inducer Dithiothreitol Affects the Morphology and Motility of Cultured Human Dermal Fibroblasts and Fibrosarcoma HT1080 Cell Line

E. P. Turishcheva^{1, *}, G. A. Ashniev¹, M. S. Vildanova¹, and E. A. Smirnova¹

¹Lomonosov Moscow State University, Department of Cell Biology and Histology, Moscow, 119234 Russia

**e-mail: kitten-caterina@yandex.ru*

Some inducers of endoplasmic reticulum (ER) stress can affect the motility of normal and tumor cells. However, it is unknown what mechanisms mediate this effect and whether it is a consequence of ER stress. The aim of our work was to study the effect of the ER stress inducer dithiothreitol (DTT) on morphological features reflecting the locomotor properties of cells, as well as directly on the migratory properties of cultured human dermal fibroblasts and fibrosarcoma HT1080 cells. We have shown that DTT causes disruption of the organization of actin cytoskeleton in both types of cells, which is accompanied by a change in the cell surface and shape of cells, as well as a decrease in their spreading area. In addition, a decrease in the number of focal contacts was observed in dermal fibroblasts. DTT also reduced the motility of dermal fibroblasts and fibrosarcoma cells. To analyze cell motility and determine the moment of its change, we developed a method which showed that the change in the migratory properties of fibrosarcoma cells cultured with DTT began earlier than in dermal fibroblasts. Thus, activation of ER stress by DTT is accompanied by a change in the organization of the actin cytoskeleton and motility in normal and tumor human cells. Consequently, ER stress triggered by various inducers with different mechanisms of action affects the motility of normal and tumor cells, which must be taken into account when developing antitumor drugs that cause cell death through activation of ER stress.

Keywords: dithiothreitol, cell motility, fibroblasts, fibrosarcoma cells, ER stress

НЕСТАБИЛЬНОСТЬ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ МАТЕРИ ПРИВОДИТ К СНИЖЕНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ РАЗВИТИЯ У *Lymnaea stagnalis* (MOLLUSCA: GASTROPODA)

© 2023 г. А. И. Богомолов^{a, b}, Ю. А. Краус^{a, b}, Е. Е. Воронежская^{b, *}

^aМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

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

*E-mail: elena.voronezhskaya@idbras.ru

Поступила в редакцию 11.11.2022 г.

После доработки 11.12.2022 г.

Принята к публикации 12.12.2022 г.

Адаптивные материнские эффекты, повышающие приспособленность потомков, часто бывают обусловлены долговременными стрессовыми воздействиями среды обитания на материнский организм. Возникает вопрос — всегда ли эффекты такого стресса адаптивны для потомства и в каких случаях они могут приводить к нарушениям развития? Одним из стрессирующих факторов считается непредсказуемое изменение условий среды. Нашей задачей было проверить, может ли обитание матери в нестабильной среде приводить к снижению устойчивости эмбрионального развития у ее потомков. Материнская популяция брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis* была разделена на две группы с различными условиями содержания. Для первой группы условия поддерживались максимально стабильными, с постоянным протоком воды и избыточным кормлением. Вторая группа содержалась в нестабильных (стрессовых) условиях, с эпизодическим кормлением и сменой воды. Оказалось, что сами по себе нестабильные условия не влияют на частоту аномалий развития у потомков. Поскольку ранее нами было показано, что роль сигнального фактора, опосредующего материнский эффект у *L. stagnalis* выполняет серотонин, мы подвергли эмбрионов обеих групп дополнительному воздействию — инкубации в растворе биохимического предшественника серотонина (5-НТР). После инкубации в 5-НТР доля эмбрионов с аномалиями развития была значимо выше среди потомков матерей, обитавших в нестабильных условиях. Мы подтвердили важную роль серотонина как фактора, опосредующего связь между организмами матери и потомков, выявив серотонинергическую иннервацию ткани гермафродитной железы (овотестиса) и аккумуляцию серотонина в цитоплазме формирующихся ооцитов. Наши эксперименты позволяют предположить, что при стрессовом воздействии условий среды на материнский организм аккумуляция серотонина яйцеклеткой/зиготой может повышаться до неадаптивного уровня и приводить к снижению устойчивости развития эмбрионов.

Ключевые слова: материнские эффекты, устойчивость развития, аномалии развития, материнский серотонин, Gastropoda, *Lymnaea stagnalis*

DOI: 10.31857/S047514502305004X, EDN: KICFMT

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональное развитие — необычайно пластичный процесс, на протекание которого влияют как факторы внешней среды, так и сигналы, поступающие из материнского организма. Материнские эффекты — влияние фенотипа матери (в том числе ее состояния, обусловленного средой) на фенотип потомства — важны при рассмот-

рении вопросов эволюционной биологии, особенно касающихся эволюции адаптивного фенотипа (Sheriff et al., 2017; Moore et al., 2019). Наиболее очевидно влияние материнских эффектов при развитии эмбриона внутри организма матери, как, например, у млекопитающих или ветвистоусых ракообразных с выводковыми камерами. Однако появляется все больше данных о том, что материнские эффекты реализуются также в тех слу-

чаях, когда внутри организма матери происходит только оогенез, а развитие эмбриона протекает в окружающей среде (Love et al., 2013). Уже несколько десятилетий активно обсуждается, насколько велико адаптивное значение материнских эффектов (Marshall, Uller, 2007). Вероятно, адаптивные материнские эффекты, повышающие приспособленность потомков, обусловлены стрессовыми условиями, присутствующими и сохраняющимися в среде обитания достаточно длительное время. В таком случае обеспечивается “программирование” потомства, т.е. его подготовка к обитанию в неблагоприятной среде (Moore et al., 2019).

Воздействие материнского стресса на физиологию и поведение потомства изучают, в основном, на позвоночных. Множество работ посвящено “программированию” потомства с помощью глюкокортикоидной гормональной системы (Sheriff, Love, 2013). Один из самых известных примеров — цикл исследований в канадской популяции белки *Tamiasciurus hudsonicus* (Dantzer et al., 2013; 2022). У матери-белчихи, испытывающей стресс в условиях высокой плотности популяции, повышается концентрация кортизола в молоке. В результате ее потомки-белчата быстрее растут и раньше приступают к захвату территории (Dantzer et al., 2013).

Среди беспозвоночных в отношении материнских эффектов хорошо изучен пресноводный моллюск *Lymnaea stagnalis* (большой прудовик). У этого вида показано влияние уровня серотонина в организме матери на развитие и формирование поведенческих программ потомков (Ivashkin et al., 2015). Уровень серотонина в организме взрослого моллюска зависит от сезона: он максимален в весенне-летние месяцы и минимален в осенние. При этом весенне-летние потомки наиболее активны, стремятся вылезти к кромке воды, лучше переносят гипоксию. В то же время осенние потомки большую часть времени проводят на дне водоема и больше едят. Обе программы развития представляются достаточно адаптивными для соответствующего сезона. Однако, уровень серотонина в организме матери очень лабилен. Он может повышаться не только в зависимости от времени года, но и при наступлении стрессовых условий, например, при недостатке пищи (Josse et al., 1968; Steen et al., 1973). В то же время экспериментально показано, что повышение уровня серотонина в клетках раннего эмбриона приводит к существенному повышению количества аномалий развития (Ivashkin et al., 2015). При этом в норме морфологические аномалии возникают у большого прудовика крайне редко (менее 0.001%). Неизбежно возникает вопрос — где проходит та грань, после которой материнские эффекты (в нашем случае опосредованные изменением уровня серотонина) перестают быть

адаптивными для потомства и приводят к нарушениям развития?

Нашей задачей было проверить, может ли обитание матери в нестабильной среде приводить к снижению устойчивости эмбрионального развития *L. stagnalis*. Известно, что непостоянство среды обитания — один из универсальных стрессовых факторов. Это может быть меняющаяся доступность пищи, уровень загрязнения воды продуктами жизнедеятельности, громкие звуки, меняющееся освещение (Sheriff et al., 2017). В нашем исследовании мы варьировали два параметра: доступность пищи и уровень загрязненности воды, в которой живут половозрелые особи. Исходя из того, что одним из сигнальных факторов, опосредующих материнские эффекты у *L. stagnalis*, является серотонин (Ivashkin et al., 2015), мы подвергали эмбрионов дополнительному воздействию — инкубации в растворе биохимического предшественника серотонина (5-НТП) (Bogomolov, Voronezhskaya, 2022). Далее мы оценивали частоту встречаемости морфологических аномалий в каждой из экспериментальных и контрольных групп. Нам удалось показать, что обитание матери в нестабильной среде может приводить к неадаптивным материнским эффектам, а именно к снижению устойчивости эмбриогенеза, что проявляется как значимое увеличение частоты встречаемости аномалий развития.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование материнских особей

Лабораторная культура большого прудовика *Lymnaea stagnalis* получена из маточного стада, содержащегося в Университете г. Амстердам, и поддерживается в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова с 1996 г. Взрослые особи содержатся в аквариумах при температуре $22 \pm 0.1^\circ\text{C}$ со сменяемой фильтрованной водопроводной водой, аэрацией и освещением в течение всего года 16 : 8. Кормление животных и отбор кладок производится два раза в неделю.

Индукцированный нерест и содержание кладок

Для получения эмбрионов с синхронным развитием, моллюсков переносили в чистую отстоянную воду. Через 5 ч нахождения в чистой воде, моллюски откладывают кладки практически одновременно. После получения кладок животных сразу перемещали обратно, в условия, соответствующие каждой экспериментальной группе.

Первое деление дробления в разных кладках начиналось с разницей не более 30 мин. Стадии развития эмбрионов определяли по таблице нормального развития большого прудовика (Meshcheryakov, 1990). Кладки содержали в термостате при температуре 25°C . В норме при 25°C

развитие от стадии двух бластомеров до вылупления личинки из яйца занимает 12 дней. Раннее дробление завершается через 24 ч после формирования первой борозды делений дробления, гастрюляция проходит в интервале 24–36 ч, формирование раковины, глаз, щупалец начинается на 3–4-й день развития.

Экспериментальное изменение физиологического состояния материнского организма

Схема проведения эксперимента представлена на рис. 1. Всего было проведено 5 независимых повторов эксперимента. Из маточного стада сформировали 2 группы половозрелых улиток, по 36 особей в каждой (рис. 1). Улиток каждой группы помещали в контейнеры по 6 штук. Для воздействия на их физиологическое состояние условия содержания меняли двумя способами. В первой группе (СС, стабильная среда) все контейнеры с улитками помещали в установку с непрерывным протоком воды и кормили в избытке (рис. 1). Во второй группе (НС, нестабильная среда) контейнеры были изолированы от проточной системы, смену воды (2 л) проводили раз в три дня, корм давали во время смены воды (рис. 1). Количество корма рассчитывалось таким образом, что основную его массу сидящие в контейнере улитки съели в течение первого дня.

Кладки получали методом индукции, описанным выше. Для проведения экспериментов с эмбрионами от группы СС и группы НС случайным образом отбирали по 10 кладок (рис. 1). Кладки группы СС составляли группу НТР-СС, а кладки группы НС составляли группу НТР-НС. Каждую из кладок делили пополам: половина кладки использовалась в опыте (группы НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт), половина – в контроле (группы НТР-СС-контроль и НТР-НС-контроль) (рис. 1).

Экспериментальное повышение уровня серотонина в клетках эмбрионов

Для экспериментального повышения уровня серотонина у зародышей использовали ранее отработанную методику (Ivashkin et al., 2015). Яйца извлекали из коконов и переносили в чашки Петри (3 см в диаметре) с 2 мл инкубационного раствора. В контроле (рис. 1, НТР-СС-контроль и НТР-НС-контроль) в качестве инкубационного раствора использовали кипяченую фильтрованную воду с 0.1 мМ аскорбиновой кислоты. В опыте (рис. 1, НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт) использовали раствор 1 мМ предшественника серотонина (5-НТР) и 0.1 мМ аскорбиновой кислоты. Аскорбиновая кислота использовалась для предотвращения окисления 5-НТР. Через 24 ч инкубации яйца тщательно отмывали кипяченой фильтрован-

ной водопроводной водой и продолжали инкубировать в тех же условиях до завершения развития (стадия 29 по Мещеряков, 1990). Морфологию эмбрионов анализировали под стереомикроскопом Olympus SZ 60 (Japan). Морфологическими аномалиями считали отклонения в строении эмбрионов от описанного ранее для нормального развития (Bogomolov, Voronezhskaya, 2022).

Иммунохимическое выявление серотонина в гонадах

Взрослых особей анестезировали охлаждением на льду. Гонады извлекали вместе с окружающей тканью печени, расправляли на подложке из полимеризованного силикона и немедленно фиксировали в 4% параформальдегиде на 0.01 М фосфатном буфере (PBS, pH 7.4). Через 4 ч ткань отмывали в PBS с добавлением Тритон X-100 (PBT) и выдерживали в 1% тритоне на PBS в течение трех суток. Затем ткань отмывали PBS, пинцетом убирали излишки ткани, окружающей гонады. Очищенную ткань гонад инкубировали в растворе первичных антител против серотонина (Immunostar, Hudson, WI, #20080) 1 : 2000 на PBT с 5% бычьего сывороточного альбумина в течение 3-х суток. Затем ткань 3 раза отмывали PBT и инкубировали во вторичных антителах, конъюгированных с флуорофором (goat anti-rabbit Alexa 488, Invitrogen, A11008) 1 : 600 на PBT в течение суток. Затем ткань тщательно отмывали в PBS, докрашивали ядра DAPI (0.001%) и помещали в 90% глицерин на PBS для просветления. Через 2 сут ткань анализировали с использованием конфокального микроскопа Zeiss 880 (Carl Zeiss, Germany) с применением соответствующего набора фильтров. Финальные изображения получали с использованием программного обеспечения ZEN.

В качестве контроля специфичности антител использовали тот же самый протокол, но без шага инкубации тканей в первичных антителах против серотонина. В этом случае никакой положительной реакции в ткани обнаружено не было.

Статистический анализ результатов

Плодовитость (среднее число кладок на улитку и среднее число яиц в кладке) сравнивалась между группами СС и НС с помощью теста Манна–Уитни (программный пакет GraphPad Prism 8.0). Процентную долю морфологических аномалий у эмбрионов подсчитывали в каждой из 5 повторов эксперимента (опыт и контроль). Всего было проанализировано 2947 эмбрионов группы НТР-СС (1467 опыт и 1480 контроль) и 2948 эмбрионов группы НТР-НС (1479 опыт и 1469 контроль). Сравнение частот встречаемости аномалий развития у эмбрионов двух групп выполняли с помощью точного критерия Фишера (Fisher's exact

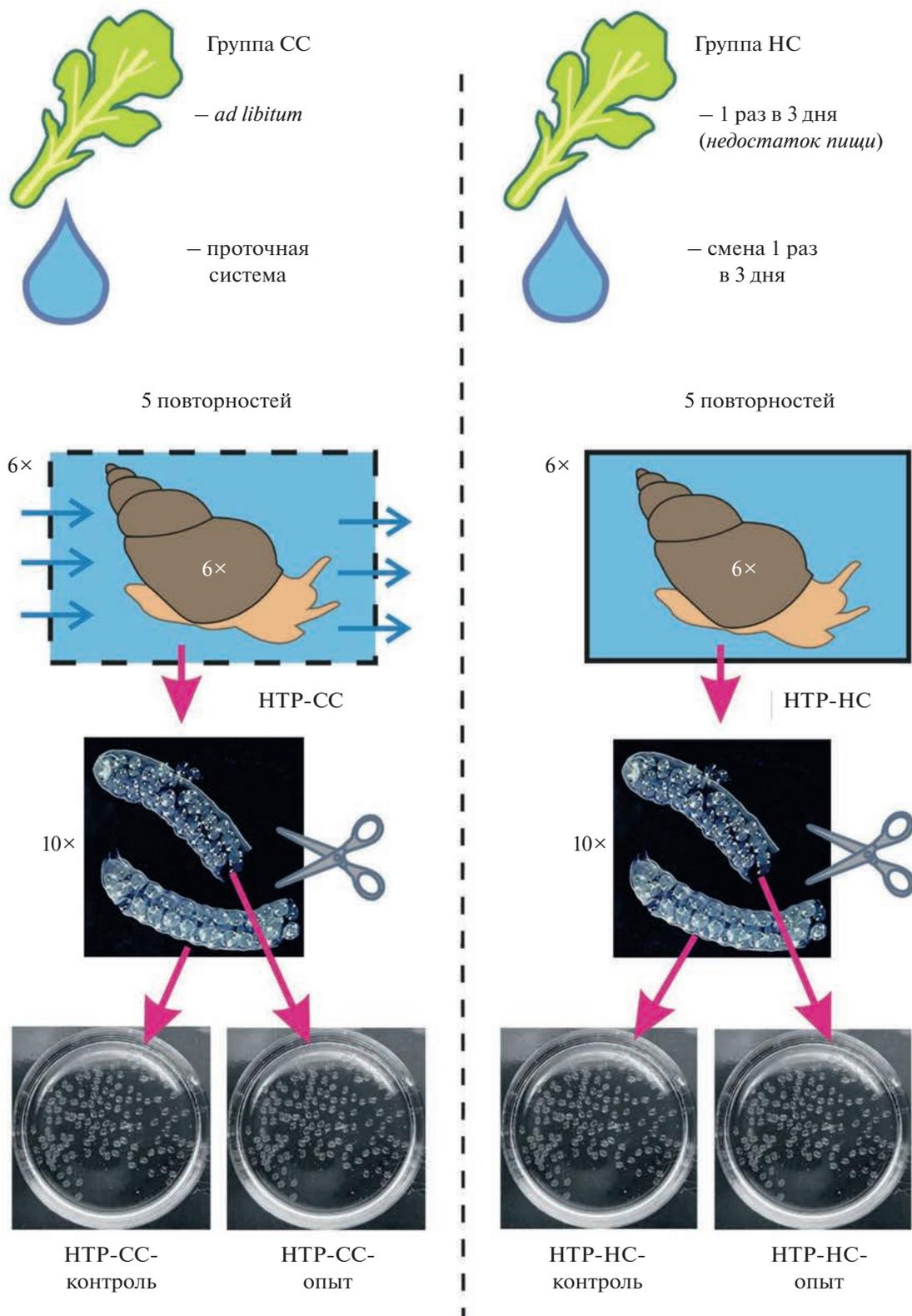


Рис. 1. Схема эксперимента по изменению физиологического состояния организма материнских особей *L. stagnalis*. Первая группа, СС – взрослые улитки содержались в стабильных условиях, то есть в среде с постоянно доступной пищей и стабильно низким уровнем загрязнения воды. Вторая группа, НС – улитки содержались в нестабильных условиях, моделирующих стрессовые воздействия (смена воды и кормление раз в три дня, причем пищи хватало только на первый день).

Таблица 1. Сравнение процентных долей эмбрионов с аномалиями развития в группах НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт (парное сравнение повторностей экспериментов)

	НТР-НС-опыт эмбрионы с аномалиями развития (%)					
	повторности	57%	67%	61%	78%	69%
НТР-СС-опыт эмбрионы с аномалиями развития (%)	15%	4.16E-26*	3.42E-36	3.78E-31	1.06E-55	4.50E-41
	21%	1.46E-18	8.82E-28	3.96E-23	9.84E-46	3.63E-32
	18%	5.91E-21	2.26E-30	1.70E-25	1.67E-48	1.15E-34
	37%	5.74E-10	2.77E-17	1.32E-13	5.38E-32	8.43E-21
	29%	1.12E-12	9.70E-21	1.04E-16	7.31E-37	8.97E-25

* Приведены уровни значимости различий (*p*-levels) между группами НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт (парно сравнивались отдельные повторности экспериментов); уровни значимости скорректированы с помощью метода Бонферони.

test), используя онлайн калькулятор <https://www.medcalc.org/calc/fisher.php>. Друг с другом сравнивались все повторности групп НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт т.е. было выполнено 25 сравнений. С учетом множественности сравнений проводилась корректировка уровней значимости различий. Корректировка выполнялась методом Бонферони (Bonferroni correction) и методом FDR (false discovery rate) с помощью скрипта, созданного в среде языка R (в табл. 1 приведены *p*-levels, скорректированные более жестким методом Бонферони). Скрипт был любезно предоставлен нам В.Г. Гриньковым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из того, что нестабильность среды обитания – один из универсальных стрессовых факторов (Sheriff et al., 2017), мы разделили материнскую популяцию улиток на две группы. Условия содержания различались двумя характеристиками: доступностью пищи и уровнем загрязненности воды, в которой живут половозрелые особи. Для первой группы (стабильная среда, СС, рис. 1) условия поддерживались максимально стабильными. Уровень загрязненности воды был низким и постоянным за счет использования проточной системы, а пища была всегда доступна за счет избыточного кормления. Вторая группа (нестабильная среда, НС, рис. 1) содержалась в постоянно меняющихся условиях. Замена воды происходила только раз в три дня, что делало уровень ее загрязненности нестабильным; кормление проводилось тоже раз в три дня, причем еды давалось столько, чтобы ее хватало только на один день. Таким образом, для второй группы моделировались условия, создающие стрессовую ситуацию.

На первом этапе нашего исследования мы проверили, в какой степени нестабильная среда в наших экспериментах влияет на физиологическое состояние взрослых особей *L. stagnalis*. Известно,

что хорошим индикатором физиологического состояния улиток является плодовитость – лабильный признак, зависящий от внешних условий. Так, плодовитость *L. stagnalis* снижается до нуля при достижении критически низкой температуры (Ivashkin et al., 2015). Также она понижается при воздействии таких сильных стрессовых факторов как прерывание процесса дыхания (Lukowiak et al., 2014), освещение ярким светом (собственные наблюдения) или длительное голодание (Joosse et al., 1968; Van der Steen et al., 1973). В наших экспериментах плодовитость в группах СС и НС достоверно не различалась. Она составляла, в среднем, 0.34 ± 0.05 для СС ($n = 24$, $\min = 0.25$, $\max = 0.42$) и 0.36 ± 0.05 для НС ($n = 24$, $\min = 0.25$, $\max = 0.43$) кладки на улитку за один индуцированный нерест. Размер кладок в группах СС и НС также достоверно не отличался. Он составлял 72 ± 8 ($n = 24$, $\min = 61$, $\max = 86$) и 74 ± 10 ($n = 24$, $\min = 61$, $\max = 92$) яйца, соответственно. Это позволяет считать, что при обитании материнских особей в условиях нестабильного получения пищи и загрязненности воды их физиологическое состояние находится в пределах описанного в литературе для данного вида (Meshcheryakov, 1990). С другой стороны, периодическое голодание существенным образом сказывается на различных физиологических характеристиках *L. stagnalis*, например, на способности к формированию условного рефлекса и запоминанию (Ito et al., 2017). Поэтому обитание в нестабильных условиях можно считать равнозначным слабому стрессу (mild stress).

Далее мы оценили устойчивость развития эмбрионов, полученных от матерей из группы СС и группы НС. Для этого мы разделили каждую из кладок на две части (рис. 1). Половина каждой кладки развивалась без каких-либо дополнительных воздействий (НТР-СС-контроль и НТР-НС-контроль). У эмбрионов и личинок этих групп не было выявлено ни одного случая аномалий развития. Напомним, что в каждую из этих групп входило

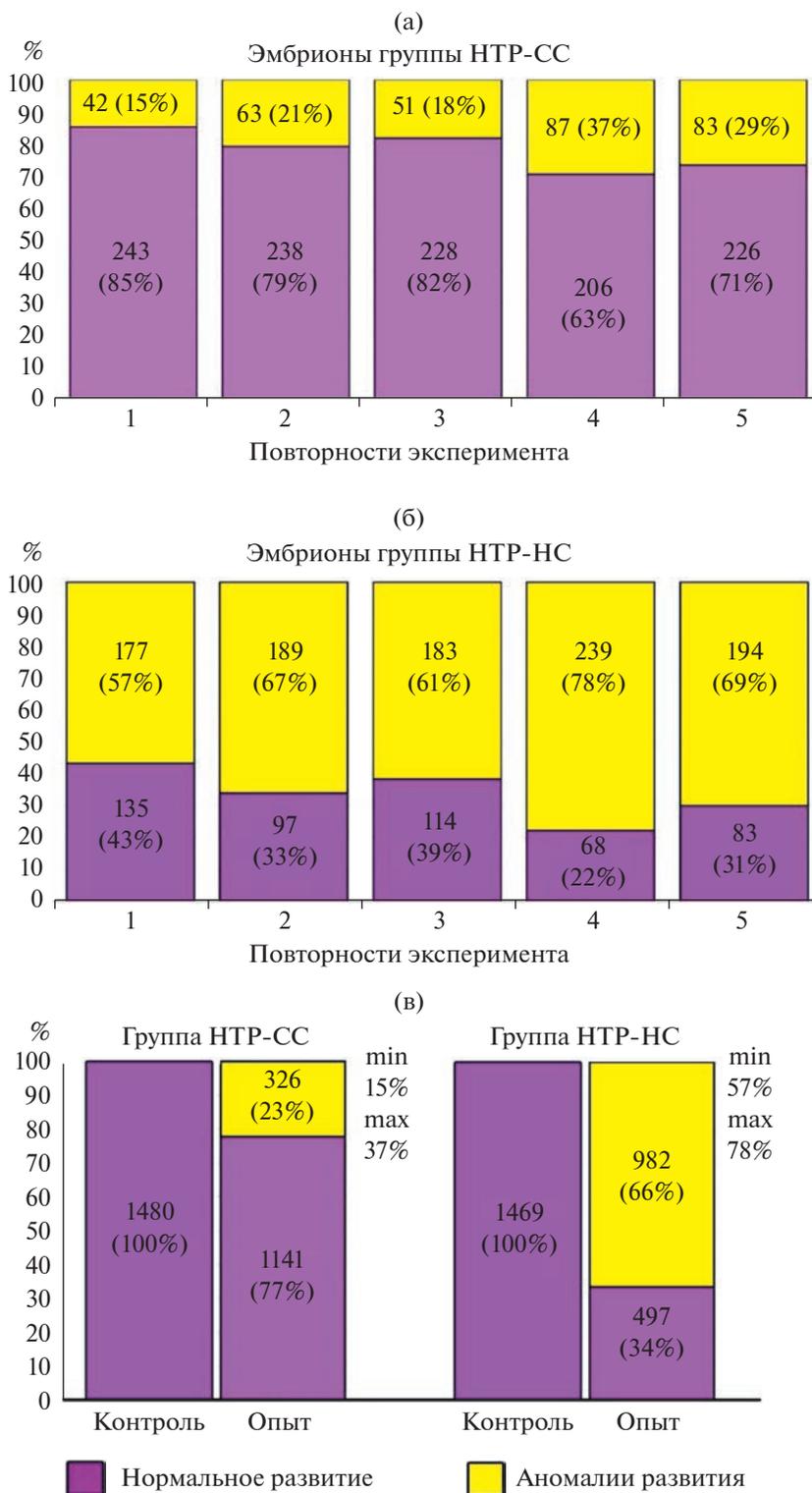
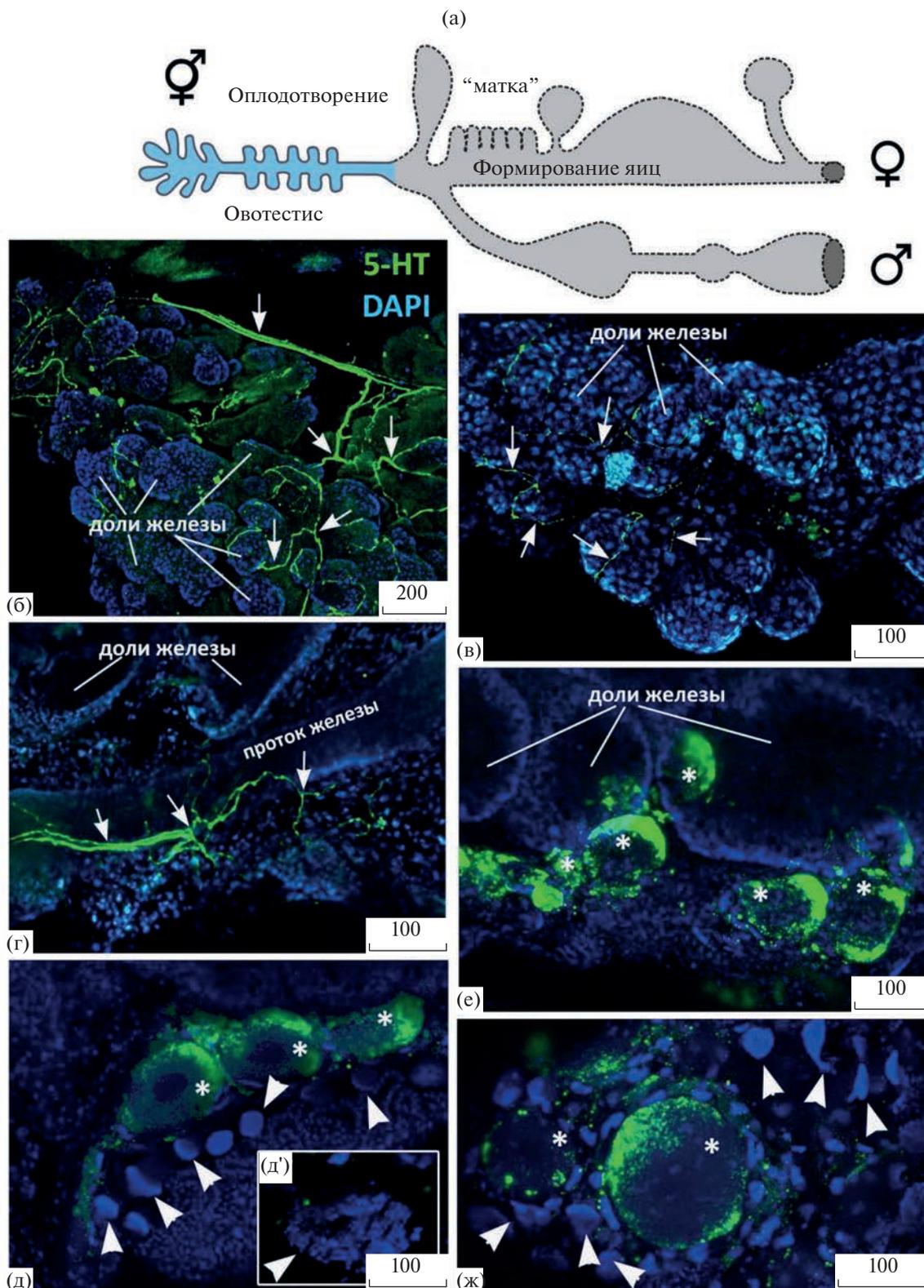


Рис. 2. Результаты экспериментов по воздействию на эмбрионы *L. stagnalis* биохимического предшественника серотонина (5-НТР). Группа НТР-СС – потомство улиток, содержащихся в стабильной среде, группа НТР-НС – потомство улиток, содержащихся в нестабильной среде. На диаграммах (а) и (б) в каждом столбике показано число и процентная доля эмбрионов данного фенотипа в данной повторности. На (в) приведены данные по всем повторностям эксперимента; внутри каждого столбика показаны число и среднее значение доли эмбрионов данного фенотипа; сбоку от столбиков – минимальное и максимальное значение доли эмбрионов с аномалиями развития.



более 1000 эмбрионов (1480 НТР-СС-контроль и 1469 НТР-НС-контроль). Таким образом, само по себе обитание матери в нестабильных условиях не приводит к появлению у потомков аномалий развития.

Известно, что уровень серотонина в организме матери зависит как от ее физиологического состояния, так и от сезона года: он повышается в стрессовых условиях и в летний период (Josse et al., 1968; Steen et al., 1973; Ivashkin et al., 2015). С другой стороны, именно серотонин является наиболее вероятным сигнальным фактором, опосредующим материнские эффекты у *L. stagnalis*. С учетом этого, мы решили проверить, как будут реагировать на повышение уровня внутриклеточного серотонина эмбрионы, являющиеся потомками улиток из групп СС и НС. Мы подвергли половину каждой из кладок, полученных от моллюсков обеих групп, инкубации в биохимическом предшественнике серотонина, 5-НТР (группы НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт, см. рис. 1). Экспериментально вызванное повышение уровня внутриклеточного серотонина приводило к появлению аномалий развития как в группе НТР-СС-опыт, так и в группе НТР-НС-опыт (рис. 2). В обеих группах наблюдались эмбрионы с нарушениями гастроляции, в частности, так называемые “экзогастролы”. При прохождении органогенезов появлялись эмбрионы с нарушениями осморегуляции, проявлявшимися как “оводнение” тела. Эти нарушения развития летальны: такие эмбрионы погибали до вступления в метаморфоз. У прошедших метаморфоз особей встречались мальформации глаз и раковины — нарушения развития, не критичные для выживания. Все наблюдавшиеся нарушения развития и мальформации были нами подробно описаны ранее (Vogomolov, Voronezhskaya, 2022). Мы учитывали любое из замеченных отклонений как аномалию развития.

Подсчет выявленных аномалий показал, что процентная доля аномалий различается в группах НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт. Так, в группе НТР-СС-опыт она варьировал от 15 до 37%, а в среднем составляла 23% (рис. 2а, 2в). В то же вре-

мя, в группе НТР-НС-опыт минимальный процент аномалий был равен 57%, максимальный — 78%, а в среднем он составлял 66% (рис. 2б, 2в). Частоту встречаемости аномалий развития в группах НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт сравнили с помощью точного критерия Фишера, а уровни значимости различий скорректировали с помощью методов FDR и Бонферони (табл. 1). Оказалось, что группы достоверно отличаются друг от друга как при попарном сравнении отдельных повторностей эксперимента (табл. 1), так и при сравнении групп в целом. Таким образом, эмбрионы группы НТР-НС, то есть потомки улиток, обитавших в нестабильной среде, обладали менее устойчивым развитием и чаще реагировали на экспериментальное повышение внутриклеточного серотонина формированием аномалий развития.

Выявленная в наших экспериментах разница между потомками улиток из стабильной и нестабильной сред обитания сходна с разницей, выявленной ранее для потомков летних и осенних особей. Так, в аналогичных экспериментах по инкубации эмбрионов в 5-НТР, процентная доля аномалий развития в летний период была выше, чем в осенний (Ivashkin et al., 2015). Это дает основания предполагать, что обитание в нестабильной среде приводит к повышению уровня серотонина в организме матери (по аналогии с сезонным повышением уровня серотонина в летний период).

Как серотонин, содержащийся в организме матери, попадает в клетки эмбриона? По всей видимости, у большого прудовика серотонин может попадать в яйцеклетку, а затем в оплодотворенную зиготу, только во время оогенеза и прохождения зиготы по половым путям матери. В предыдущих исследованиях была описана серотонинергическая сеть в извитой части женской половой системы (в матке) (Ivashkin et al., 2015). Однако яйцеклетка до попадания в извитую часть яйцевода значительную часть времени до созревания находится, собственно, в гермафродитной железе (овотестисе).

Мы решили проверить, получает ли серотонинергическую иннервацию гермафродитная железа (рис. 3а), в которой созревают как яйцеклетки,

Рис. 3. Распределение серотонин-иммунопозитивных элементов в ткани гермафродитной железы (овотестиса) *L. stagnalis*. Положительная реакция с антителами к серотонину (5-НТ — зеленый) и маркирование ядер DAPI (синий). (а) Схема строения гермафродитной железы, мужской и женской частей половой системы. В овотестисе (голубой цвет, сплошной контур) происходит формирование как яйцеклеток, так и сперматозоидов. В “матку” попадает уже оплодотворенная яйцеклетка. (б) Серотонин-содержащие волокна (стрелки) проходят в составе нерва из центральной нервной системы и ветвятся на поверхности железы (стрелки). (в) Тонкие отростки серотонин-позитивных волокон с варикозными расширениями (стрелки) на поверхности долей гермафродитной железы. (г) Серотонин-позитивные волокна в составе нерва, идущие вдоль протока гермафродитной железы (стрелки), видно ветвление отростков с варикозными расширениями в ткани железы (стрелки). (д) Серотонин-позитивная реакция наиболее выражена в области под мембраной яйцеклеток. В области формирования сперматозоидов (головки стрелок) серотонин-положительной реакции не обнаруживается. (д') Область формирования сперматозоидов с характерным паттерном расположения ядер. (е) Серотонин-позитивная реакция в цитоплазме яйцеклеток разной степени созревания (яйцеклетки обозначены звездочками). (ж) Серотонин-позитивная реакция под мембраной яйцеклеток на разной стадии созревания (яйцеклетки — звездочки), отсутствие положительной реакции в областях формирования сперматозоидов (головки стрелок). Размер масштабных линеек в микрометрах указан на каждом рисунке.

так и сперматозоиды. Мы обнаружили разветвленную сеть серотонинергических отростков вдоль всей железы. Серотонин-иммунореактивные волокна проходят в составе нерва, идущего вдоль гермафродитного протока (рис. 3б, 3г). Тонкие отростки с варикозными расширениями активно ветвятся в ткани железы и охватывают каждую ее дольку (рис. 3в). Внутри железы четко выделяются области с повышенным содержанием серотонина внутри клеток. Большой размер клеток и их расположение позволяют идентифицировать их как яйцеклетки. Поскольку иммуноположительная реакция наблюдается в клетках разного размера, можно предположить, что они являются яйцеклетками на разных стадиях созревания (звездочки на рис. 3д, 3е). Следует отметить, что иммуноположительная реакция наблюдается в цитоплазме клеток и наиболее выражена в области под мембраной. В то же время, центральная часть цитоплазмы вокруг ядра не является серотонин-позитивной (рис. 3д, 3е, 3ж). В области формирования сперматозоидов, выделяемой по характерному паттерну расположения ядер, серотонин-положительной реакции не обнаруживается (рис. 3д, 3д', 3ж). Такое распределение серотонин-иммуноположительной реакции в тканях гермафродитной железы брюхоногого моллюска обнаружено впервые. Таким образом, яйцеклетка на всех стадиях оогенеза, а затем и зигота во время прохождения по половым путям, могут получать серотонин из материнского организма (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментов, проведенных на лабораторной популяции брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis*, подтверждают, что обитание материнских особей в нестабильных (стрессовых) условиях может приводить к снижению устойчивости развития их потомков. В наших экспериментах это проявлялось как более высокий процент аномалий развития, появляющихся в ответ на инкубацию эмбрионов в 5-НТР, у потомков матерей, содержащихся в нестабильной среде. Сопоставление наших данных с данными предыдущих исследований (Ivashkin et al., 2015) позволяет предположить, что в нестабильных (стрессовых) условиях в организме матери повышается уровень серотонина, выполняющего роль сигнального фактора, который опосредует материнский эффект у *L. stagnalis*. Участие серотонина в передаче информации от матери к потомку подтверждает обнаруженная нами разветвленная серотонинергическая иннервация гермафродитной железы (овотестиса) и присутствие серотонина в яйцеклетках разных стадий созревания. Эти данные позволяют говорить о непосредственном влиянии уровня серотонина в материнском организме на будущий эмбрион. Такая серотонин-опосредованная коммуникация

между материнским организмом и организмом потомка может носить адаптивный характер: она “программирует” потомка для реализации оптимальной в данных условиях стратегии развития (Ivashkin et al., 2015). Однако при превышении определенного уровня серотонина в тканях половой системы матери, аккумуляция серотонина в формирующихся ооцитах может приводить к возникновению аномалий развития. Таким образом, в определенных условиях (например, в нестабильной среде) повышение уровня серотонина в организме матери может приводить к снижению устойчивости развития, то есть становится неадаптивным.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы признательны В.Г. Гринькову (каф. биологической эволюции биологического факультета МГУ) за помощь в статистической обработке данных.

Конфокальные изображения получены с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН (0088-2021-0020).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Эксперименты по модуляции внешних условий и уровня серотонина в клетках эмбриона выполнены при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-24-01166. Иммунохимическое выявление серотонина в формирующихся яйцеклетках проведено в рамках выполнения гранта РФФ № 22-14-00375.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.И. Богомоллов выполнял экспериментальную работу, участвовал в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Ю.А. Краус участвовала в обсуждении результатов, подготовке изображений, написании и редакции текста статьи.

Е.Е. Воронежская разработала протокол эксперимента, выполняла работу по иммунохимическому выявлению серотонина в овотестисе и формирующихся яйцеклетках, участвовала в написании и редакции текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bogomolov A.I., Voronezhskaya E.E.* An increase in the level of intracellular serotonin in blastomeres leads to the disruption in the spiral cleavage pattern in the mollusc *Lymnaea stagnalis* // Russian J. Dev. Bio. 2022. V. 53. №. 2. P. 115–120.
<https://doi.org/10.1134/S1062360422020035>
- Dantzer B., Boutin S., Lane J.E., McAdam A.G.* Integrative studies of the effects of mothers on offspring: an example from wild North American red squirrels // Advances in Neurobiology / Ed. González-Mariscal G. 2022. V. 27. P. 269–296. Springer: Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-97762-7_9
- Dantzer B., Newman A.E., Boonstra R., Palme R., Boutin S., Humphries M.M., McAdam A.G.* Density triggers maternal hormones that increase adaptive offspring growth in a wild mammal // Science. 2013. V. 340(6137). P. 1215–1217.
- Ivashkin E., Khabarova M.Y., Melnikova V., Nezlin L.P., Kharchenko O., Voronezhskaya E.E. et al.* Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails // Cell Rep. 2015. V. 12. P. 1144–1158.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.022>
- Joosse J., Boer H.H., Comelisse C.J.* Gametogenesis and oviposition in *Lymnaea stagnalis* as influenced by Y-irradiation and hunger // Symp. Zoo 1. Soc. London. 1968. V. 22. P. 213–235.
- Love O.P., McGowan P.O., Sheriff M.J.* Maternal adversity and ecological stressors in natural populations: the role of stress axis programming in individuals, with implications for populations and communities // Functional Ecology. 2013. V. 27(1). P. 81–92.
- Lukowiak K., Sunada H., Teskey M., Dalesman S.* Environmentally relevant stressors alter memory formation in the pond snail *Lymnaea* // J. Experimental Biology. 2014. V. 217. P. 76–83.
- Marshall D., Uller T.* When is a maternal effect adaptive? // Oikos. 2007. V. 116(12). P. 1957–1963.
- Meshcheryakov V.N.* The common pond snail *Lymnaea stagnalis* // Animal species for developmental studies. – Springer, Boston, MA, 1990. P. 69–132.
- Moore M.P., Whiteman H.H., Martin R.A.* A mother’s legacy: the strength of maternal effects in animal populations // Ecology Letters. 2019. V. 22(10). P. 1620–1628.
- Sheriff M.J., Bell A., Boonstra R., Dantzer B., Lavergne S.G., McGhee K.E., MacLeod K.J., Winandy L., Zimmer C., Love O.P.* Integrating ecological and evolutionary context in the study of maternal stress. Integrative and comparative biology. 2017. V. 57(3). P. 437–449.
- Sheriff M.J., Love O.P.* Determining the adaptive potential of maternal stress // Ecology letters. 2013. V. 16(2). P. 271–280.
- van der Steen W., Jager J.C., Tiemersma D.* The influence of food quantity on feeding, reproduction, and growth in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.) with some methodological comments // Proc. K. Ned. Akad. Wet. 1973. V. 76. P. 47–60.

Instability of the Mother’s Environment Leads to Reduced Developmental Robustness in *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda)

A. I. Bogomolov^{1, 2}, Y. A. Kraus^{1, 2}, and E. E. Voronezhskaya^{2, *}

¹*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, ul. Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia*

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

**e-mail: elena.voronezhskaya@idbras.ru*

Adaptive maternal effects that increase the adaptability of offspring are often caused by stressful conditions that persist in the environment for an extended period of time. The question arises, what is the threshold at which maternal effects cease to be adaptive for offspring and lead to developmental disorders? One of the stressors is considered to be unpredictable changes in environmental conditions. We aimed to test whether a mother’s inhabitation of unstable environment could lead to a decrease of developmental robustness in the embryos of the gastropod mollusk *Lymnaea stagnalis*. The laboratory population of snails was split into two groups. For the first group, conditions were maintained as stable as possible, with constant water exchange and excessive feeding. The second group was kept under unstable (stressful) conditions, with episodic feeding and water exchange. It turned out that unstable conditions alone did not affect the frequency of developmental anomalies in the offspring. Since serotonin is presumably plays the role of the signaling molecule mediating the maternal effect in *L. stagnalis*, we subjected embryos of both groups to the biochemical precursor of serotonin (5-HTP). After incubation in 5-HTP, the proportion of embryos with developmental anomalies was significantly higher among the offspring of mothers living in unstable conditions. We confirmed the important role of serotonin as a factor mediating communication between the organisms of mother and offspring by revealing serotonergic innervation of the hermaphroditic gland (ovotestis) and accumulation of serotonin in the cytoplasm of forming oocytes. Our experiments suggest that under the stressful environmental conditions, serotonin accumulation by the oocyte/zygote may increase to a maladaptive level and lead to a decrease in the robustness of embryonic development.

Keywords: maternal effects, developmental robustness, developmental anomalies, serotonin, Gastropoda, *Lymnaea stagnalis*

УДК 591.3

ПАТТЕРН ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *foxn4* ПРЕДПОЛАГАЕТ ЕГО АССОЦИАЦИЮ С ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ НЕЙРОСЕНСОРНЫХ КЛЕТОК У БЕЛОМОРСКОГО ГИДРОИДА *Sarsia lovenii*

© 2023 г. А. А. Ветрова^а, А. А. Прудковский^б, С. В. Кремнев^{а, б, *}^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия^бМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

*e-mail: s.kremnyov@gmail.com

Поступила в редакцию 10.04.2023 г.

После доработки 10.05.2023 г.

Принята к публикации 11.05.2023 г.

Ген *foxn4* – один из ключевых транскрипционных факторов, управляющих формированием сетчатки глаза у позвоночных. Однако не ясно, является ли его ассоциация с формированием светочувствительных органов эволюционно консервативной. Для того, чтобы ответить на этот вопрос, мы проверили, ассоциирована ли экспрессия этого гена со светочувствительными органами у представителя базальных Metazoa, гидроида *Sarsia lovenii* (Hydrozoa, Cnidaria). Обычно жизненный цикл гидроидов включает стадии пелагической медузы и бентосного полипа. Однако у многих видов вместо свободных медуз формируются прикрепленные медузоиды, у которых многие структуры редуцированы. Исключительность *S. lovenii* состоит в том, что у нее как медузы, так и медузоиды формируются внутри одного вида, полипами, относящимися к разным гаплотипам, именно эта особенность *S. lovenii* делает ее перспективным модельным объектом для сравнительных исследований регуляции формирования морфологических признаков у кишечнополостных. Мы сравнили пространственную экспрессию гена *foxn4* в медузах и медузоидах *S. lovenii* методом гибридизации *in situ*. У медуз *S. lovenii* имеются светочувствительные глазки, однако экспрессия *foxn4* была обнаружена не в самом глазке, а вокруг него, в эпидерме бульбы щупальца. У медузоидов глазки отсутствуют, но экспрессия гена *foxn4* была выявлена, и оказалась приурочена к редуцированным бульбам щупалец. Известно, что бульба щупальца у гидроидных медуз является зоной локализованного формирования стрекательных клеток, считающихся производными механосенсорных клеток. Наши результаты позволяют предположить, что у *S. lovenii* экспрессия гена *foxn4* необходима для формирования нейросенсорных клеток, как и у позвоночных животных. Однако, мы предполагаем, что у *S. lovenii* экспрессия этого гена ассоциирована не с фоторецепторными, а механосенсорными стрекательными клетками.

Ключевые слова: Стрекающие, *Sarsia lovenii*, жизненный цикл, нейросенсорные клетки, *foxn4*

DOI: 10.31857/S0475145023050075, **EDN:** KBMPNK

ВВЕДЕНИЕ

Одними из ключевых генов, отвечающих за формирование глаз у позвоночных, помимо генов семейства Pax (в частности, *pax6*) (Kozmik, 2005), являются гены семейства Fox (Liu et al., 2020). Ранее было показано, что гены семейства Pax консервативно ассоциированы с регуляцией формирования глаз и светочувствительных органов у разных типов животных (Wawersik, Maas, 2000; Kozmik et al., 2003), в том числе у представителей базальных Metazoa, кишечнополостных из класса Hydrozoa (Suga et al., 2010). Однако до сих пор не известно, существует ли подобная связь фоторе-

цепторных структур с экспрессией генов семейства Fox.

Перспективной моделью для исследований регуляции формирования морфологических признаков у кишечнополостных является представитель класса Hydrozoa, беломорский гидроидный полип *Sarsia lovenii*. Уникальность *S. lovenii* состоит в том, что у этого вида особи, принадлежащие к разным гаплотипам, отличаются особенностями жизненного цикла (Prudkovsky et al., 2019). Сложный жизненный цикл гидроидных включает чередование полового и бесполого поколений. Как правило, бесполое поколение

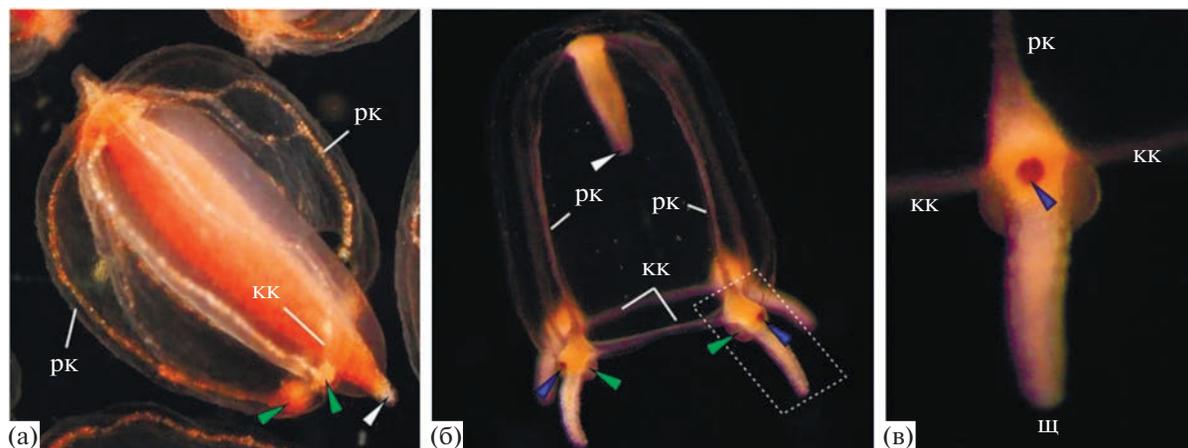


Рис. 1. Варианты полового поколения у *S. lovenii*. (а) Медузоид. Зеленые стрелки указывают на редуцированные бульбы щупалец, белая — на кончик манубриума. рк — радиальный канал, кк — кольцевой канал. (б) Молодая медуза. Зеленые стрелки указывают на бульбы щупалец, синие — на глазки. Пунктиром выделена область, показанная на (в). (в) Бульба щупальца медузы, щ — щупальце.

представлено бентосным полипом, от которого отпочковывается пелагическая медуза, размножающаяся половым путем. В ходе полового размножения формируется личинка (планула), которая оседает и в ходе метаморфоза образует полип. Однако у многих видов гидроидов медузоидное поколение редуцировано, и медуза не отрывается от полипа. В случае *S. lovenii*, полипы одного гаплотипа образуют свободно плавающие медузы, тогда как полипы другого формируют прикрепленные медузоиды. Медузоиды, в частности медузоиды видов рода *Sarsia*, формируют половые продукты, не отрываясь от материнской колонии. Многие структуры, характерные для свободноплавающей медузы, такие как щупальца, ротовое отверстие и светочувствительные глазки у них отсутствуют, а бульбы щупалец редуцированы (рис. 1а) (Edwards, 1978; Prudkovsky et al., 2019). Именно эта особенность *S. lovenii* делает ее удачным модельным объектом для сравнительных исследований — формирование “нормальных” и редуцированных структур можно охарактеризовать и сопоставить в пределах одного вида.

Чтобы прояснить, принимают ли гены семейства Fox участие в регуляции формирования глаза у гидроидных медуз, мы исследовали пространственный паттерн экспрессии гена *foxn4* у медуз и медузоидов *S. lovenii* методом гибридизации *in situ*. У позвоночных животных этот ген регулирует дифференцировку амакриновых и горизонтальных клеток сетчатки (Liu et al., 2020). В том случае, если функции продукта этого гена эволюционно консервативны, у медуз *S. lovenii* (рис. 1б) экспрессия этого гена должна быть ас-

социирована со светочувствительными глазками, расположенными в бульбах щупалец (рис. 1в). При этом у медузоиды, лишены глазков в редуцированных бульбах щупалец, должны иметь совершенно иную (по сравнению с медузами) область экспрессии *Foxn4*, или не иметь ее вовсе. Однако экспрессия гена *foxn4* была выявлена нами в бульбах щупалец как у медуз, так и у медузоидов. Причем у медуз экспрессия *Foxn4* оказалась ассоциирована не с глазком, а с окружающей глазок эпидермой. Эти данные позволили нам предложить оригинальную гипотезу о функциональной роли гена *foxn4* у книдарий из класса Hydrozoa.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала

Сбор материала для исследований был выполнен на Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова (66°34' N, 33°08' E) в 2021 г. Медузы были собраны из толщи воды с помощью планктонной сети в апреле-июне. Колонии *S. lovenii* с прикрепленными медузоидами были собраны в мае-июне во время отлива на верхней сублиторали. Медуз и медузоидов фотографировали с помощью бинокля Olympus SZ51, оснащенного камерой Canon D550.

Синтез зондов для гибридизации *in situ*

Синтез зондов для проведения гибридизации *in situ* проводили в несколько этапов. Сначала, мы синтезировали библиотеку кДНК методом обратной транскрипции с помощью набора Mint (Евро-

ген, Россия). Для синтеза библиотеки кДНК была использована смесь ранее выделенной тотальной РНК из тканей медуз и медузоидов. Для получения фрагмента исследуемого гена была проведена ПЦР на кДНК со специфичными праймерами: SIFoxN4 dir; ATGTACAGTCCATACCCAAATAATA-ACG, SIFoxN4 rev; GCCATGCTKGCSTTTTATTGC. Праймеры были синтезированы компанией Евроген, Россия. Амплифицированные фрагменты были клонированы в pAL2-T вектор (Евроген, Россия). Меченный дигоксигенином антисмысловой РНК-зонд транскрибировали с фрагментов исследуемого гена, амплифицированного с плазмиды со вставкой.

Гибридизация in situ

Для исследования экспрессии генов методом гибридизации *in situ* медузы и медузоиды были зафиксированы в 4% параформальдегиде на морской воде, после чего фиксатор заменяли на 100% метанол и хранили при -20°C . Всего для гибридизации *in situ* зафиксировали и использовали 3 медузы и 15–20 медузоидов *S. lovenii*. Гибридизацию *in situ* проводили согласно ранее опубликованному протоколу (Genikhovich, Technau, 2009) с некоторыми изменениями. Образцы регидратировали в РТw (1x PBS с 0.1% Tween 20) и обрабатывали протеиназой К в РТw (80 нг/мкл) для лучшего проникновения зонда и антител в ткани в течение 90 с. Дальнейшие этапы предгибризационной обработки не отличались от протокола, изложенного в (Genikhovich, Technau, 2009). Перед гибридизацией образцы 30 мин прогревали при $+80^{\circ}\text{C}$ для инактивации эндогенной щелочной фосфатазы, чтобы избежать ложноположительного результата. Гибридизацию с зондом проводили при температуре 58°C , концентрация антисмыслового РНК-зонда составляла 1 нг/мкл. Для визуализации гибридизованного зонда были использованы антитела к дигоксигенину, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Anti-DIG AP antibody, Roche; разведение 1/2000) и субстрат для щелочной фосфатазы NBT/BCIP (Roche). После цветной реакции образцы промывали в 100% этаноле, чтобы убрать фоновое окрашивание. Образцы фотографировали в 99% глицерине с помощью микроскопа Leica M165C (Leica, Германия), оснащенного цифровой камерой Leica DFC420C (5.0MP).

Просвечивающая световая и трансмиссионная электронная микроскопия

Для исследования образцов методом просвечивающей световой и трансмиссионной элект-

ронной микроскопии (ТЭМ) медузы фиксировали в 2.5% растворе глутарового альдегида на 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2–7.4, 15 мг/мл NaCl, 0.025% MgCl₂). Образцы затем дофиксировали в 1% растворе OsO₄ в течение часа, и заключали в Epon812 согласно ранее опубликованному протоколу (Купаева et al., 2018). Окрашенные толлуидиновым синим полутонкие срезы фотографировали с помощью микроскопа Leica M165C (Leica, Германия), оснащенного цифровой камерой Leica DFC420C (5.0MP). Контрастированные ультратонкие срезы исследовали с помощью просвечивающим электронного микроскопа JEM-1011 JEOL (JEOL, Япония).

Обработка изображений

Обработку изображений осуществляли в программе Adobe Photoshop CS6. Чтобы добиться оптимального качества изображения, изменяли “Яркость”, “Контраст” и “Уровни” для RGB канала. Все инструменты применялись ко всему изображению, а не локально.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Медуза *S. lovenii* имеет четыре щупальца, в основании которых находится по сферическому утолщению, бульбе (рис. 1б, 1в). На внешней стороне бульбы расположен светочувствительный орган (глазок), имеющий форму чашечки (рис. 2а). Бороздка отделяет область глазка от остальной эпидермы бульбы, в которой различимы капсулы стрекательных клеток (рис. 2б). Глазок *S. lovenii* по своему строению и клеточному составу соответствует глазку родственного вида, *S. tubulosa* (Singla, Weber, 1982). Он образован двумя типами клеток: ресничными фоторецепторными и пигментными. В глазке можно выделить апикальный слой крупных вакуолей, лежащий за ним пигментный слой и базальный слой, где находятся ядра фоторецепторных и пигментных клеток. Вогнутая апикальная поверхность глазка покрыта слизью (рис. 2в).

У сформированных медузоидов *S. lovenii*, в отличие от медуз, в редуцированных бульбах отсутствуют глазки и щупальца (рис. 1а).

У взрослых, полностью сформированных медуз *S. lovenii* экспрессия гена *foxn4* была нами выявлена в отдельных клетках на дистальном кончике манубриума и в бульбах щупалец (рис. 3в, 3г). В бульбах щупалец экспрессия гена *foxn4* была обнаружена в эпидерме – на боковых поверхностях бульбы, дистальнее точек прикрепления зонтика, а также (менее интенсивно) с ее внутренней стороны (рис. 3д, 3е, 3ж). Ранее, было показано, что другие гены из семейства Fox (*foxb*,

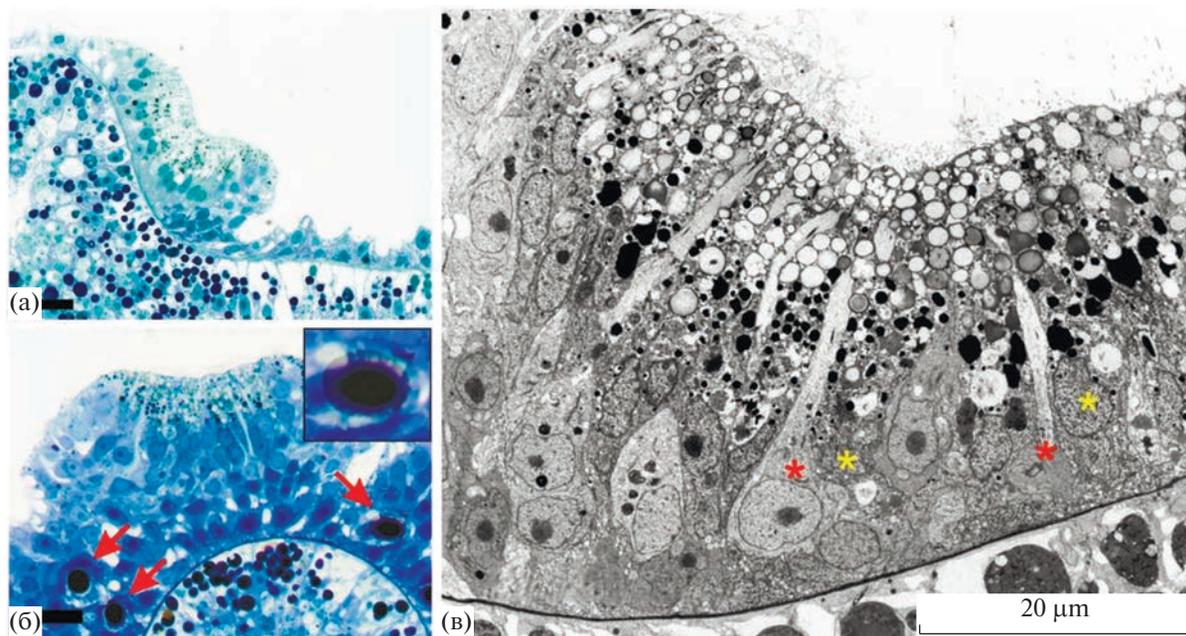


Рис. 2. Глазок медузы *S. lovenii*. (а, б) Продольный и поперечный срез, световая микроскопия. Красные стрелки указывают на капсулы стрекательных клеток. Во врезке на рис. 2б – капсула стрекательной клетки. Масштабные отрезки – 20 мкм. (в) Фоторецепторные (красная звездочка) и пигментные (желтая звездочка) клетки глазка, ТЭМ.

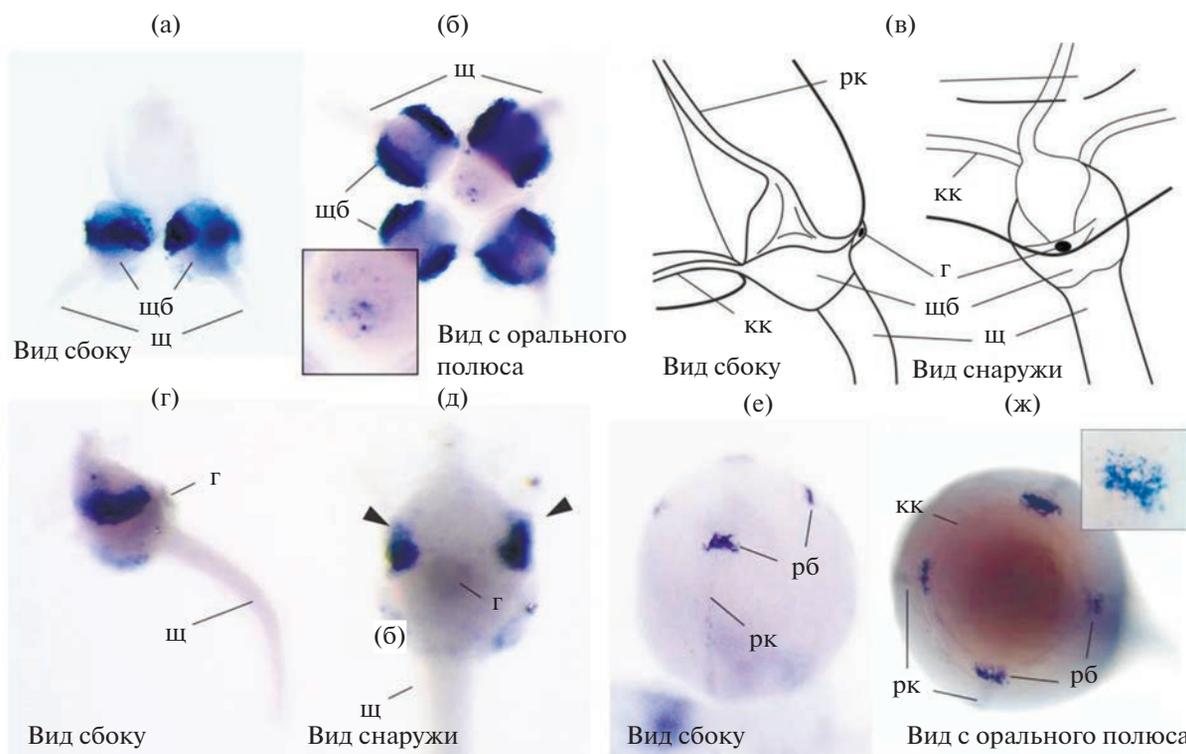


Рис. 3. Экспрессия гена *foxn4* у *S. lovenii*, гибридизация *in situ*. (а, б) Сформированная медуза. Во врезке экспрессия *Foxn4* в кончике манубриума. щ – Щупальце, щб – щупальцевая бульба. (в) Схематичное изображение бульбы щупальца медузы: рк – радиальный канал, кк – кольцевой канал, г – глазок, щб – щупальцевая бульба, щ – щупальце. (г, д) Бульба щупальца медузы. Черными треугольниками указаны места прикрепления зонтика медузы. (е, ж) Сформированный медузоид. Во врезке экспрессия *Foxn4* в редуцированной бульбе (рб) медузоида.

foxc1, *foxd*) тоже экспрессируются в бульбах щупалец у медузы *Clytia hemisphaerica* (Chevalier et al., 2006; Condamine et al., 2019; Leclere et al., 2019). Интересно что пространственные паттерны их экспрессии сходны с выявленным нами паттерном экспрессии гена *foxn4*. Мы не обнаружили экспрессию гена *foxn4* в области глазка у медузы *S. lovenii*.

У сформированного медузоида область экспрессии гена *foxn4* находится в области редуцированной бульбы в отдельных эпидермальных клетках (рис. 3а, 3б).

Судя по нашим данным, у *S. lovenii* экспрессия гена *foxn4* не ассоциирована со светочувствительными органами, и, возможно, связана с дифференцировкой нейросенсорных клеток иного типа. Похожий случай мы видим на примере гена *foxb*, который у позвоночных животных принимает участие в формировании нервной трубки и отростков нейронов (Golson, Kaestner, 2016). У медузы *C. hemisphaerica* его экспрессия была обнаружена в статоцисте, механосенсорном органе равновесия (Chevalier et al., 2006). У планул этого вида экспрессия *foxb* связана с формированием ганглионарных клеток и стрекательных клеток (Chevalier et al., 2006). Мы предполагаем, что ген продукт гена *foxn4* также может играть какую-то роль в дифференцировке стрекательных клеток. Стрекательные клетки считаются высокоспециализированными механосенсорными клетками (Oliver et al., 2008). Известно, что у *S. lovenii*, а также у других гидроидных медуз, например, у *C. hemisphaerica*, в той области бульбы щупальца, где мы обнаружили экспрессию *foxn4*, формируются стрекательные клетки (Denker et al., 2008; Leclere et al., 2012; Vetrova et al., 2023). Кроме того, паттерн экспрессии гена *foxn4* в бульбах щупалец медуз пересекается с паттернами экспрессии генов *nanos1*, *vasa* и *piwi*, экспрессия которых была также обнаружена в редуцированных бульбах медузоида (Vetrova et al., 2023). Для представителей класса Hydrozoa было показано, что гены *nanos1*, *vasa* и *piwi* являются генами-маркерами как мультипотентных i-клеток, так и малодифференцированных предшественников стрекательных клеток (Mochizuki et al., 2000; Mochizuki et al., 2001; Seipel et al., 2004; Denker et al., 2008; Rebscher et al., 2008; Leclère et al., 2012). Дополнительным свидетельством ассоциации *foxn4* со стрекательными клетками является его экспрессия в кончике манубриума (рис. 3г). На кончике манубриума у гидроидных медуз расположено ротовое отверстие, а вокруг него – стрекательные клетки (Denker et al., 2008). Таким образом, у нас есть основания предполагать, что *foxn4* является еще

одним геном, вовлеченным в дифференцировку стрекательных клеток у Стрекающих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном здесь исследовании мы впервые охарактеризовали паттерн экспрессии гена *foxn4* у представителя кишечнополостных. Более того, мы сопоставили паттерны его экспрессии у свободноплавающих медуз и прикрепленных медузоидов, формирующихся на полипах одного и того же вида гидроидов. Оказалось, что у *S. lovenii* экспрессия *foxn4* ассоциирована не с фоторецепторной структурой – светочувствительным глазком, а с областью формирования стрекательных клеток. На основании полученных данных можно предположить консервативность функции FOXN4 как транскрипционного фактора, участвующего в дифференцировке нейросенсорных клеток. Однако в отличие от позвоночных животных, у которых *foxn4* необходим для формирования клеток сетчатки глаза, у гидроидов он, судя по пространственным паттернам его экспрессии, не участвует в регуляции формирования и работы органа фоторецепции. Поскольку экспрессия гена *foxn4* была визуализирована в эпидерме бульбы щупалец, где у гидроидных медуз находится область формирования стрекательных клеток, мы предполагаем, что функция FOXN4 может быть связана с процессами их дифференцировки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим Беломорскую Биологическую Станцию МГУ имени Н.А. Перцова за возможность получить материал для исследования. Исследования методом ТЭМ были проведены с использованием оборудования ЦКП “Электронная микроскопия в науках о жизни” МГУ им. М.В. Ломоносова (УНУ “Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия”).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование/проект выполнен при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-74-00129.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А. А. Ветрова – проведение экспериментов, написание статьи. А.А. Прудковский – проведение экспериментов, сбор материала, С.В. Кремнев – проведение экспериментов, сбор материала, написание статьи, общее руководство работой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chevalier S., Martin A., Leclère L. et al.* Polarised expression of FoxB and FoxQ2 genes during development of the hydrozoan *Clytia hemisphaerica*. // *Dev. Genes. Evol.* 2006. V. 216. № 11. P. 709–720.
<https://doi.org/10.1007/s00427-006-0103-6>
- Condamine T., Jager M., Leclère L. et al.* Molecular characterisation of a cellular conveyor belt in *Clytia* medusae // *Dev. Biol.* 2019. V. 456. № 2. P. 212–225.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.09.001>
- Denker E., Manuel M., Leclère L. et al.* Ordered progression of nematogenesis from stem cells through differentiation stages in the tentacle bulb of *Clytia hemisphaerica* (Hydrozoa, Cnidaria) // *Dev Biol.* 2008. V. 315. № 1. P. 99–113.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.12.023>
- Edwards C.* The hydroids and medusae *Sarsia occulta* sp. nov., *Sarsia tubulosa* and *Sarsia loveni* // *J. Mar. Biol. Assoc.* 1978. V. 58. № 2. P. 291–311.
- Genikhovich G., Technau U.* In situ hybridization of starlet sea anemone (*Nematostella vectensis*) embryos, larvae, and polyps // *Cold Spring Harb Protoc.* 2009. V. 2009. № 9. P. pdb. prot5282.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot5282>
- Golson M.L., Kaestner K.H.* Fox transcription factors: from development to disease. // *Development.* 2016. V. 143. № 24. P. 4558–4570.
<https://doi.org/10.1242/dev.112672>
- Kozmik Z.* Pax genes in eye development and evolution // *Curr Opin Genet Dev.* 2005. V. 15. № 4. P. 430–438.
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.05.001>
- Kozmik Z., Daube M., Frei E. et al.* Role of Pax genes in eye evolution: a cnidarian PaxB gene uniting Pax2 and Pax6 functions // *Dev cell.* 2003. V. 5. № 5. P. 773–785.
[https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00325-3](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00325-3)
- Kupaeva D.M., Vetrova A.A., Kraus Y.A. et al.* Epithelial folding in the morphogenesis of the colonial marine hydrozoan, *Dynamena pumila* // *Biosystems.* 2018. V. 173. P. 157–164.
- Leclère L., Horin C., Chevalier S. et al.* The genome of the jellyfish *Clytia hemisphaerica* and the evolution of the cnidarian life-cycle // *Nat. Ecol. Evol.* 2019. V. 3. № 5. P. 801–810.
<https://doi.org/10.1038/s41559-019-0833-2>
- Leclère L., Jager M., Barreau C. et al.* Maternally localized germ plasm mRNAs and germ cell/stem cell formation in the cnidarian *Clytia* // *Dev. Biol.* 2012. V. 364. № 2. P. 236–248.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.01.018>
- Liu S., Liu X., Li S. et al.* Foxn4 is a temporal identity factor conferring mid/late-early retinal competence and involved in retinal synaptogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 9. P. 5016–5027.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1918628117>
- Mochizuki K., Nishimiya-Fujisawa C., Fujisawa T.* Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra* // *Dev. Genes. Evol.* 2001. V. 211. № 6. P. 299–308.
<https://doi.org/10.1007/s004270100156>
- Mochizuki K., Sano H., Kobayashi S. et al.* Expression and evolutionary conservation of nanos-related genes in *Hydra* // *Dev. Genes. Evol.* 2000. V. 210. № 12. P. 591–602.
<https://doi.org/10.1007/s004270000105>
- Oliver D., Brinkmann M., Sieger T. et al.* Hydrozoan nematocytes send and receive synaptic signals induced by mechano-chemical stimuli // *J. Exp. Biol.* 2008. V. 211. № 17. P. 2876–2888.
<https://doi.org/10.1242/jeb.018515>
- Prudkovsky A.A., Ekimova I.A., Neretina T.V.* A case of nascent speciation: unique polymorphism of gonophores within hydrozoan *Sarsia lovenii* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52026-7>
- Rebscher N., Volk C., Teo R. et al.* The germ plasm component Vasa allows tracing of the interstitial stem cells in the cnidarian *Hydractinia echinata* // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. № 6. P. 1736–1745.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21562>
- Seipel K., Yanze N., Schmid V.* The germ line and somatic stem cell gene Cniwi in the jellyfish *Podocoryne carnea* // *Int. J. Dev. Biol.* 2004. V. 48. № 1. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.15005568>
- Singla C.L., Weber C.* Fine structure of the ocellus of *Sarsia tubulosa* (Hydrozoa, Anthomedusae) // *Zoomorphology.* 1982. V. 100. № 1. P. 11–22.
<https://doi.org/10.1007/BF00312197>
- Suga H., Tschopp P., Graziussi D.F. et al.* Flexibly deployed Pax genes in eye development at the early evolution of animals demonstrated by studies on a hydrozoan jellyfish // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 32. P. 14263–14268.
- Vetrova A.A., Prudkovsky A.A., Kremnyov S.V.* Distribution of nematocytes differs in two types of gonophores in hydrozoan *Sarsia lovenii* // *bioRxiv* 2023. P. 2023.03.
<https://doi.org/10.1101/2023.03.22.533798>
- Wawersik S., Maas R.L.* Vertebrate eye development as modeled in *Drosophila* // *Hum Mol Genet.* 2000. V. 9. № 6. P. 917–25.
<https://doi.org/10.1093/hmg/9.6.917>

foxn4* Expression Pattern Suggests Its Association with Neurosensory Cells in the White Sea Hydrozoan *Sarsia lovenii

A. A. Vetrova¹, A. A. Prudkovsky², and S. V. Kremnyov^{1, 2, *}

¹*Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

²*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

**e-mail: s.kremnyov@gmail.com*

The *foxn4* is one of the key transcription factor genes controlling retinal formation in vertebrates. However, it is not clear whether its association with light-sensitive organ formation is evolutionary conserved. To answer this question, we tested whether the expression of this gene is localized within light-sensitive organs in a representative of basal Metazoa, the hydroid *Sarsia lovenii* (Hydrozoa, Cnidaria). Usually, the life cycle of hydrozoans includes stages of a pelagic medusa and a benthic polyp. However, in many species, attached medusoids, in which many medusa structures are reduced, form instead of free-swimming medusa. The White Sea hydrozoan *Sarsia lovenii* is an exceptional example of the species, in which polyps of different haplotypes produce either pelagic medusae or attached medusoids. Comparison of gene expression in medusae and medusoids of *S. lovenii* is a promising model to study how the formation of morphological traits is regulated in hydrozoan cnidarians. We compared the spatial pattern of *Foxn4* expression in medusae and medusoids of *S. lovenii* by *in situ* hybridization. In medusae, *Foxn4* is expressed not in the photoreceptive ocelli, but in the ectoderm of the tentacle bulb around the ocellus. Although, unlike medusae, *S. lovenii* medusoids lack ocelli, we detected *Foxn4* expression in their reduced tentacle bulbs. It is known that the tentacle bulb in hydrozoan medusae is a zone of localized formation of nematocytes, which are considered to be derivatives of mechanosensory cells. Thus, our results indicate that, in medusae and medusoids of *S. lovenii*, the *foxn4* is not associated with the formation of photoreceptor organs, as in vertebrates. However, it may be associated with nematocytes, another type of neurosensory cells.

Keywords: Cnidaria, *Sarsia lovenii*, life-cycle, neurosensory cells, *foxn4*