



Российская Академия Наук

Научный совет РАН
по биологии развития



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ
И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Совет молодых
ученых ИБР РАН

Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН

Конференция молодых ученых
**АКТУАЛЬНЫЕ
ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ
РАЗВИТИЯ**



ИнтерЛабСервис

LACORA



12-14 октября 2021
Москва, ИБР РАН

**УДК 57
ББК 28я43
М34**

М34 Материалы Конференции молодых ученых «Актуальные проблемы биологии развития», 12-14 октября 2021 г., Москва, ИБР РАН. — М. Издательство Перо, 2021. — 12,1 Мб. [Электронное издание].

ISBN 978-5-00189-552-7

В сборнике представлены материалы Конференции молодых ученых «Актуальные проблемы биологии развития», которая состоялась 12-14 октября 2021 года в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (Москва). Конференция носит междисциплинарный характер и посвящена теоретическим и прикладным проблемам биологии развития. В программе конференции представлены выступления молодых учёных России и ближнего зарубежья по следующим тематикам: клеточные основы и молекулярные механизмы реализации генетической информации, детерминация пола, механизмы дифференцировки и трансдифференцировки клеток, закономерности раннего развития, закономерности процессов морфогенеза и регенерации, становление интегрирующих систем на представителях разных групп беспозвоночных и позвоночных животных.

Конференция организована Институтом биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Материалы конференции опубликованы на сайте ИБР РАН.



www.idbras.ru

**УДК 57
ББК 28я43**

ISBN 978-5-00122-668-0

**(с) Коллектив авторов, 2021
(с) ИБР РАН, 2021**

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ КОНФЕРЕНЦИИ

Васильев А.В., председатель

чл.-кор. РАН, директор Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, заведующий кафедрой эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, председатель Научного совета РАН по биологии развития

Захаров И.С., заместитель председателя

д.б.н., председатель ученого совета Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, заведующий лабораторией Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, член Научного совета РАН по биологии развития

Краус Ю.А., заместитель председателя

д.б.н., заведующий лабораторией Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ведущий научный сотрудник кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, ответственный секретарь журнала «Онтогенез»

Баклушинская И.Ю.

д.б.н., ведущий научный сотрудник Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, член Научного совета РАН по биологии развития, заместитель главного редактора журнала «Онтогенез»

Воронежская Е.Е.

д.б.н., заведующий лабораторией Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, член Научного совета РАН по биологии развития

Голиченков В.А.

д.б.н., проф., профессор кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, член Научного совета РАН по биологии развития

Костюченко Р.П.

к.б.н., заведующий кафедрой эмбриологии биологического факультета СПбГУ, член Научного совета РАН по биологии развития

Озернюк Н.Д.

д.б.н., проф., заведующий лабораторией Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, член Научного совета РАН по биологии развития

Шарова Н.П.

д.б.н., заместитель директора Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, заведующий лабораторией Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Юшин В.В.

чл.-кор. РАН, заведующий лабораторией Института биологии моря ДВНЦ РАН, член Научного совета РАН по биологии развития

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ КОНФЕРЕНЦИИ

Васильев А.В., председатель

чл.-кор. РАН, директор Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, заведующий кафедрой эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, председатель Научного совета РАН по биологии развития

Никишин Д.А., ответственный секретарь

к.б.н., доцент кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, старший научный сотрудник Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ученый секретарь Научного совета РАН по биологии развития, председатель Совета молодых ученых ИБР РАН

Алёшина Н.М.

старший лаборант Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, член Совета молодых ученых ИБР РАН

Волина Е.В.

к.б.н., руководитель научно-организационного отдела Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Данилов М.Л.

инженер информационно-аналитического отдела Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Захаров И.С.

д.б.н., председатель ученого совета Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, заведующий лабораторией Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, член Научного совета РАН по биологии развития

Зубарев А.Д.

системный администратор Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Калабушева Е.П.

к.б.н., научный сотрудник Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, член Совета молодых ученых ИБР РАН

Краус Ю.А.

д.б.н., заведующий лабораторией Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ведущий научный сотрудник кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, ответственный секретарь журнала «Онтогенез»

Кремнёв С.В.

к.б.н., старший научный сотрудник кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, старший научный сотрудник Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Ожерельев В.В.

заместитель директора Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Хабарова М.Ю.

к.б.н., доц., ученый секретарь Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Цитрина А.А.

к.б.н., научный сотрудник Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, член Совета молодых ученых ИБР РАН

12 октября

УТРЕННЕЕ ЗАСЕДАНИЕ

10:00-10:30	Краус Ю.А. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва) Вступительное слово
10:30-11:00	Дашинимаев Э.Б. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва) Системы трансактиваии на основе CRISPR/dCas9, опыт применения для репрограммирования клеток человека
11:00-11:15	Ганцова Е.А. (Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия) Анализ развития преимплантационных эмбрионов мышей, нокаутных по гену <i>insrr</i>
11:15-11:30	Шитиков А.Д. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Неканоническая роль серотонина в мужской репродуктивной системе млекопитающих
11:30-11:45	Мун В.В. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Разработка методики оценки функциональной активности СПК в условиях <i>in vivo</i>
11:45-12:00	КОФЕ-БРЕЙК
12:00-12:15	Усик М.А. (Государственный научный центр РФ - Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия) Состояние цитоскелета и эпигенетические события в яичниках <i>Drosophila melanogaster</i> , полный цикл гаметогенеза которых происходил в условиях моделируемой микрогравитации
12:15-12:30	Добрынин М.А. (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия) Влияние инактивации транскрипции тандемно повторяющейся перицентромерной ДНК на формирование безмембранных структур в созревающих ооцитах человека
12:30-12:45	Башенджиева Е.О. (Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия) Распределение белка MVN в фолликулах яичника мыши
12:45-13:00	Алёшина Н.М. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) Функциональная организация серотонинергической системы в яичнике млекопитающих
13:00-13:15	Гусева А.А. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Системное воздействие флуоксетина на морфофункциональный статус яичника мыши

ПЕРЕРЫВ

14:30-15:30 Стендовая сессия.

12 октября

ВЕЧЕРНЕЕ ЗАСЕДАНИЕ

15:30-16:15	Васильева Д.А. (ООО «ИнтерЛабСервис») RCM – инновационная технология в конфокальной микроскопии
16:15-16:45	Котов А.А. (Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" - Институт молекулярной генетики РАН, Москва) Участие piРНК-пути в видообразовании и репродуктивной изоляции у <i>Drosophila melanogaster</i>
16:45-17:00	Миляева П.А. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Роль компонентов системы piРНК-интерференции в регуляции ретротранспозонов в соматических тканях <i>D. melanogaster</i> на разных стадиях онтогенеза
17:00-17:15	Адашев В.Е. (Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" - Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия) Vasa-опосредованная регуляция генетических элементов в поддержании гаметогенеза <i>Drosophila melanogaster</i>
17:15-17:30	КОФЕ-БРЕЙК
17:30-17:45	Головнина А.А. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Исследование интерактома ДНК-связывающих факторов, участвующих в привлечении репрессоров группы Polycomb на хроматин
17:45-18:00	Тамбовцева В.Г. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) Эволюция смешанной системы определения пола у ракообразных <i>Daphnia magna</i>: локализация детерминант определения пола
18:00-18:15	Маслаков Г.П. (Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия) РНК матрицы Нох-генов в ооцитах - транскрипционный шум или специфичная экспрессия?

Расширьте свой взгляд на живые и просветленные образцы



ZEISS Lightsheet 7

Откройте для себя уникальную систему микроскопии плоскостного освещения для многоканальной визуализации живых и просветленных образцов. Lightsheet 7 гибок, надежен и прост в использовании. Новые аксессуары и программное обеспечение помогут создавать изображения действительно крупных объектов, – например, мозг мыши целиком.

zeiss.com/lightsheet



Seeing beyond

13 октября

УТРЕННЕЕ ЗАСЕДАНИЕ

10:00-10:30	Ульянов С.В. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва) Топология хроматина как фактор регуляции транскрипции: наблюдения в локусе кератиновых генов человека
10:30-10:45	Галиакберова А.А. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Модель дифференцировки нейронов из ИПСК человека, экспрессирующих кальциевый индикатор GCaMP6s, для исследования нейрофизиологических процессов
10:45-11:00	Трошев Д.В. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) Разработка метода получения фракции дофаминергических нейронов для молекулярно-биологических исследований
11:00-11:15	Рогинская А.И. (Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия) Действие фебрильных судорог на возрастную динамику экспрессии астроглиальных белков в мозге крыс
11:15-11:30	Игнатюк В.М. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) Нарушения формирования афферентной иннервации ГРГ-нейронов крыс при системном воспалении, вызванном липополисахаридом (<i>E. coli</i>), и их коррекция IgG
11:30-11:45	КОФЕ-БРЕЙК
11:45-12:00	Докшин П.М. (Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия) Поиск молекулярных мишеней, вовлеченных в регенеративный ответ при инфаркте миокарда, в мезенхимных клетках сердца с применением транскриптомного анализа
12:00-12:15	Карпов Н.С. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Протеасомы тонкого кишечника крысы в раннем онтогенезе
12:15-12:30	Адамейко К.И. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) Роль ферритина в морфогенетических процессах губок
12:30-12:45	Межеричкий М.И. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) Влияние полета на фонотаксис, вызванный призывным сигналом самца, у двупятнистого сверчка: роль серотонина
12:45-13:00	Малыгина Т.О. (ООО «Лакопа») Миниатюризация дозирования для анализа геномов единичных клеток

ПЕРЕРЫВ

14:30-15:30 Стендовая сессия.

13 октября

ВЕЧЕРНЕЕ ЗАСЕДАНИЕ

15:30-16:15	Гусихина О.И. (ООО «Биолайн») Новейшие технологии оптической микроскопии в биологии развития
16:15-16:45	Лавров А.И. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва) Клеточные и молекулярные механизмы реагрегации клеток и восстановления исходной организации у губки <i>Halisarca dujardini</i>
16:45-17:00	Арасланова К.Р. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Исследование возможности восстановления способности к регенерации у головастиков <i>Xenopus laevis</i> путем искусственной оверэкспрессии генов семейств Agg и Ras-dva
17:00-17:15	Бредов Д.В. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Пространственная неоднородность движений эпителиальных клеток как источник локальных деформаций ткани в гастрюляции <i>Xenopus laevis</i>
17:15-17:30	Петри Н.Д. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Молекулярно-морфологический анализ формирования лево-правого организатора у <i>Xenopus laevis</i>
17:30-17:45	КОФЕ-БРЕЙК
17:45-18:00	Евнукова Е.А. (Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия) Новые данные о нейруляции у представителей <i>Cypriniformes</i> и <i>Salmoniformes</i>
18:00-18:15	Кондакова Е.А. (Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия) Развитие уникальной провизорной структуры – липидного мешка и пищеварительной системы пелагических личинок пятнистого лептоклинуса <i>Leptoclinus maculatus</i> , обитающего в акватории о. Западный Шпицберген
18:15-18:30	Бабина П.В. (Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия) Развитие и морфологическая организация щитовидной железы в эмбриогенезе и постэмбриогенезе <i>Coregonidae</i> . Сравнительное исследование



группа компаний

Компания «БиоЛайн» предлагает комплексные решения для научных исследований методами микроскопии, гистологии, иммуногистохимии и проточной цитометрии.



Имиджеры **Leica THUNDER** с технологией программной очистки

Имиджеры нового поколения Leica THUNDER

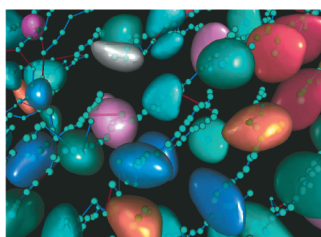
позволяют практически мгновенно получать высококачественные изображения за счет использования высокоскоростных компонентов для флуоресценции, быстрой камеры, полной моторизации системы и простого в использовании программного обеспечения для панорамного 3D сканирования.

Программная очистка сигнала

— это эффективная технология разделения сигнала и шума за счет наличия в программе информации о параметрах устройства и свойствах исследуемого объекта.

Данный метод позволяет визуализировать структуры объекта, недоступные ранее широкопольной микроскопии. Полученный результат поражает своей детализированностью.

Программное обеспечение Leica AIVIA



упрощает анализ изображений за счет использования технологий искусственного интеллекта и машинного обучения.

AIVIA позволяет проводить анализ различных объектов:

- качественный и количественный анализ клеточных культур
- исследования пролиферации клеток и wound-healing
- трекинг клеток
- анализ сфероидов
- сегментация тканей
- анализ нейронов

Авторизованный дистрибьютор Leica Microsystems (Германия) в России – компания «БиоЛайн»



ООО «БиоЛайн»
197022, Россия, Санкт-Петербург
ул. Проф. Попова, д. 23, лит. Е
тел.: +7 (812) 320 49 49
факс: +7 (812) 320 49 40
e-mail: main@bioline.ru,
www.bioline.ru

Москва, тел.: +7 (800) 555 49 40
Новосибирск, тел.: +7 (383) 227 09 63
Екатеринбург, тел.: +7 (343) 287 32 49
Н. Новгород, тел.: +7 (831) 278 61 47
Ростов-на-Дону, тел.: +7 (863) 268 99 32
Казань, тел.: +7 (843) 570 66 88
Хабаровск, тел.: +7 (4212) 474 767



14 октября

УТРЕННЕЕ ЗАСЕДАНИЕ

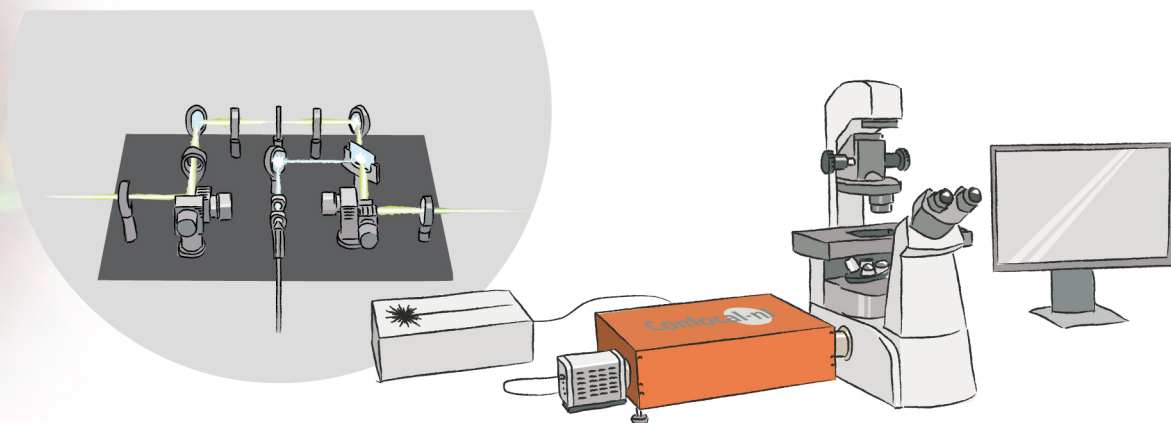
10:00-10:30	Козин В.В. (Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург) Становление осей симметрии в раннем развитии аннелид (на примере представителей <i>Errantia</i> , <i>Sedentaria</i> и <i>Clitellata</i>)
10:30-10:45	Полюшкевич Л.О. (Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия) Анализ экспрессии генов сигнального пути Hedgehog у нереидной полихеты <i>Platynereis dumerilii</i>
10:45-11:00	Шалаева А.Ю. (Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия) Активация клеточных источников регенерации сигнальным путём FGF в ответ на ампутацию сегментов у полихеты <i>Alitta virens</i>
11:00-11:15	Карасева Н.П. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Развитие мышечной системы показывает отсутствие строгой последовательности закладки сегментов сзади наперед в связи с гетерономным строением у погонофоры <i>Siboglinum fiordicum</i>
11:15-11:30	КОФЕ-БРЕЙК
11:30-11:45	Ветрова А.А. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) От аполярной гастрюлы к поляризованной личинке: эмбриональное развитие гидроидного полипа <i>Dynamena pumila</i>
11:45-12:00	Скоренцева К.В. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Регенерация известковой губки <i>Leucosolenia variabilis</i> : динамика процесса, трансформации клеток, вклад актинового цитоскелета
12:00-12:15	Мельников Н.П. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) Сравнительный анализ клеточной пролиферации, миграции и смерти в интактных тканях губок
12:15-12:30	Борисенко И.Е. (Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия) Дифференциальная экспрессия генов в регенерации губок классов <i>Demospongiae</i> и <i>Calcarea</i>
12:30-13:15	Акимов Н. (ООО «Карл Цейсс») Микроскопия плоскостного освещения: трехмерная визуализация крупных биологических объектов

ПЕРЕРЫВ

15:00 ТОРЖЕСТВЕННОЕ ЗАСЕДАНИЕ УЧЕНОГО СОВЕТА ИБР РАН
НАГРАЖДЕНИЕ ПРИЗЕРОВ

RCM: ДОСТУПНАЯ МИКРОСКОПИЯ ВЫСОКИХ РАЗРЕШЕНИЙ

RCM, или ресканирующая конфокальная микроскопия - простая и надежная технология высокого оптического разрешения, которая основана на параллельном получении основного изображения и его рескана на длинной экспозиции с передачей сигнала непосредственно на ПЗС-матрицу камеры. Новый принцип получения изображения позволяет существенно снизить шумы и артефакты, получаемые при использовании классических конфокальных систем.



ОДНО ИЗ ЛУЧШИХ СООТНОШЕНИЙ «СИГНАЛ-ШУМ»

До 95% квантовой эффективности и четырехкратного улучшения соотношения «сигнал-шум» по сравнению с классическими схемами конфокальной микроскопии

УЛУЧШЕННОЕ ЛАТЕРАЛЬНОЕ РАЗРЕШЕНИЕ

С помощью RCM возможно достижение латерального разрешения до 170 нм, а при использовании программной деконволюции - до 120 нм

ПРОСТОТА И НАДЕЖНОСТЬ

Уникальный дизайн RCM системы делает ее простой в работе и менее прихотливой к окружающим воздействиям, позволяя быстро получать изображения на пределе оптического разрешения

ОТКРЫТАЯ И ДОСТУПНАЯ СИСТЕМА

RCM совместима с микроскопами, камерами и лазерами всех популярных производителей, роботизация - достаточно только по оси Z. Доступная модификация вашей системы микроскопии до системы высокого разрешения



СПИСОК ПОСТЕРНЫХ ДОКЛАДОВ:

1. **Акишина А.А.** (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) **Сравнительный анализ индуцибельной экспрессии генов семейства CYP1 в культурах клеток остеогенной саркомы человека**
2. **Антонов Д.О.** (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) **Сравнительный анализ и оптимизация протоколов, используемых для создания макрофагов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека**
3. **Ахметова М.Ж.** (Медицинский университет Караганды, Караганда, Казахстан) **Влияние серотонина на длительность сокращения миокарда у крысят с дефицитом серотонина в эмбриональном периоде**
4. **Базылев С.С.** (Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" - Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия) **Поиск и идентификация белок-кодирующих генов-мишеней рiРНК-сайленсинга в гонадах *Drosophila melanogaster***
5. **Богданов В.В.** (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) **Поиск биомаркеров досимптомной стадии болезни Паркинсона в слезной жидкости**
6. **Богомолов А.И.** (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) **Участие внутриклеточного серотонина в морфогенетических движениях при гастрюляции *Lymnaea stagnalis***
7. **Ветрова А.А.** (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) **Экспрессия гена *Dlx* сопровождает активные морфогенезы во всех частях колонии гидроидного полипа *Dypatena pumila***
8. **Заботин Я.И.** (Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия) **Спермиогенез ацеломорф и плоских червей: новые примеры рекапитуляции предковых признаков**
9. **Иванова А.Д.** (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) **Проблема эффективности преимплантационного генетического скрининга эмбрионов**
10. **Колегова П.И.** (Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия) **Отсроченное влияние неонатальных фебрильных судорог на экспрессию генов метаболитных рецепторов глутамата в гиппокампе крыс**
11. **Кремнёв С.В.** (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) **Разнообразие фенотипов гонофоров у генетически полиморфных гидроидов *Sarsia lovenii* (Hydrozoa: Corynidae) из Белого моря**
12. **Куваева Е.Е.** (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) **Изучение специфической экспрессии гена *tth D. melanogaster* с помощью флуоресцентных репортеров в двухкомпонентной системе UAS/Gal4**
13. **Мартюшева А.С.** (Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия) **Влияние пренатального стресса на поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»**
14. **Молочкова Ю.И.** (Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия) **Морфогенетические аспекты формирования адгезивных поверхностей животных**
15. **Паршина Е.А.** (Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия) **Роль цитоскелетного белка Zyxin в регуляции экспрессии генов ядерных рецепторов ретиноевой кислоты *rarg* и *rxrg* в**

эмбриональном развитии шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*)

16. Петрова М.А. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) **Раннее эмбриональное развитие морского паука *Phoxichilidium femoratum* (Rathke, 1799)**
17. Платова С.Е. (Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия) **Сигнальный путь Hedgehog в постларвальном развитии и регенерации аннелиды *Pygospio elegans* (Spionidae)**
18. Почетная П.А. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия) **Исследование активности семиспиральных рецепторов в клетках гранулы мышцы с применением генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров**
19. Ратмиров А.М. (Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия) **Кооперативные эффекты экспрессии генов-регуляторов нейрогенеза и апоптоза при формировании пространственной памяти у крыс**
20. Рожкова Д.Н. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) **Первые результаты анализа полногеномных данных балобана *Falco cherrug* Gray, 1834 и кречета *Falco rusticolus* L., 1758**
21. Рябинин А.А. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) **Дифференцировка ИПСК человека в эпидермальном и дермальном направлении в рамках получения эквивалентов кожи и ее дериватов**
22. Сербина О.О. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) **МСК влияют на реорганизацию внеклеточного матрикса и развитие фиброза при лице-лопаточно-плечевой мышечной дистрофии**
23. Соколов Р.А. (Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского) **Спонтанная кальциевая активность определяется сетевой биоэлектрической активностью во время развития первичных культур гиппокампа мыши**
24. Субботина А.Ю. (Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия) **Влияние пренатального стресса на цитокиновый профиль крыс разного пола и возраста**
25. Сухинич К.К. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) **Развитие 3D церебральных агрегатов в желудочках мозга взрослых мышей**
26. Терпугова Н.Ю. (Астраханский государственный технический университет, Астрахань, Россия) **Развитие мезонефроса у ранних личинок воблы *Rutilus rutilus caspicus***
27. Тихомирова М.А. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) **Tat белок вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) влияет на экспрессию генов в культивируемых В-клетках: к вопросу о механизмах онкогенеза у ВИЧ-инфицированных пациентов**
28. Труфанова Е.В. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) **Влияние VAS2870 на кальциевый сигнал одиночных клеток**
29. Тухбатуллин А.Р. (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия) **Филогеография обыкновенного слепыша (*Spalax microphthalmus*) на основании изменчивости маркеров митохондриальной ДНК**
30. Тухбатуллина Т.Р. (Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия) **Возникновение эмбриональных аномалий несинантропных млекопитающих урбанизированных территорий г. Екатеринбурга**
31. Храмова Ю.В. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва,

Россия) **Участие сигнального каскада Hippo в ранних стадия оогенеза млекопитающих**

32. Черкашина О.Л. (*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*) **Моделирование регенерации кожи и волосяных фолликулов человека в полнослойном ксенотрансплантате**

33. Шевалье Д.А. (*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*) **Возможность дифференцировки клеток миелоидной линии под воздействием IL-6, LPS и BCG *in vitro***

34. Шмарев А.Н. (*ФИЦ "Пушинский научный центр биологических исследований РАН" - Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Россия*) **Отношение красного света к дальнему красному влияет на активность фотосинтетического аппарата растений салата при облучении светом высокой интенсивности**

**Vasa-опосредованная регуляция генетических элементов в поддержании гаметогенеза
*Drosophila melanogaster***

В.Е. Адашев*¹, А.А. Котов¹, С.С. Базылев¹, О.М. Оленкина¹, А.С. Шацких¹, Л.В. Оленина¹

¹ Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" - Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

* *adashev.vladimir@gmail.com*

Поддержание целостности генома в процессе гаметогенеза является одним из ключевых процессов в ходе полового размножения. Существует ряд герминальных маркёров, которые обнаруживаются в половых клетках и являются консервативными у широкого круга животных. Одним из таких маркёров является белок Vasa, или DDX4, его гомологи обнаруживаются от круглых червей до человека. Vasa является РНК-хеликазой, при нарушении её экспрессии наблюдаются различные дефекты в работе репродуктивных систем, в результате которых снижается фертильность. У *Drosophila* Vasa выполняет функции в ремоделинге РНП-комплексов, а также в piРНК-опосредованной регуляции активности различных генетических элементов. В онтогенезе она необходима для нормальной закладки и формирования гонад и поддержания и развития в них половых клеток. Несмотря на необходимость Vasa для целого ряда процессов гаметогенеза, молекулярные аспекты функционирования Vasa остаются невыясненными.

Для изучения роли Vasa нами были получены мухи с гетероаллельными комбинациями мутаций, нарушающих ее экспрессию. Нами было показано, что на фоне этих мутаций у самцов *Drosophila* происходит быстрое и резкое падение количества герминальных стволовых клеток (ГСК). Мы показали, что на фоне различных сочетаний мутаций *vasa* происходит значительное снижение фертильности самцов *Drosophila*. В результате создания, секвенирования и анализа RIP-seq библиотек из семенников и яичников *Drosophila* мы показали, что основной мРНК-мишенью Vasa является *rhino*. Функцией белкового продукта этого гена является регуляция транскрипции piРНК-предшественников в ядрах герминальных клеток. У самцов мух, несущих мутации гена *rhino*, обнаруживаются сходные нарушения гаметогенеза с мухами, несущими мутации в гене *vasa*, такие как снижение количества ГСК вплоть до полной их потери и снижение фертильности. Среди общих мРНК-мишеней для самцов и самок *Drosophila* также обнаруживается транскрипт гена *aubergine*, трансляция которого нарушается на фоне мутаций *vasa*. Функцией белка Aubergine является поддержание работы piРНК-системы.

Таким образом, мы выявили, что РНК-хеликаза Vasa имеет дополнительные функции в герминальных клетках *D. melanogaster*, как в поддержании ГСК, так и в функционировании piРНК-системы как в яичниках, так и в семенниках.

Исследование поддержано грантом РФФИ №20-04-00562 А

**Сравнительный анализ индуцибельной экспрессии генов семейства CYP1 в культурах
клеток остеогенной саркомы человека**

А.А. Акишина*¹, Р.О. Черезов¹, О.Б. Симонова¹, Ю.Е. Воронцова¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* *ilitiri@bk.ru*

Ферменты системы цитохрома р450 (СYP) участвуют в метаболизме гормонов и лекарственных соединений. Известно, что для многих опухолевых клеток характерно изменение соотношения различных изоформ СYP и их индуцибельности по сравнению с неопухолевыми, что может сильно влиять на эффективность лечения противоопухолевыми препаратами.

Лиганд-опосредованная активация ряда генов семейства CYP1 зависит от рецептора AHR (Aryl hydrocarbon receptor), который связан с детоксикацией лекарственных соединений и канцерогенезом. Попадая в цитоплазму клетки, лиганд взаимодействует с AHR, который далее перемещается в ядро, где вместе с ARNT (AHR Nuclear Translocator) формирует транскрипционный комплекс для активации CYP1.

Поскольку предварительный анализ показал высокую концентрацию AHR в культурах клеток остеогенной саркомы по сравнению с нормальными и другими опухолевыми клетками, мы решили провести сравнительный анализ уровня экспрессии *AHR*, *ARNT* и генов-мишеней AHR (*Cyp1A1*, *Cyp1A2*, *Cyp1B*). Для активации AHR использовали его известные лиганды: индирубин, бета-нафтофлавоин и индол-3-карбинол.

Нами были проанализированы самостоятельно полученные три первичные культуры остеогенной саркомы (O.src25/16, O.src17/18, O.src20/18) и четыре коллекционные клеточные линии (MG63, HOS, SAOS2 и U2OS).

После воздействия лигандами экспрессия генов-мишеней AHR повышалась с разной интенсивностью, при этом их индуцибельность в первичных культурах, при воздействии лигандов, была выше. Самым чувствительным к воздействию лигандов, как в первичных, так и в коллекционных клеточных линиях оказался ген *Cyp1A1*. Интересно, что гены-мишени одного семейства CYP1, по-разному реагировали на воздействие лиганда в пределах одной культуры клеток. Также была различна интенсивность активации одного и того же гена разными лигандами.

В целом, мы показали, что в первичных культурах клеток остеосаркомы AHR функционально активен как лиганд-зависимый транскрипционный фактор генов-мишеней семейства CYP1, тогда как, только в двух (MG63 и HOS) из четырех коллекционных линий сигнальный путь AHR/CYP работает правильно. В клетках линий MG63 и HOS, по сравнению с SAOS2 и U2OS, была наибольшая концентрация AHR и положительная индуцибельная экспрессия хотя бы одного из генов CYP1. Мы отметили, что морфологически клетки культур MG63 и HOS были наиболее близки к первичным культурам остеогенных сарком.

В клетках линии SAOS2 концентрация белка AHR была низкая, а в U2OS он отсутствовал совсем, и индукцию экспрессии CYP1 в ответ на действие лигандов в них не наблюдали. Мы полагаем, что линию U2OS можно использовать как линию с потерей функции белка AHR, например, в негативных контрольных экспериментах по исследованию функций этого рецептора.

Мы считаем, что изучение особенностей сигнального пути AHR/CYP в культурах клеток остеосарком приблизит нас к пониманию молекулярного механизма агрессивного течения данного типа злокачественных опухолей, и, возможно, откроет новые направления его терапии.

Выполнено в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2021 года № 0088-2021-0007 "Молекулярно-генетические механизмы регуляции клеточной дифференцировки и морфогенеза".

Функциональная организация локальной серотонинергической системы в яичнике млекопитающих

Н.М. Алёшина*¹, Д.А. Никишин¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* *ninalyoshina@gmail.com*

Серотонин – локальный регулятор функциональной активности яичника млекопитающих, который влияет на процесс созревания ооцитов, сопутствующий синтез стероидных гормонов и овуляцию. При этом функциональная организация серотонинергической системы (синтез, захват при помощи транспортера SERT, метаболизм) в яичнике остается неизученной. Мы показали, что при инкубации фрагментов ткани яичника на этом сроке с добавлением предшественника серотонина (5-гидрокситриптофан, 10 мкМ) собственного синтеза серотонина не происходит. В то же время при добавлении в культуральную среду серотонина (1 мкМ) его накопление наиболее выражено

происходит в ооцитах растущих фолликулов. Накопление в ооцитах отменяется действием селективного ингибитора обратного захвата серотонина (флуоксетин, 1 мкМ), в то время как ингибитор неселективного ОСТ/PMAT-опосредованного полиспецифичного транспорта биогенных аминов (дециниум-22, 1 мкМ) не демонстрирует такого эффекта. Это говорит о том, что накопление серотонина в ооцитах специфично и осуществляется именно за счет активности мембранного транспортера серотонина SERT.

Основной мишенью серотонина в яичнике, по всей видимости, являются ооциты растущих фолликулов, а основным источником - захват из внеклеточной среды при помощи транспортера SERT. Интересно, что при ингибировании моноаминоксидазы А (паргилин, 10 мкМ), которая выполняет функцию катаболизма серотонина, его уровень накопления увеличивается в фолликулярных клетках теки и гранулезы, но не в ооцитах. Таким образом, захват серотонина в фолликулярных клетках также возможен, однако его накопления не происходит из-за катаболической функции моноаминоксидазы А. Известно, что во время овуляции уровень серотонина в яичнике повышается, а сам серотонин может влиять на созревание ооцитов. Таким образом, клетки теки и гранулезы, входящие в состав гемато-овариального (гемато-фолликулярного) барьера, могут играть роль некоего «фильтра», который ограничивает попадание серотонина в ооцит растущего фолликула, что предотвращает его преждевременное созревание.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2020 года № 0108-2019-0003 и при финансовой поддержке грантов РФФИ №20-04-00303 и гранта Президента РФ МК-931.2020.4.

Сравнительный анализ и оптимизация протоколов, используемых для создания макрофагов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

Д.О. Антонов^{*1,2}, Т.А. Ненашева², А.В. Клепикова³, А.В. Федотова³, М.А. Ежова³, Н.Е. Макарова³, Е.С. Глаголева³, И.В. Лядова²

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

³ Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

* antonovdanya54@gmail.com

Генерация макрофагов (иМф) из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) представляет собой новый и многообещающий подход к изучению биологии макрофагов. Принципы создания иМф основаны на поэтапной дифференцировке иПСК, включающей стадии образования мезодермы, гемогенного эндотелия, гематопозитических предшественников и моноцитоподобных клеток. Однако существующие протоколы очень разнообразны, что поднимает вопросы об идентичности конечных популяций иМф и требует стандартизации протоколов.

Целью исследования было сравнение траекторий дифференциации и свойств иМф, созданных с использованием двух протоколов, EB-S и 2D-F. иПСК: иМф были дифференцированы из линий иПСК, полученных из человеческих мононуклеаров периферической крови (линия K7-4Lf, любезно предоставленная для исследований Григорьевой Е. В.). Протокол EB-S: иПСК культивировали в условиях низкой адгезии, что приводило к образованию эмбрионидных телец (ЭТ); эндогенные цитокины и факторы роста, продуцируемые ЭТ, способствуют дифференцировке клеток в различных направлениях, включая мезодерму. Для гематопозитической и миелоидной дифференцировки ЭТ культивировали в присутствии IL-3 и M-CSF. Протокол 2D-F: иПСК культивировали на матригеле в условиях гипоксии в присутствии факторов, индуцирующих образование мезодермы без образования ЭТ. Гематопозитическая и миелоидная стадии запускались последовательно путем добавления различных смесей факторов, индуцирующих гемопоз и миелоидную дифференцировку. Сравнение

протоколов проводили с использованием проточной цитометрии, и мультиплексного анализа, а также РНК-секвенирования (RNAseq) и последующего биоинформатического анализа.

Получены следующие результаты. 1. иМф в обоих протоколах имели схожий фенотип: CD14+ CD45+ CD11b+ CD115+ CD64+ CD16+/low. 2. иМф, полученные по протоколу EB-S (EB-S-иМф) секретировали провоспалительные цитокины на более высоком уровне по сравнению с иМф из протокола 2D-F (2D-F-иМф) 3. EB-S-иМф и 2D-F-иМф имели в целом сходный транскриптомный профиль, однако различались по экспрессии генов, ассоциированных с иммунным ответом, воспалением и метаболизмом липидов.

Таким образом, иМф, созданные с использованием протоколов EB-S и 2D-F, демонстрируют общие фенотипические, функциональные и транскриптомные характеристики. Однако клетки отличаются по уровню экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом липидов (выше в 2D-F-иМф) и воспалением, а также по уровню секреции ряда провоспалительных цитокинов (выше в EB-S-иМф). В целом, использование разных протоколов приводит к образованию клеток, обладающих основными характеристиками макрофагов, но имеющих тонкие транскриптомные различия.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-75-90176.

Исследование возможности восстановления способности к регенерации у головастиков *Xenopus laevis* путем искусственной оверэкспрессии генов семейств *Ag1* и *Ras-dva*

К.Р. Арасланова*¹, А.С. Иванова², М.Б. Терёшина²

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

* araslanova.k.r@yandex.ru

Гены семейства дисульфидизомераз *Ag1* и гены семейства малых ГТФ-аз *Ras-dva* являются важными регуляторами не только эмбриогенеза, но процессов регенерации. При подавлении экспрессии этих генов наблюдается снижение способности к регенерации придатков тела у модельных объектов *X. laevis* и *D. rerio*. Показано, что некоторые ключевые гены из этих семейств (*Ag1*, *Ras-dva1* и *Ras-dva2*) были потеряны в ходе эволюции позвоночных. Существует гипотеза о взаимосвязи между отсутствием этих генов у амниот и их пониженной способностью к регенерации.

Известно, что головастики *X. laevis* теряют способность к регенерации хвоста в особый рефрактерный период (refractory period – RP) – промежуток между 46-47 и 51 стадией. Если ампутация части хвоста производится в RP, то экспрессия *Ras-dva* и *Ag1* оказывается значительно ниже, чем при проведении ампутации до или после него. В ходе изучения роли этих генов в процессе регенерации были проведены эксперименты по восстановлению регенерации в RP путем достижения их оверэкспрессии с помощью введения мРНК этих генов. Инъекции мРНК генов *Ras-dva*, *Ag1* и *Ag1* проводились на стадии 2-4 бластомеров, после чего зародыши развивались до 46 стадии, когда производили ампутацию части хвоста. Контролем служили эмбрионы, которым на этой же стадии инъецировали раствор, не содержащий мРНК. На 1, 2 и 4 день после ампутации у опытных и контрольных головастиков фиксировали площадь регенерировавшей ткани и количество митозов. Согласно полученным из многократных экспериментов данным, в опытных образцах эти характеристики были выше, чем в контроле. Также был выполнен анализ экспрессии генов-маркеров регенерации (*Msx1b*, *Fgf20*, *Wnt5a*) методом qRT-PCR. Было выявлено, что их экспрессия повышалась в образцах с оверэкспрессией *Ras-dva* и *Ag1*, что свидетельствует о запуске молекулярных каскадов, свойственных для регенерации.

Результаты работы показывают потенциальную возможность восстанавливать способность к регенерации путем искусственной оверэкспрессии генов семейств *Ras-dva* и *Ag1*. Есть основания полагать, что одной из причин, вызывающих снижение регенерации у головастиков, – падение уровня экспрессии этих генов в RP. Данное предположение согласуется с гипотезой об отсутствии способности

к полной эпиморфной регенерации у большинства амниот вследствие потери данных генов в ходе эволюции. В дальнейшем предполагается изучение влияния белковых продуктов генов Agg на увеличение способности к регенерации у амниот.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ номер 20-34-70058 "Стабильность".

Влияние серотонина на длительность сокращения миокарда у крысят с дефицитом серотонина в эмбриональном периоде

М.Ж. Ахметова*^{1,2}, Р.Р. Нигматуллина³, Ф.А. Миндубаева¹

¹ Медицинский университет Караганды, Караганда, Казахстан;

² Карагандинский университет им. академика Е.А. Букетова, Караганда, Казахстан;

³ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

* *meruzhan2@mail.ru*

Серотонин (5-НТ), является моноаминовым нейромедиатором и гормоном, который проявляет свои разнообразные действия, связываясь с рецепторами клеточной мембраны. Рецепторы 5-НТ_{2B} активно участвуют в эмбриональном морфогенезе и регулируют развитие сердца. 5-НТ₄ и 5-НТ_{2B} регулируют сократимость миокарда и влияют на временные параметры сокращения. Парахлорфенилаланин (PCPA) используется в качестве средства для снижения уровня серотонина. Установлено, что PCPA влияет на истощение 5-НТ, ингибируя биосинтез этого моноамина, возможно, блокируя гидроксирование триптофана. Блокада захвата предшественника аминокислоты также способствует снижению биосинтеза 5-НТ.

Цель работы - исследовать влияние блокады синтеза серотонина в эмбриональном периоде онтогенеза на время сокращения миокарда у крысят 7-дневного возраста. Исследования проводились в научной лаборатории кафедры нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета. Беременным самкам, начиная с 11 дня беременности в течение 10 дней, внутривентриально вводили: 1 группа (контроль) – физиологический раствор; 2 группа – блокатор синтеза серотонина PCPA в дозе 100 мкг/кг. Оценивали реакции длительности сокращения полосок миокарда правого желудочка на серотонин в последовательных концентрациях 0,1 мМ, 1,0 мМ и 10,0 мМ. Проводили статистическую обработку с определением M, m и δ; достоверность различий рассчитывали по t-критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при p<0,05.

В экспериментальной группе с блокадой синтеза серотонина наблюдается статистически значимое увеличение времени сокращения по сравнению с группой контроля. Так, на максимальную концентрацию 5-НТ время сокращения выше на 10%; на концентрацию 1 мМ выше на 8%. Вероятно, угнетение синтеза серотонина в эмбриональном периоде вызывает структурные перестройки кальциевых каналов, недостаточное их формирование. Возможно снижение чувствительности серотониновых рецепторов, уменьшение количества кальциевых каналов как на мембране кардиомиоцитов, так и на поверхности саркоплазматического ретикулума, что выражается значительно низким ответом кардиомиоцитов на серотонин по сравнению с контрольной группой. Установлена взаимосвязь между уровнем серотонина в эмбриональном периоде онтогенеза и функционированием Ca²⁺ каналов мембраны кардиомиоцитов и саркоплазматического ретикулума у новорожденных крысят.

Наше исследование показывает, что изменение концентрации серотонина в пренатальном онтогенезе приводит к снижению инотропной функции кардиомиоцитов в раннем постнатальном онтогенезе, что обусловлено увеличением времени сокращения миокарда правого желудочка у крысят, развивавшихся в условиях дефицита серотонина.

Эта работа была поддержана грантовым финансированием по научному проекту: «Клинико-физиологическое обоснование способа ранней диагностики легочной гипертензии у детей грудного возраста» АР05136034-2018/2020.

Развитие и морфологическая организация щитовидной железы в эмбриогенезе и постэмбриогенезе Coregonidae. Сравнительное исследование

П.В. Бабина*¹, Е.А. Кондакова^{1,2}, В.А. Богданова²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

² Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии - «ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга», Санкт-Петербург, Россия

* *p.bbn@mail.ru*

В процессах эмбрионального и постэмбрионального развития гормоны щитовидной железы (ЩЖ) выполняют ряд важнейших регуляторных функций. До определенной стадии зародыши позвоночных зависят от запаса материнских гормонов ЩЖ. Относительное время начала синтеза собственных гормонов ЩЖ у костистых рыб существенно различается. Нами было проведено сравнительное исследование организации ЩЖ на эмбриональных и личиночных стадиях у сиговых рыб (ценных объектов холодноводной аквакультуры), а именно: *Coregonus nasus*, *Coregonus peled*, их гибрида (пелчира), *Coregonus muksun*, *Coregonus lavaretus*, *Stenodus leucichthys nelma*, и гибрида пеляди и нельмы (пелнелма).

Материал фиксировали жидкостью Буэна. Серийные парафиновые срезы толщиной 6 мкм были окрашены гематоксилином Карацци и эозином. Были измерены большой и малый диаметры фолликулов и высота тиреоцитов. Для оценки различий использовали U-критерий Манна-Уитни ($P < 0.05$).

У представителей всех исследованных видов ЩЖ, представленная диффузно расположенными вдоль вентральной аорты фолликулами, появляется на поздних эмбриональных стадиях. Самые ранние стадии, на которых наблюдалось наличие фолликулов ЩЖ, были отмечены у гибрида пелнелма и волховского сига (130 дней после оплодотворения, дпо). Фолликулы, округлые или неправильной формы в зависимости от размера, расположены поодиночке, парами или тройками в тесной связи друг с другом, в коллоиде видны реабсорбционные пузырьки – признак функциональной активности ЩЖ. У всех исследованных видов на каждой стадии развития размеры фолликулов значительно варьируют. По количеству фолликулов на стадии вылупления исследованные виды можно разделить на две группы: у чира, пеляди и гибридов имеется по 3-4 фолликула, в отличие от них у муксуна, волховского сига и нельмы – по 12-13.

На исследованных стадиях линейные размеры фолликулов и тиреоцитов у сиговых изменяются незначительно. Статистически значимых различий в морфологических характеристиках фолликулов при попарных сравнениях разных видов на одной стадии и разных стадий представителей одного вида, внутри и между группами, выделяемыми по количеству фолликулов на стадии вылупления выявлено не было.

В ходе личиночного развития у *C. muksun* (с 0 дпв по 13-14 дпв), *C. lavaretus* (с 0 дпв по 22 дпв) и *C. nasus* (с 0 дпв по 24 дпв) значительно возросло среднее количество фолликулов. В период смешанного питания среднее количество фолликулов волховского сига (22 дпв) и чира (24 дпв) выравнивается ($28,2 \pm 2,4$ и $28,8 \pm 1,7$ соответственно).

Наши результаты указывают на наличие гетерохронии в развитии ЩЖ у данной группы рыб. Время появления первых фолликулов у разных видов отличалось, наиболее позднее формирование ЩЖ наблюдалось у *C. peled*. Можно предположить различный темп образования новых фолликулов, так как в течение личиночного периода прирост среднего количества фолликулов отличался, в частности, для *C. peled* и *C. nasus* и для *C. lavaretus* и *C. nasus*.

Работа выполнена в рамках проекта «ProjectKS 4058 - ARCTAQUA». Авторы благодарят РЦ РМИКТ СПбГУ.

**Поиск и идентификация белок-кодирующих генов-мишеней piРНК-сайленсинга в гонадах
*Drosophila melanogaster***

С.С. Базылев*¹, В.Е. Адашев¹, А.А. Котов¹, О.М. Оленкина¹, А.С. Шацких¹, Л.В. Оленина¹

¹ Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" - Институт молекулярной генетики
РАН, Москва, Россия

* bazylevser@gmail.com

piРНК-система имеет важное значение для поддержания стабильности генома и защиты от активности мобильных элементов в гонадах *Drosophila melanogaster*. Также известно, что в семенниках *D. melanogaster* активность этой системы может быть направлена на подавление экспрессии белок-кодирующих генов, одним из которых является ген *Stellate*. Однако, на данный момент известно крайне мало примеров белок-кодирующих генов, являющихся мишенями piРНК-системы.

Анализ RNA-seq библиотек, а также библиотек коротких РНК линий мутантных по компонентам piРНК системы (*aub*, *spnE*, *zuc* и *piwi*) позволили выявить целый список белок-кодирующих генов, являющихся мишенями piРНК системы, в семенниках *D. melanogaster*. Функции большинства из найденных генов остаются неизученными. При этом ген *cg12717*, кодирующий SUMO-изопептидазу, значительно дерепрессировался одновременно на фоне трех мутаций (*aub*, *spnE* и *zuc*). Интересно, что в геноме *D. melanogaster* также присутствует другая SUMO изопептидаза *verloren* (*velo*), имеющая гомологию в 75% к последовательности *cg12717*, приходящуюся на протеазный домен. Поиск в геноме *D. melanogaster* позволил выявить наличие мозаично организованных участков на Y-хромосоме, являющихся piРНК-кластерами к *cg12717*. С помощью ОТ-кПЦР было обнаружено, что экспрессия *cg12717* возрастала на фоне мутаций по *aub* и *spnE* в семенниках *D. melanogaster*, но не изменялась в яичниках, а экспрессия *velo* не изменялась на фоне мутаций. Вестерн-блот анализ препаратов также выявил увеличение содержания CG12717 на фоне мутаций в семенниках и его отсутствие в семенниках дикого типа. В тоже время он присутствовал в яичниках дикого типа и его уровень не изменялся при мутациях piРНК-пути. Локализация CG12717 на фоне мутаций охватывает широкий спектр стадий развития сперматогенеза: начинаясь в поздних сперматоцитах и охватывая мейотическую и постмейотические стадии, заканчивается на стадии индивидуализации и полностью отсутствует на зрелой сперме внутри семенных мешков. В отличие от CG12717 локализация *Verloren* начинается на стадии ранних герминальных клеток и заканчивается в поздних сперматоцитах. Также интересно, что в семенниках близкородственных линий дикого типа *D. mauritiana* и *D. simulans* наблюдается присутствие ортолога CG12717 в семенниках, на всех стадиях развития сперматоцитов за исключением ранних герминальных клеток, а также мейотической и постмейотической стадии. При этом анализ библиотек коротких РНК, полученных из семенников *D. simulans* и *D. mauritiana*, выявил наличие образующихся к ортологу CG12717 коротких siРНК в семенниках *D. mauritiana*.

Поиск нарушений развития сперматид на фоне мутаций piРНК-пути у самцов *D. melanogaster* не выявил заметных дефектов индивидуализации, но показал незначительное снижение фертильности самцов. Мы также не обнаружили следов мейотического дрейфа у потомков таких самцов по сравнению с контролем дикого типа. Таким образом, функциональное значение piРНК-опосредованного сайленсинга CG12717 на данный момент остается неизвестным.

Распределение белка MVH в фолликулах яичника мыши

Е.О. Башенджиева*^{1,2}, Н.Ю. Семёнова³, О.И. Подгорная², Н.И. Енукашвили²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

³ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

* *bashendjieva@yandex.ru*

MVN, также известный как Vasa, является АТФ-независимой РНК-геликазой, входит в состав семейства DEAD белков, для которых характерным является наличие последовательности D-E-A-D (DEAD box). Изначально Vasa был найден у *Drosophila* sp., но затем и у многих других видов животных, являясь высококонсервативным белком для разных видов организмов. Долгое время его считали надежным маркером клеток зародышевой линии, но в последнее время было сделано предположение о его экспрессии в соматических клетках.

Цель работы - исследовать распределение белка MVN в ооцитах и клетках фолликулов на постнатальных стадиях фолликулогенеза мыши. Исследование проводили на нестимулированных самках мышей в возрасте 12 недель, извлеченные из них яичники фиксировались в 10% параформальдегиде. Далее по стандартной методике приготавливали 1,5 мкм парафиновые срезы. Для анализа морфологии и определения стадии созревания использовали окрашивание гематоксилин-эозином каждого 5-го среза. Локализацию белка изучали с помощью иммуногистохимического анализа серийных срезов, окрашивая остальные срезы антителами к MVN, конъюгированными с Alexa-647 и анализируя препараты с помощью конфокального и светового микроскопов.

MVN был обнаружен в ооцитах примордиальных, первичных и вторичных фолликулов, где наибольшая экспрессия этого белка приходится на стадии примордиального и первичного фолликулов. Его наличие в клетке уже на более поздних стадиях фолликула с появлением антральной полости не идентифицируется. Локализуется MVN в цитоплазме ооцитов с большей близостью к периферии клетки. В соматических клетках примордиального фолликула данный белок локализуется в фолликулярных клетках. На стадии первичного фолликула — в фолликулярных клетках и клетках теки. На стадиях вторичного и антрального фолликулов — в клетках гранулезы с большей близостью к внутреннему слою теки, но интенсивность экспрессии меньше, чем на предыдущих стадиях.

Таким образом, белок MVN обнаруживается не только в ооцитах примордиальных, первичных и вторичных фолликулов, но и в соматических клетках фолликулов вплоть до стадии антрального фолликула включительно, где он находится в остаточном количестве. Предполагается, что падение интенсивности экспрессии белка с дальнейшим ростом и развитием фолликулов может быть связано со вступлением ооцита в мейотический цикл и последующей овуляцией.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-74-20102.

Поиск биомаркеров досимптомной стадии болезни Паркинсона в слезной жидкости

В.В. Богданов*¹, А.Р. Ким¹, М.Р. Нодель^{2,3}, Т.А. Павленко⁴, Е.Н. Павлова¹, В.Е. Блохин¹, Н.Б. Чеснокова⁴, М.В. Угрюмов¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова -
Российский геронтологический научно-клинический центр, Москва, Россия;

⁴ Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия

* vse-bogd@yandex.ru

Болезнь Паркинсона (БП) является тяжелым нейродегенеративным заболеванием с длительным периодом скрытого течения. Моторные симптомы БП (тремор, брадикинезия) проявляются только на стадии дегенерации большей части дофаминергических нейронов nigrostriatной системы головного мозга. На сегодняшний день не существует способов полностью затормозить или обратить этот процесс, и лечение БП сводится к симптоматической и паллиативной терапии. Поэтому актуальной проблемой является ранняя диагностика БП. Поскольку БП является системным заболеванием, и нейродегенерация затрагивает периферические нейроны, поиск изменений в периферических органах является перспективным подходом для ее ранней диагностики. Во-первых, в настоящее время описаны патологические изменения в различных органах человека при диагностированной БП, среди которых, возможно, присутствуют потенциальные маркеры этого заболевания на досимптомной стадии. Во-вторых, изучение периферических органов и биологических жидкостей является гораздо более легким и доступным, чем любое инструментальное исследование или вмешательство в головной мозг.

В качестве объекта исследования мы выбрали слезную жидкость (СЖ). Известно, что продолжительные поиски биомаркеров в других биологических жидкостях (плазма крови, спинномозговая жидкость) не дали однозначных и специфических биомаркеров БП. В то же время, глаза являются периферическим органом, тесно связанным с головным мозгом, а сама СЖ доступна для неинвазивного сбора.

Для валидации изучаемых нами биомаркеров в СЖ мы проводили моделирование БП на мышах на разных стадиях – досимптомной и симптомной, выделяя общие для обеих стадий изменения. Данные, полученные на СЖ мышей, сравнивали с данными по СЖ пациентов с диагностированной нелеченой БП. Обнаруженные сходные изменения трактовали как потенциальные биомаркеры досимптомной стадии БП.

Были изучены изменения уровня катехоламинов и активности α -2-макроглобулина в СЖ у пациентов с БП на ранней клинической стадии. Было показано, что СЖ у пациентов характеризуется повышенным уровнем норадреналина преимущественно на ипсилатеральной стороне относительно двигательных симптомов (72%, $p = 0,049$), пониженным уровнем адреналина с обеих сторон (ипсилатеральный - 53%; контралатеральный - 42%) и повышенной активностью α -2-макроглобулина с обеих сторон (ипсилатеральный - 53%; контралатеральный - 56%) по сравнению с контролем. Эти изменения рассматриваются нами как потенциальные биомаркеры для дифференциальной диагностики. Подобные изменения в СЖ были обнаружены и на нейротоксических моделях БП у мышей при моделировании досимптомной и симптомной стадий БП. Эти данные показывают адекватность моделей патогенезу БП по выбранным метаболическим путям, а также позволяют предположить, что обнаруженные изменения в СЖ можно рассматривать как потенциальные биомаркеры для доклинической диагностики БП.

Работа проводилась при поддержке гранта Министерства образования и науки РФ (соглашение № 075-15-2020-795, государственный контракт № 13.1902.21.0027 от 29.09.2020, ID проекта: RF-190220X0027).

**Участие внутриклеточного серотонина в морфогенетических движениях при гастрюляции
*Lymnaea stagnalis***

А.И. Богомолов*¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* *ToshaBG.msu@gmail.com*

Гастрюляция является одним из основных этапов развития всех живых существ, у которых есть по крайней мере два зародышевых листка. Это сложный процесс морфогенетических перестроек, сопровождающийся пролиферацией, дифференцировкой и непосредственным перемещением клеток. Достаточно хорошо известны молекулярно-генетические каскады, обеспечивающие скоординированные морфогенетические движения в процессе гастрюляции. Однако влияние древних сигнальных молекул, таких как моноамины, на активность биохимических регуляторных каскадов, изучено недостаточно. Традиционно считается, что моноамины действуют лишь как активаторы мембранных рецепторов. Значение накопления серотонина внутри клетки и его влияние на морфогенез не показано. Целью нашей работы было подробное описание клеточных движений во время гастрюляции брюхоного моллюска *Lymnaea stagnalis* в нормальных условиях и при высоком внутриклеточном уровне серотонина.

В своей работе мы использовали ранее отработанную модель повышения уровня внутриклеточного серотонина, приводящую к возникновению необратимых мальформаций на стадии гастрюлы. Эмбрионы инкубировали в 1 мМ непосредственном предшественнике серотонина (5-НТР) в течение 24 часов после оплодотворения. Повышение внутриклеточного уровня 5-НТ контролировали маркированием зародыша антителами к серотонину. Форму и положение клеток определяли с помощью окрашивания фаллоидином границ клеток и ядер. Результаты анализировали с помощью конфокальной микроскопии с 3D-реконструкцией.

Инкубация в 5-НТР приводила к увеличению уровня серотонина во всех клетках зародыша *Lymnaea* на ранних стадиях развития. В таких условиях мы наблюдали изменение количества контактов между идентифицированными бластомерами, высокие вариации размера и формы бластомеров, задержку скорости пролиферации. Было отмечено также отсутствие актин-зависимого сокращения апикальных полюсов клеток вегетативной поверхности эмбриона, в месте, где в норме формируется бластопор. Мы предполагаем, что описанные изменения приводят к аномальным движениям клеток и/или клеточных слоев во время гастрюляции, что приводит к возникновению мальформаций и последующему образованию экзогастрюлы. Привлечение методов электронной микроскопии для дальнейших исследований позволит подтвердить наши предположения.

Дифференциальная экспрессия генов в регенерации губок классов *Demospongiae* и *Calcarea*

И.Е. Борисенко*¹, А.И. Лавров², А.В. Ересковский^{1,3}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* *i.borisenko@spbu.ru*

Регенерация – процесс восстановления утраченной либо поврежденной части организма – широко распространена в животном царстве, при этом, регенеративные способности представителей разных групп животных неодинаковы. Губки и планарии способны развиваться из небольшой группы клеток, тогда как регенерационные способности нематод и насекомых крайне ограничены. Причины

столь разительных отличий между регенерационными способностями разных животных остаются неясными, хотя наборы «молекулярных инструментов», задействованных в регенерации, сходны у изученных видов.

Описывая клеточные механизмы репаративной регенерации у губок из разных классов – Demospongiae, Calcarea и Homoscleromorpha, ранее мы показали, что при сходных регенерационных способностях поведение клеток сильно отличается у разных видов. Так, у *Halisarca dujardini* (Demospongiae) после удаления фрагмента тела в прилежащей к ране зоне мезохила хоаноцитные камеры распадаются на отдельные хоаноциты, подвергающиеся дедифференцировке. Дедифференцированные клетки (хоаноциты, эндопинакоциты, клетки мезохила) формируют под раневой поверхностью бластемоподобную структуру, из материала которой строится новая водоносная система и покровы. У *Leucosolenia variabilis* (Calcarea) и *Oscarella lobularis* (Homoscleromorpha) не происходит дедифференцировки и формирования бластемы: клетки, прилегающие к ране, претерпевают трансдифференцировку и замещают утраченные структуры.

Мы описали изменения в экспрессии генов в ходе репаративной регенерации у губок *Halisarca dujardini* (Demospongiae) и *Leucosolenia variabilis* (Calcarea). После удаления фрагмента тела губки, в разных временных точках были экстирпированы участки тканей, прилежащих к раневой поверхности, и был проведен RNA-seq. Для каждой временной точки были определены гены, экспрессия которых усиливается или ослабляется. Дифференциально экспрессирующиеся гены аннотированы по GO, выявлены ортогоруппы между двумя исследованными видами. Также оценены изменения уровней экспрессии для молекул, обычно вовлеченных в регенерацию – лигандов сигнальных каскадов, белков адгезии, внеклеточного матрикса.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №17-14-01089 (в части секвенирования) и РФФИ №19-04-00563 (в части сбора материала).

Пространственная неоднородность движений эпителиальных клеток как источник локальных деформаций ткани в гастрюляции *Xenopus laevis*

Д.В. Бредов*^{1,2}, Н.Н. Лучинская¹, И.В. Володяев¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* d2707bredov@yandex.ru

Процессы формообразования в эмбриональном развитии сопровождаются значительными деформациями тканей, источником которых является механическая сила. Распределение механических сил в тканях эмбриона - паттерн механических напряжений, - пространственно неоднородно и качественно изменяется в ходе развития. Вместе с тем, в тканях эмбриона происходят активные клеточные перегруппировки.

Целью данной работы было изучить, как перегруппировки клеток могут влиять на паттерн механических напряжений в ткани. Для этого мы визуализировали границы и ядра клеток супрабластопоральной области (СБО) средней гастрюлы *X. laevis* микроинъекцией мРНК флуоресцентных маркеров, и затем осуществили цейтраферную съёмку СБО в течение 1 часа. На кадрах съёмки произвели кинематическое описание движений клеток, т.е. охарактеризовали для каждой клетки величину и направление смещения на всём интервале наблюдения. Мы обнаружили, что регионы, расположенные вдоль медиолатеральной оси, различаются по значениям средней скорости и сонаправленности движений клеток. Чтобы установить, сопровождаются ли обнаруженные региональные различия в скорости движения клеток деформациями ткани СБО, мы проанализировали динамику формы клеток в выделенных регионах. Нам не удалось выявить статистически значимых различий между формой клеток в начале и в конце наблюдения как в целом по эмбриону, так и внутри отдельных регионов. Однако анализ формы клеток позволил зафиксировать региональные различия в

активности их перегруппировок. Мы обнаружили, что в медиальной зоне СБО были сконцентрированы клеточные структуры, называемые розетками. Анализ распада розеток позволил установить, что в ходе этого процесса домен клеток, образующих розетку, начинает удлиняться в направлении антериопостериорной оси. Таким образом, нами установлен клеточный механизм, предположительно компенсирующий растяжение материала СБО в ходе процесса инволюции.

Авторы выражают благодарность доктору Dietmar Gradl (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe) за любезно предоставленные плазмиды GAP43-GFP и H2B-mCherry, и с.н.с. каф. эмбриологии биологического ф-та МГУ С. В. Кремнёву за неоценимую помощь при синтезе РНК флуоресцентных маркёров.

Acknowledgments: The reported study was funded by RFBR, projects № 19-34-90191 and № 20-01-00329. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 19-34-90191 и № 20-01-00329.

От аполярной гастрюлы к поляризованной личинке: эмбриональное развитие гидроидного полипа, *Dynamena pumila*

А.А. Ветрова*¹, Т.С. Лебедева², А.А. Саидова³, Д.М. Купаева¹, Ю.А. Краус^{1,3}, С.В. Кремнёв^{1,3}

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² Венский университет, Вена, Австрия;

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* lalavetrova@gmail.com

Практически у всех исследованных животных в ходе эмбрионального развития функционирует канонический сигнальный путь Wnt (сWnt), отвечающий за молекулярную разметку одной из осей тела. У животных с поляризованной гастрюляцией сWnt также определяет регион и регулирует гастрюляционные морфогенезы, например, формирование бластопора. Таким образом, в случае поляризованной гастрюляции морфогенетические процессы связаны с молекулярной разметкой оси тела эмбриона. У книдарий сWnt обеспечивает становление орально-аборальной оси тела, но при этом у многих книдарий гастрюляция морфологически аполярна. Остаётся не ясным, регулирует ли сWnt гастрюляционные морфогенезы в таком случае.

В нашей работе мы изучили эмбриональное развитие гидроидного полипа *Dynamena pumila*. У этого вида гастрюляционные морфогенезы протекают аполярно, а морфология гастрюл очень вариабельна. Мы показали, что у *D. pumila* гастрюляция представляет собой своеобразную комбинацию первичной и вторичной деламинации. Также мы выяснили, что у *D. pumila* сWnt участвует в разметке оси тела с ранних стадий развития, но морфологическая ось формируется только после завершения гастрюляции.

Гастрюлы *D. pumila* обладают уникальной особенностью. Если поместить их на субстрат, они начинают расплываться по нему иногда вплоть до клеточного монослоя. Однако к стадии препланулы распластавшиеся эмбрионы агрегируют и позже формируют нормальную личинку. Мы изучили, как меняется разметка оси тела эмбриона в ходе столь радикальной структурной перестройки. Оказалось, в распластанном эмбрионе присутствует отдельный оральный регион экспрессии компонентов сWnt каскада. Когда эмбрион начинает агрегировать, область экспрессии локализуется и становится организующим центром формирующейся личинки.

Чтобы исследовать, какое влияние разные уровни активности сWnt оказывают на эмбриональное развитие *D. pumila*, мы экспериментально модулировали активность сWnt с помощью фармакологических агентов. Мы использовали 1-азакенпауллон (Azk) для активации и iCRT-14 для подавления сWnt каскада. Мы выяснили, что фармакологические модуляции не влияют на гастрюляционные морфогенезы и морфологию эмбриона на стадии гастрюлы, но к стадии личинки эффект данных экспериментальных воздействий становился заметен. Под действием Azk развивались

личинки с увеличенным оральным регионом. При воздействии iCRT-14 мы получили личинок, у которых направление орально-аборальной оси было неразличимо по морфологическим признакам, а оральный регион экспрессии компонентов cWnt был сильно уменьшен. В отличие от близкородственного вида *Hydractinia echinata*, действие Azk не приводило к формированию многополярных личинок у *D. pumila*.

Итак, мы показали, что молекулярная предразметка орально-аборальной оси формируется рано в ходе развития *D. pumila*, но морфогенетические процессы гастрюляции происходят независимо от неё.

Исследование поддержано грантом РФФИ №20-04-00978а.

Экспрессия гена *Dlx* сопровождает активные морфогенезы во всех частях колонии гидроидного полипа *Dynamena pumila*

А.А. Ветрова*¹, Д.М. Купаева¹, С.В. Кремнёв^{1,2}

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* lavetrova@gmail.com

Гены *Dlx*, гомологичные гену *Dll* (Distal-less) дрозофилы, образуют семейство высококонсервативных гомеобокс-содержащих транскрипционных факторов. Известно, что гены *Dlx* вовлечены в развитие нервной системы и разметку передне-задней оси тела животных, но наиболее примечательны они своим участием в проксимо-дистальной разметке разнообразных выростов тела у разных типов животных. В геномах представителей типа Книдарии также были обнаружены паралоги *Dlx*. Книдарии формируют много различных выростов, например щупальца и ветви колонии, однако функция гена *Dlx* у книдарий до сих пор не выяснена.

Мы исследовали экспрессию гена *Dlx* у морского гидроидного полипа *Dynamena pumila*, которая посредством ряда специфических морфогенезов формирует архитектурно-сложные колонии. Колония *D. pumila* состоит из стелющихся по субстрату столонов, от которых вертикально вверх отходят побеги, несущие гидранты. Столоны крепятся к субстрату с помощью прикрепительных дисков, разделённых на несколько долей. Побеги имеют модульную структуру, каждый модуль состоит из двух боковых гидрантов, между которыми располагается ценосарк. Рост и морфогенез столонов и побегов осуществляется специальными органами, терминально расположенными верхушками роста.

Мы обнаружили повышенную экспрессию гена *Dlx* во всех морфогенетически активных регионах колонии *D. pumila*. Во время формирования долей в прикрепительном диске экспрессия *Dlx* сопровождает сворачивание эпителиального слоя эктодермальных клеток внутрь. В верхушке роста столона *Dlx* экспрессируется на латеральных поверхностях в эктодермальных клетках, которые постоянно меняют форму в ходе ростовых пульсаций. Повышение уровня экспрессии *Dlx* также происходит в области формирования нового побега. Однако затем экспрессия *Dlx* исчезает в самом побеге и остаётся только в тканях вокруг него. В верхушке роста побега *Dlx* экспрессируется в области формирования границ между новой верхушкой роста и зачатками гидрантов. Данные границы формируются в ходе активных эпителиальных морфогенезов. В зачатках гидрантов в верхушке роста побега *Dlx* также экспрессируется на латеральных поверхностях, соответствующих латеральным поверхностям верхушки роста столона. Позднее в гидрантах экспрессия *Dlx* пропадает и наблюдается только в основании сформированных гидрантов в виде колец. Интересно, что экспрессия *Dlx* отсутствует в самых терминальных регионах верхушек роста. Таким образом, согласно нашим результатам, экспрессия *Dlx* сопровождает активные морфогенетические процессы во всех частях колонии *D. pumila*.

Исследование поддержано грантом РФФИ №20-04-00978а.

Модель дифференцировки нейронов из ИПСК человека, экспрессирующих кальциевый индикатор GCaMP6s, для исследования нейрофизиологических процессов

А.А. Галиакберова*^{1,2}, А.М. Сурин³, З.В. Бакаева³

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

³ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия

* *adgaliakberova@gmail.com*

Изучение нейронов человека и их взаимодействия с нейрохимическими веществами затруднено из-за невозможности сбора первичного биоматериала. Однако последние достижения в культивировании стволовых клеток человека, методах их нейральной дифференцировки, а также разработка химерных флуоресцентных кальциевых индикаторов позволяют создавать модельные системы нейронов *in vitro*. В настоящем докладе мы сообщаем о разработке метода получения человеческих нейронов с кальциевым индикатором GCaMP6s на основе линии ИПСК человека с трансгенным комплексом TetON-NGN2. Разработанный нами протокол позволяет быстро и эффективно получать нейроны человека, подходящие для изучения различных нейрохимических веществ и их влияния на конкретную нейрофизиологическую активность, которая может быть легко зарегистрирована с помощью флуоресцентной микроскопии.

В полученных нами культурах мы наблюдали образующие сети нейроны, с типичной морфологией. Клетки экспрессировали основные нейральные гены, а также положительно окрашивались на белки-маркеры нейронов. Добавление к культуре нейронов глутамата, основного возбуждающего нейромедиатора, индуцирует повышение внутриклеточной концентрации Ca²⁺, которое происходит за счет ионотропных рецепторов к глутамату преимущественно NMDA-типа. В совокупности эти факты позволяют рассматривать созданную нами модель как успешное развитие этой технологии.

Данное исследование финансировалось грантом № 075-15-2019-1789 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, выделенным Центру высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины.

Анализ развития преимплантационных эмбрионов мышей, нокаутных по гену *insrr*

Е.А. Ганцова*¹, О.В. Серова¹, А.А. Гавриленкова^{1,2}, И.Е. Деев^{1,3}, А.Г. Петренко¹

¹ Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия;

³ Научно-технологический университет "Сириус", Сочи, Россия

* *gantsova@mail.ru*

Рецепторная тирозинкиназа IRR (insulin receptor-related receptor) является сенсором щелочного pH и вовлечена в секрецию бикарбоната почками, что свидетельствует о том, что тирозинкиназные рецепторы могут напрямую участвовать в регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме. Помимо почек мРНК рецептора обнаружена в поджелудочной железе, желудке, мозге, ганглиях спинного мозга. Интересен тот факт, что экспрессия *IRR* обнаруживается уже на стадии одноклеточного эмбриона. На более поздних стадиях эмбрионального развития высокий уровень экспрессии *IRR*

наблюдается в симпатических ганглиях, поджелудочной железе и почках, что предполагает роль рецептора в развитии организма.

Для выявления роли рецептора IRR в развитии организма были проведены эксперименты по оценке развития эмбрионов мышей дикого типа и нокаутных по гену *IRR* с использованием Mouse Embryo Assay (МЕА-тест). Самкам мышей в возрасте 2-3 месяца внутрибрюшинно вводили поочередно гормональные препараты для стимуляции суперовуляции. Первая инъекция 5 МЕ ФСГ, через 48 часов, 5 МЕ препарата ХГЧ. Затем самок подсаживали на ночь к самцам, на следующее утро у самок извлекали эмбрионы на стадии зиготы и помещали их в специальную среду. Далее анализировали деление эмбрионов каждые сутки в течение 120 часов от оплодотворения. Оценку развития осуществляли с помощью индекса выхода бластоцист – процента образования бластоцист из общего количества извлеченных эмбрионов. Результаты этих экспериментов показали, что выход бластоцист у нокаутных по *IRR* животных значительно ниже, чем у животных дикого типа, 7% от общего количества извлеченных клеток у нокаутных животных и 36% у животных дикого типа. Так же у нокаутных животных наблюдалось большее количество дефектных яйцеклеток, качество бластоцист также различалось B12Bb/B12Bc/B12Cc в нокаутных эмбрионах, и B14Ab/B14Aa в эмбрионах дикого типа. Число поделившихся клеток у нокаутных животных также было очень низким, 45 клеток из 138 извлеченных, тогда как у мышей дикого типа 124 клеток из 231 извлеченных. У нокаутных животных наблюдалось большее количество дефектных эмбрионов, а также чаще наблюдалось ассиметричное деление, чем у животных дикого типа.

Также мы провели оценку развития гетерозиготных эмбрионов, для этого мы скрещивали диких и нокаутных животных разного пола. У нокаутных и диких самок выход гетерозиготных бластоцист составил 14 и 18 % от общего числа извлеченных клеток, соответственно. Таким образом у нокаутных животных мы наблюдаем более низкую оплодотворяемость (количество поделившихся клеток от общего числа) и более низкие значения выхода бластоцист, в том числе от количества поделившихся клеток, чем у животных дикого типа. Низкий выход бластоцист в условиях МЕА-теста у нокаутных животных свидетельствует о возможной роли рецептора IRR в оплодотворении или/и развитии организма.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 19-04-01042; № 19-34-51034; 20-04-00880.

Исследование интерактома ДНК-связывающих факторов, участвующих в привлечении репрессоров группы Polycomb на хроматин

А.А. Головнина*^{1,2}, Д.В. Ломаев¹, Д.А. Четверина¹, М.М. Ерохин¹

¹ Институт биологии гена РАН, Москва, Россия;

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* *Golovnina_Aleksandra_2799@mail.ru*

Система эпигенетических регуляторов Polycomb представляет собой консервативную группу белков-репрессоров транскрипции, контролирующую экспрессию большого числа генов развития и участвующих в работе клеточной памяти. Они функционируют в виде нескольких гетерокомплексов, которые связываются со специализированными ДНК-регуляторными элементами. У дрозофилы этими элементами являются PRE (Polycomb response elements) – протяженные участки, содержащие множественные сайты для определенных ДНК-связывающих факторов, вовлеченных в привлечение и удержание репрессоров Polycomb на ДНК. Последние исследования предполагают, что для эффективного рекрутирования белков Polycomb важную роль могут играть кооперативные взаимодействия между разными ДНК-связывающими факторами PRE. Однако, в настоящее время возможность формирования таких контактов остается практически не исследованной.

В связи с этим цель данной работы состояла в исследовании возможности PRE-ДНК-связывающего белка Dsp1 (Dorsal switch protein 1) взаимодействовать с рядом других PRE-ДНК-связывающих факторов и со своими копиями (самоассоциироваться). Для этого использовался метод дрожжевого двугибридного анализа: были созданы плазмидные конструкции с последовательностью гена *Dsp1* и проведён двугибридный скрининг. В результате анализа установлено наличие прямого взаимодействия между PRE-ДНК-связывающими факторами Dsp1 и Psq (Pipsqueak). В то же время, фактор Dsp1 не формировал гомодимеров. Для подтверждения взаимодействия белков Dsp1 и Psq *in vivo*, методом иммуноаффинной очистки и последующего масс-спектрометрического анализа (IP/MS), нами был очищен комплекс с использованием антител против белка Psq. В результате нами было подтверждено, что PRE ДНК-связывающий фактор Dsp1 является одним из основных партнеров PRE ДНК-связывающего белка Psq *in vivo*. Таким образом, в ходе данной работы показано, что белки Dsp1 и Psq непосредственно взаимодействуют друг с другом.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 18-74-10091, <https://rscf.ru/project/18-74-10091/>

Системное воздействие флуоксетина на морфофункциональный статус яичника мыши

А.А. Гусева*¹, Н.М. Алешина², Д.А. Никишин^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* alikaguseva22@gmail.com

Серотонин (5-НТ) является классическим нейромедиатором, который, к тому же, принимает участие в регуляции репродуктивных процессов в яичниках у самок млекопитающих. Основным источником 5-НТ в яичнике является его захват из внеклеточной среды с помощью транспортера Sert, активного в ооцитах. Sert является специфической мишенью селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС), обычно используемых для лечения депрессии. Чаще всего в терапевтической практике применяют флуоксетин. Известно, что ингибирование Sert путём нокаута его гена или применение СИОЗС негативно влияет на экспрессию *Cyp19a1* и синтез эстрадиола у самок мышей. Кроме того, в экспериментах *in vitro* показано, что функциональная активность фолликулярных клеток зависит от активности Sert в ооцитах.

Целью данной работы было исследовать влияние флуоксетина на морфофункциональное состояние яичника на модели системного воздействия флуоксетина на препубертатных мышей.

В исследовании была отработана модель системного воздействия флуоксетина в дозировке 25 мг/кг на мышах на сроке постнатального развития 7-14 dpp, на котором происходит первая волна фолликулогенеза. Значительное снижение концентрации серотонина в крови говорит об угнетении функции Sert. Также ингибирование активности Sert флуоксетином подтверждается в эксперименте *in vitro* по инкубации яичников в среде с серотонином. Уровни экспрессии гонадотропных гормонов ЛГ и ФСГ в аденогипофизе не менялись, что исключает влияние флуоксетина на функциональную активность яичника через гипофизарную систему. Значимой разницы в морфологическом строении яичников мышей опытной и контрольной групп также обнаружено не было.

Был проведен анализ экспрессии мРНК генов-маркеров функционального состояния клеток гранулезы (*Has2*, *Ptgs2*, *Ccnd1*), ооцитарных факторов роста (*Gdf9*, *Bmp6*, *Bmp1*, *Igf1*), стероидогенных ферментов (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*) и Sert (*Slc6a4*) методом ПЦР в реальном времени.

Выявлено статистически значимое увеличение экспрессии ароматазы *Cyp19a1*, которая является мишенью ФСГ, *Bmp15* и уменьшение экспрессии *Igf1*. Различий в экспрессии других генов не наблюдалось. Флуоксетин способен ингибировать каноническую передачу сигналов Wnt/ β -катенина, что, в свою очередь, может приводить к увеличению уровня экспрессии *Cyp19a1*. Для проверки этой гипотезы был проведён анализ экспрессии *Fzd4*, *Fgf9*, *Axin2*, *Bcl2l11*, *Cdkn1b*. Экспрессия *Fgf9*

уменьшилась, что может говорить об ингибировании канонического Wnt пути. Экспрессия остальных генов не изменилась. В то же время, анализ экспрессии *Fshr* и *Lhcgr*, генов-мишеней ФСГ, показал увеличение экспрессии *Lhcgr*. Итак, флуоксетин увеличивает экспрессию генов-мишеней ФСГ (*Cyp19a1*, *Lhcgr*) и снижает экспрессию *Fgf9*, что свидетельствует в пользу нашей гипотезы.

Таким образом, на данной модели с участием неполовозрелых мышей была продемонстрирована функциональная значимость механизма захвата серотонина в регуляции роста и развития овариальных фолликулов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-00303 и гранта Президента РФ МК-931.2020.4.

Системы трансактивации на основе CRISPR/dCas9, опыт применения для репрограммирования клеток человека

Э.Б. Дашинамаев*^{1,2}

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

* *dashinimaev@gmail.com*

Скорость эволюции технологий перепрограммирования клеток человека в современной науке растёт с каждым годом. И научное сообщество, и медицинские работники зависят от этих разработок из-за отсутствия безопасных аутологичных клеток и тканей для регенеративной медицины, инструментов редактирования генома и надёжных методов скрининга. Для эффективного проведения экспериментов и развития фундаментальной науки важно идти в ногу с новыми технологиями и методами, которые открываются практически ежемесячно. Одной из таких бурно-развивающихся областей является методы редактирования генома и эпигенома на основе системы CRISPR/Cas9. Используя деактивированную нуклеазу Cas9 сшитую с трансактиваторными молекулами, можно напрямую управлять экспрессией регуляторных генов, вызывая тем самым перепрограммирование клеток из одного типа в другой. В данном докладе будут показаны результаты наших экспериментов по использованию таких систем для репрограммирования фибробластов кожи человека в разные типы клеток и подведены первые итоги, на основании которых сделаны выводы и сформулированы рекомендации для дальнейшего применения.

Влияние инактивации транскрипции тандемно повторяющейся перичентромерной ДНК на формирование безмембранных структур в созревающих ооцитах человека

М.А. Добрынин*¹, Н.М. Корчагина^{2,3}, О.И. Подгорная¹, Н.И. Енукашвили¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

³ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

* *dobrmak1555@mail.ru*

Перичентромерная тандемно повторяющаяся некодирующая ДНК (периТП ДНК) составляет примерно 10% генома человека. ПериТП ДНК включает в себя классические человеческие сателлиты 1, 2, 3 (HS1, HS2, HS3), которые транскрибируются в соматических клетках. Подобные транскрипты также обнаруживаются в эмбрионах до и после имплантации. Ранее в нашей лаборатории показано

наличие транскриптов HS2/HS3 в позднем оогенезе человека. Цель работы - анализ пространственно-временной организации транскрипции HS2/HS3 в созревающих ооцитах человека.

Преовуляторные (GV и MI) ооциты человека получали в циклах стимуляции доноров. Клетки на данных стадиях не хранятся в банке донорских ооцитов и были переданы для исследований. Информированное согласие доноров, а также разрешение этического комитета клиники получено. Распределение HS2/HS3, их транскриптов, а также хеликаз DDX5 и DDX4 в созревающих ооцитах человека исследовали с помощью методов ДНК-ДНК и ДНК-РНК FISH и иммуно-FISH, соответственно. Двойное иммуноокрашивание было использовано для изучения пространственной взаимосвязи хеликаз и рецептора транслоказы наружной митохондриальной мембраны (Tom 20). Присутствие транскриптов HS2/HS3 в транскриптоме проверяли с помощью методов биоинформатного анализа опубликованных транскриптомов здоровых доноров. Количественную оценку транскрипции HS2/HS3 проводили с помощью РТ-ПЦР. Для изучения инактивации транскрипции HS2/HS3 ооциты были подвергнуты цитоплазматической микроинъекции с помощью микроманипулятора. В ооциты были введены дозы 2-O'Met олигонуклеотидов, после чего клетки были помещены в CO₂-инкубатор, а через 48 часов зафиксированы и исследованы.

Материнские транскрипты HS2/3, транскрибируемые с обеих цепей ДНК, накапливались в ооплазме ооцитов при переходе от стадии GV к стадии MI. Количественная оценка транскрипции выявила более высокое содержание РНК HS2/HS3 в ооцитах GV, по сравнению с соматическими кумулюсными клетками. Методами биоинформатики продемонстрировано присутствие полиаденилированных РНК HS2/HS3 в транскриптомах ооцитов GV и MII. При этом в большинстве проанализированных пар транскриптомов (ооцитов стадий GV и MII от одного донора), содержание транскриптов в MII ооцитах превышало количество в GV. Основным местом локализации транскриптов HS2/HS3 являлись безмембранные РНП структуры, содержащие DEAD-бокс-геликазы DDX5 и DDX4, локализованные вблизи митохондрий. Найденные РНП могут быть местом пространственной секвестрации РНК и белков в созревающих ооцитах. Инактивация транскрипции HS2/HS3 в созревающих ооцитах человека привела к уменьшению количества сигналов соответствующих РНК после FISH и изменению количественных параметров в организации безмембранных РНП. Сборка РНП может играть критическую роль для развития ооцитов, быть причиной остановки созревания или возникновения патологических синдромов, в том числе связанных с проблемами оплодотворения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№19-74-20102).

Поиск молекулярных мишеней, вовлеченных в регенеративный ответ при инфаркте миокарда, в мезенхимных клетках сердца с применением транскриптомного анализа

П.М. Докшин^{*1}, А.Б. Малашичева^{2,1,3}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

* pdocshin@icloud.com

Долгое время считалось, что сердце млекопитающих неспособно к функционально значимой регенерации после повреждения. Однако, работы последних лет показывают, что в сердце существуют популяции резидентных мезенхимных клеток, которые вовлечены в регенеративные процессы в миокарде, особенно, в результате острого гипоксического стресса, но оборот кардиомиоцитов остаётся незначительным, что, в конечном итоге, приводит к замещению миокарда фиброзной тканью и ухудшению насосной функции сердца. Поиск молекулярных мишеней, ответственных за регенеративный ответ в сердце, до сих пор остаётся актуальным вопросом современной клеточной биологии.

Целью нашего исследования является изучение молекулярных механизмов, вовлеченных в активацию регенеративного потенциала, в мезенхимных клетках сердца (МКС).

Мы индуцировали инфаркт миокарда у крыс путём лигирования левой коронарной артерии, и через 24 часа после операции были получены ткани и МКС из постинфарктной области миокарда; в качестве контроля использовали ткани и клетки, полученные от ложнооперированных крыс. Иммунофенотипирование первичных культур МКС проводили с использованием проточной цитофлуориметрии CytoFlex для оценки уровня экспрессии поверхностных маркеров CD31, CD34, C45, CD90 и CD166. Подготовка библиотек и секвенирование транскриптома осуществлялось с использованием системы TruSeq RNA на базе платформы Illumina. Выравнивание и аннотацию сырых данных выполняли с помощью STAR 2.7 на основе Rnor_6.0. Анализ дифференциальной экспрессии проведён с использованием пакета DESeq2 Bioconductor в среде R. Анализ сигнальных путей получен при помощи программного обеспечения IPA (QIAGEN).

В постинфарктных тканях было обнаружено более 2000 дифференциально экспрессированных генов (adj. p-value <0.05), которые являлись участниками более 100 дисрегулируемых сигнальных путей, вовлеченных в процессы иммунного ответа, роста и деления клеток, и ремоделирования сердца. Нами было показано, что при гипоксии *in vivo* значительно возрастает уровень экспрессии компонентов неканонического сигнального пути Notch и генов раннего ремоделирования BMP2/RUNX2, что, в свою очередь, частично сохранялось в первичных культурах МКС, выделенных из постинфарктной области миокарда.

Таким образом, острый гипоксический стресс оказывает кратковременную активацию регенеративного потенциала МКС, и в этот процесс вовлечены передачи сигналов, включая Notch и Wnt. Полученные данные способствуют последующему углублённому рассмотрению и активному изучению феномена активации вышеуказанных сигнальных путей на предмет их взаимодействия друг с другом при регенеративном ответе.

При поддержке РФФИ: Грант №20-015-00574 А.

Новые данные о нейруляции у представителей Cypriniformes и Salmoniformes

Е.А. Евнукова*¹, Е.А. Кондакова^{1,2}, М.А. Кулакова¹, В.А. Богданова²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

² Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии - «ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга», Санкт-Петербург, Россия

* *dusia.evnuкова@yandex.ru*

Исследование нейруляции позвоночных имеет большое теоретическое и практическое значение. Однако, несмотря на активное изучение, сведения о некоторых ее аспектах остаются фрагментарными. В частности, недостаточно изучено формирование нейрального зачатка в задней области тела. Нейруляция зародышей костистых рыб была исследована лишь у небольшого круга объектов, преимущественно у *Danio rerio*.

В нашей предыдущей работе была описана морфология клеток и реконструированы морфопроцессы, протекающие в каудальном отделе тела в ходе формирования нервной трубки (НТ) для *D. rerio*. На данный момент нами были получены данные о паттернах экспрессии генов *Sox2* (раннего нейрального маркера) и *Tbx1a* (маркера хвостовой почки (ХП) и хорды). Экспрессия этих генов на трех поздних эмбриональных стадиях (21 и 26 сомитов, prim-6) не была описана в опубликованных ранее работах. На стадии 21 сомита экспрессия *Sox2* была отмечена в задней области нейрального зачатка и дорсальной части ХП, причем распространялась до ее конца. *Sox2* также экспрессировался в мезодермальном зачатке вентральнее хорды. К стадии prim6 области экспрессии в мезодермальном и нейральном зачатках сократились, а в конце ХП экспрессия отсутствовала. Экспрессия *Tbx1a*

наблюдалась в клетках хорды и ХП, в которой в процессе развития ее зона значительно уменьшилась. Также, как и ожидалось, в области ХП было отмечено перекрывание зон экспрессии исследуемых генов.

Нами также были получены первые данные о нейруляции *Coregonus nasus* (Salmoniformes). Для него характерно длительное эмбриональное развитие при низких температурах. Мы предположили, что между двумя видами, принадлежащими к отдаленным группам Teleostei, развивающимися в разных условиях и отличающимися по продолжительности развития, могут быть вариации в процессах нейруляции. Мы исследовали следующие стадии: 29 дней после оплодотворения (дпо), 61 дпо, 76 дпо, 86 дпо и 116 дпо. Серийные срезы толщиной 6 мкм были окрашены гематоксилином Карацци и эозином. На 29 дпо в туловищном отделе в наиболее передней части наблюдался ранний нейральный киль, в центральной – нейральная пластинка, а в каудальном отделе – отсутствие морфологически обособленных зачатков осевых структур. На 61 дпо наблюдали образование просвета НТ в головном и туловищном отделах. В хвостовом отделе нейральный зачаток был представлен нейральным килем/стержнем, форма которого менялась в направлении сзади-вперед от округлой к трапециевидной. У зародышей в возрасте 76 дпо полость НТ была сформирована по всей длине туловищного отдела. В хвостовом отделе просвет также был сформирован почти по всей длине, кроме наиболее дистальной части – в ней нейральный зачаток имел вид округлого стержня. К этому времени материал ХП сохранился только в самом кончике хвоста. К 116 дпо НТ была полностью сформирована. Таким образом, морфологические процессы нейруляции у *C. nasus* и *D. rerio* сходны, отличается их продолжительность.

Авторы благодарят РЦ РМИКТ и «Хромас» СПбГУ. Работа выполнена в рамках проекта «ProjectKS 4058 – ARCTAQUA».

Спермиогенез ацеломорф и плоских червей: новые примеры рекапитуляции предковых признаков

Я.И. Заботин*¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

* Yaroslav_Zabotin@rambler.ru

В настоящее время ультраструктурные особенности половых клеток и гаметогенеза (наряду с молекулярно-генетическими методами) широко применяются в систематике и филогенетике различных групп животных. В том числе это справедливо и для плоских червей (Plathelminthes), репродуктивная система которых отличается крайним разнообразием на фоне относительной простоты организации остальных систем органов. Ранее к этому типу относились также бескишечные турбеллярии (Acoela), в настоящий момент обычно выделяемые на основе молекулярно-генетических данных в отдельный таксон Acoelomorpha.

В ходе данной работы было проведено ультраструктурное исследование зрелых сперматозоидов и хода спермиогенеза у представителей различных групп бескишечных турбеллярий и свободноживущих и паразитических плоских червей в эволюционно-морфологическом аспекте.

Представители *Convoluta convoluta* (Acoela, Convolutidae), *Provortex karlingi* (Rhabdocoela, Provorticidae), *Uteriporus vulgaris* (Tricladida, Uteriporidae) были собраны на литорали различных островов Керетского архипелага (губа Чупа, Белое море, Россия). Мариты *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae) были получены из печени крупного рогатого скота в Буинском районе Республики Татарстан (Россия). Материал был зафиксирован в 1 % глутаровом альдегиде на 0,1 М фосфатном буфере и подготовлен для трансмиссионной электронной микроскопии по стандартной методике.

В сперматиде исследованных видов ацеломорф и плоских червей были обнаружены особенности, характерные для зрелых сперматозоидов более примитивных представителей данных таксонов и представляющие собой яркие примеры рекапитуляции предковых признаков на клеточном уровне.

Так, у *C. convoluta* происходит смена положения свободных цитоплазматических микротрубочек. Поначалу они занимают кортикальное положение по периферии сперматиды, что характерно для более примитивных семейств Acoela, и лишь в зрелом сперматозоиде собираются в центральный аксиальный цилиндр, типичный для семейства Convolutidae.

У сильно специализированного зрелого сперматозоида *P. karlingi* полностью отсутствуют жгутики, однако в сперматидах было обнаружено интерцентриолярное тельце, участвующее в их формировании, что, бесспорно, указывает на происхождение безжгутиковых мужских гамет рода *Provortex* от типичных жгутиковых.

Для зрелого спермия триклады *U. vulgaris* и трематоды *F. hepatica* характерно наличие единственной удлинённой митохондрии, которая образуется путем «сплавления» всех митохондрий сперматиды. Были отмечены деструктивные изменения митохондрий сперматиды и участие мелких пузырьков, выделяемых комплексом Гольджи, в формировании единой мембраны митохондрии. На наш взгляд, сходство процессов спермиогенеза триклад и трематод может свидетельствовать о возможной филогенетической близости этих таксонов и об эволюционной преемственности ультраструктурных особенностей половых клеток свободноживущих и паразитических плоских червей.

Проблема эффективности преимплантационного генетического скрининга эмбрионов

А.Д. Иванова*¹, И.В. Володяев², А.О. Кириллова³

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Клиника репродуктивной медицины ЕМС, Москва, Россия;

³ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, Москва, Россия

* ankivanova2@gmail.com

В настоящее время в клинической практике ЭКО широко используется технология преимплантационного генетического скрининга (ПГС) эмбрионов и идет активное накопление данных о хромосомных нарушениях ранних эмбрионов. Так, было обнаружено, что различные варианты хромосомного мозаицизма, в том числе эуплоид-анеуплоидный мозаицизм, широко представлены в эмбрионах человека на преимплантационных стадиях развития. Хотя снижение потенциала развития мозаичных эмбрионов (МЭ) не вызывает сомнений, описано много клинических случаев рождения здоровых детей после переноса эмбрионов, определенных на стадии бластоцисты как мозаичные. В результате возникла активная дискуссия о возможности переноса таких эмбрионов. Было высказано несколько предположений относительно того, с чем это может быть связано. Во-первых, существуют данные об активизации механизмов самокоррекции МЭ на преимплантационных стадиях развития. Во-вторых, причиной хороших клинических исходов после переноса МЭ может быть ложноположительный диагноз аномалий по результатам ПГС. Однако, экспериментальные проверки обеих гипотез фактически не проводились.

По мере совершенствования протоколов подготовки образцов и собственно развития методов генетического анализа стало понятно, что частота обнаружения МЭ в значительной мере зависит от используемых протоколов и рознится между различными центрами ЭКО. Так, важными вопросами выступают проблема репрезентативности биоптата трофэктодермы по отношению ко всему эмбриону, возможность наличия взаимных анеуплоидий, а также проведение анализа на этапе удвоения ДНК, вследствие чего могут быть поставлены ложные диагнозы. Наконец, неоднократно была высказана идея, что высокая частота МЭ в некоторых клиниках наблюдается вследствие лабораторных манипуляций или технических эффектов. Важным обстоятельством является то, что ни один из методов ПГС не имеет клинически стандартизированных критериев, позволяющих точно отличать технические погрешности от подлинного мозаицизма, когда значение числа копий хромосомы попадает между порогами эуплоидии и анеуплоидии. Артефактный фоновый шум может вызвать такие промежуточные

уровни профилей по хромосомам, и это приводит к тому, что профили интерпретируются как мозаичные.

В настоящее время нами проводится исследование по выявлению факторов, приводящих к ложной диагностике МЭ. Согласно предварительным данным, нарушения температурного режима в ходе подготовки образца к анализу связаны с возникновением так называемого технического шума на профилях NGS, который часто ложно интерпретируется как мозаицизм. Результаты нашего исследования будут обладать научной новизной и послужат фундаментальным научным базисом для улучшения методов оценки эмбрионов в клинической практике ВРТ.

Нарушения формирования афферентной иннервации ГРГ-нейронов крыс при системном воспалении, вызванном липополисахаридом (*E. coli*), и их коррекция IgG

В.М. Игнатюк*¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* gwynnlynx@mail.ru

Репродуктивная способность потомства млекопитающих зависит от своевременного развития нейронов, синтезирующих гонадотропин рилизинг-гормон (ГРГ). Большая их часть образуется в интраназальной области головы, откуда они мигрируют в передний мозг. Нарушения регуляции миграции ГРГ нейронов, вызванные различными неблагоприятными факторами в критические периоды онтогенеза, могут нарушать формирование гипоталамо-гипофизарно-репродуктивной оси, а в дальнейшем и репродуктивные функции у потомства. Одним из факторов риска, вызывающих нарушения развития ГРГ нейронов у плода, являются бактериальные инфекции или их мембранный компонент липополисахарид (ЛПС), индуцирующие воспалительные процессы в организме матери и плода.

Целью данной работы было исследовать отдаленные последствия влияния воспаления, вызванного ЛПС, и противовоспалительного действия иммуноглобулина (IgG) в раннем онтогенезе на формирование афферентной иннервации ГРГ нейронов самцов крыс.

На 12-й день беременности самкам крыс массой 250 г (n=3 в каждой группе) вводили в/б либо ЛПС *E. coli* (50 мкг/кг в 0.9% растворе NaCl), либо в/в крысиный IgG (1 мг/кг), либо гуманизированные моноклональные антитела (IgG1) к рецептору интерлейкина (ИЛ)-6 (тоцилизумаб; 2 мг/кг) через 40 мин после введения ЛПС. У половозрелых самцов-потомков (n=5 в каждой группе) в опытных и контрольной (0.9% раствор NaCl) группах оценивали количество синаптических контактов на ГРГ нейронах в переднем гипоталамусе и областях, окружающих ГРГ нейроны, методом двойного иммуофлуоресцентного мечения на ГРГ и пресинаптический маркер синапсин-1. Статистическую обработку данных производили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Показано, что пренатальное воздействие ЛПС приводит к снижению общего числа синапсин-1 иммунореактивных кластеров на телах и дендритах ГРГ нейронов исследуемых областей у половозрелых самцов, по сравнению с группой животных, не получавших ЛПС. Подавление воспалительных процессов IgG или блокада рецептора к провоспалительному цитокину ИЛ-6 приводили к увеличению числа синапсин-1 иммунореактивных кластеров на ГРГ-нейронах до контрольного уровня. Таким образом, при системном воспалении, развивающемся у матери и плода на ранних сроках беременности, у потомства нарушается формирование синаптических контактов на ГРГ нейронах, и в данный процесс вовлекается цитокин ИЛ-6. IgG корригирует выявленные нарушения.

Автор выражает благодарность главному научному сотруднику лаборатории биохимии процессов онтогенеза Захаровой Людмиле Алексеевне (научный руководитель), старшему научному сотруднику лаборатории биохимии процессов онтогенеза Извольской Марине Сергеевне.

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект номер 19-34-90006).

Развитие мышечной системы показывает отсутствие строгой последовательности закладки сегментов сзади наперед в связи с гетерономным строением у погонофоры *Siboglinum fiordicum*

Н.Н. Римская-Корсакова¹, Н.П. Карасева*¹, Т.П. Пименов¹, Х.Т. Рапп², Е. Саусворд³, Е.Н. Темерева¹, К. Ворсаа⁴

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Бергенский университет, Берген, Норвегия;

³ Морская биологическая ассоциация Соединенного Королевства, Плимут, Великобритания;

⁴ Копенгагенский университет, Копенгаген, Дания

* *oasisia@gmail.com*

Многие кольчатые черви, включая хорошо изученные виды, такие как *Platynereis*, демонстрируют похожие структурные единицы, сегменты, расположенные вдоль оси тела (гомономная сегментация). Однако многие виды кольчатых червей отличаются от такой организации сегментов и имеют в составе тела специализированные сегменты или отделы тела (гетерономная сегментация). Недавние филогеномные исследования и палеонтологические находки предполагают, что гетерономная структура тела может представлять предковое состояние у Annelida. В рамках понимания эволюции сегментированного строения внутри гетерономных видов, мы описываем развитие мышц и мезодермальное разграничение сегментов у погонофоры *Siboglinum fiordicum* во время личиночного развития.

Применение конфокальной и просвечивающей электронной микроскопии позволяет нам описать порядок развития мышечных и неммышечных септ. Первая септа, поддерживаемая толстыми пучками продольных мышц, и разделяет тело на переднюю и заднюю части (тагмы). Вторая группа септ, разделяет заднюю часть тела (опистосому) на сегменты. Сами септы неммышечные, но в стенке тела на уровне крепления септ лежат пучки кольцевой мускулатуры. На поздней личиночной стадии септ, усиленная в ее основании кольцевыми мышцами, разделяет переднюю часть тела на передний и туловищный сегменты. Оставшиеся септы и их кольцевые мышцы образуются одна за другой на самом заднем конце опистосомы. Наши результаты показывают, что септы между сегментами у гетерономного *Siboglinum fiordicum* не формируются в строгой задне-переднем направлении, описанного как основной способ закладки сегментов у кольчатых червей. Вместо этого первая септа делит тело на две части тела (тагмы). Позже сегменты формируются внутри этих тагм: сначала в задней тагме, позже в передней тагме.

Мы рассматриваем личиночное развитие *S. fiordicum* как гетерохронное, сегменты в каждой тагме развиваются в разное время. Это гетерохронное личиночное развитие, вероятно, эволюционировало вместе с гетерономной организацией тела взрослых форм (то есть наличием специализированных участков тела), обнаруженные у *S. fiordicum*. Отсутствие строгой передне-задней последовательности формирования сегментов также известно у других гетерономных аннелид, серпулиды *Hydroides* и хетоптериды *Chaetopterus*. Это контрастирует с классическими исследованиями развития кольчатых червей, показывающими, что личинки кольчатых червей обычно производят одновременно первые (три) ларвальных сегмента, в то время как более поздние сегменты последовательно добавляются сзади.

Исследование выполнено в рамках проекта РНФ 20-74-10011.

Протеасомы тонкого кишечника крысы в раннем онтогенезе

Н.С. Карпов*¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* *karizamartis@gmail.com*

Исследование молекулярных механизмов развития органов важно для фундаментальной науки, а также может быть полезно для выявления причин различных патологий. Протеасомы – мультипротеазные белковые комплексы – представляются значимым компонентом молекулярных механизмов развития. Состав протеасом в разных органах может изменяться в течение онтогенеза. Среди протеасом млекопитающих особое место занимают иммунные протеасомы, отличающиеся от конститутивных протеасом протеолитическими субъединицами и регуляцией их активности. Иммунные протеасомы образуют эпитопы, которые, связываясь с МНС I, принимают участие в иммунном ответе, а некоторые субтипы иммунных протеасом, по-видимому, обеспечивают и тканевое взаимодействие клеток посредством образования коротких пептидов. Ранее были получены данные о протеасомных механизмах развития селезенки, тимуса и печени – органов, выполняющих непосредственную роль в функционировании иммунной системы. Исследования протеасом в развитии кишечника, выполняющего важнейшие функции не только в пищеварении, но и в иммунных процессах, на данный момент недостаточны. Целью работы было изучить особенности протеасомного пула в раннем развитии кишечника крысы.

Проведенное исследование показало, что содержание протеасом в клетках кишечника практически не меняется в течение раннего онтогенеза. При этом изменяются различные протеазные активности: растут после 18 эмбрионального дня, достигая максимума в промежуток между 5 и 15 постнатальными днями. К 22 постнатальному дню активности уменьшаются. Динамика различных активностей различается в деталях: химотрипсинподобная и LMP7 активности падали к 22 постнатальному дню существенно в меньшей степени по сравнению с каспазаподобной и LMP2 активностями. Также к 30 постнатальному дню химотрипсинподобная и LMP7 активности возрастали до максимальных уровней. Для оценки влияния фактора пола на образование резких переломов в динамике активностей, сравнили активности протеасом тонкого кишечника самок и самцов крыс. Оказалось, что фактор пола не оказывает влияния на активности протеасом. Для выяснения причины изменения активностей, было исследовано количество протеолитических иммунных субъединиц и различных активаторов протеасом. Оказалось, что уровень иммунных субъединиц протеасом возрастает в раннем онтогенезе, что смещает баланс протеасом в сторону иммунных субтипов и может быть причиной изменения активностей протеасом. Кроме того, увеличивается количество активатора PA28 $\alpha\beta$, участвующего, в основном, в адаптивных процессах. Напротив, содержание активатора PA700, отвечающего узнавание в транслокацию убиквитинированных белков в протеолитическую камеру протеасом, на протяжении онтогенеза остается постоянным. Таким образом, протеасомы на различных этапах раннего онтогенеза кишечника востребованы по-разному. Адаптация к микробиоте и переход на самостоятельное питание требует перестройки протеасомного пула в сторону обогащения иммунными протеасомами, которые и обеспечивают эту адаптацию.

Автор работы выражает искреннюю благодарность научному руководителю, Астаховой Татьяне Михайловне за поддержку на всех этапах работы, помощь в экспериментальной работе и неоценимую помощь в познании; руководителю проекта и заведующему лабораторией – Наталье Петровне Шаровой – за полезные в работе профессиональные советы и чуткое руководство.

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0088-2021-0008 в ФГБУН Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Становление осей симметрии в раннем развитии аннелид (на примере представителей *Errantia*, *Sedentaria* и *Clitellata*)

В.В. Козин*¹, А.И. Кайров¹, Ф.А. Сидоренко¹, Н.Н. Римская-Корсакова², Р.П. Костюченко¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* *vitaly.kozin@mail.ru*

Проблема становления осей симметрии является ключевым моментом в понимании механизмов индивидуального развития и причин таксономического биоразнообразия. Смена первичной анимально-вегетативной полярности и радиальной симметрии яйца на дефинитивную осевую организацию имеет большое филогенетическое значение. Осевые отношения в развитии аннелид характеризуются большим разнообразием и сложностью. Теоретическая проработка этого вопроса нуждается в ревизии, поскольку прежние построения не согласуются с актуальными филогенетическими и молекулярно-генетическими данными. Сравнительное изучение осевой спецификации в эмбриогенезе аннелид на современном методическом уровне позволит выявить фундаментальные принципы эволюции программ развития. С этой целью мы проводим единообразный анализ развития нескольких видов, относящихся к эррантным (*Alitta virens*), седентарным (*Ophelia limacina*) и поясковым (*Enchytraeus coronatus*) аннелидам. На прижизненном и фиксированном материале были прослежены основные клеточные линии, установлена временная динамика морфогенезов в норме и под влиянием фармакологических ингибиторов.

Самые ранние признаки спецификации дефинитивных осей симметрии проявляются в ходе гетероквадрантного спирального развития *A. virens* и *E. coronatus* уже на четырехклеточной стадии. При этом клеточная линия дорсального бластомера D обладает существенными отличиями от остальных квадрантов. В случае гомоквадрантного спирального дробления *O. limacina* строгая симметрия вращательного характера нарушается лишь после шестого раунда деления, когда клетки 4d и 4D вступают в митоз с небольшим опережением. С этим моментом развития *O. limacina* связано особое, неопианное ранее для аннелид событие – выпячивание одного из макромеров в бластоцель, приводящее его в контакт с анимальными клетками. Как показано на моллюсках, подобные контактные взаимодействия в период дробления критически важны для спецификации и активации дорсальной клетки-организатора. Вероятно, этот механизм дорсовентральной поляризации был унаследован от общего предка Trochozoa или Spiralia.

Выяснение молекулярной природы межклеточных взаимодействий у зародышей Spiralia представляет большой интерес. У обозначенных аннелид нами была проведена оценка вовлеченности Wnt сигналинга в ранние события осевой спецификации. С помощью ингибиторного анализа нам удалось добиться существенных аномалий развития, затрагивающих осевую организацию. Наиболее значительные отклонения, такие как экзогастрюляция и отсутствие маркеров заднего полюса, были получены у *A. virens* и *O. limacina*, тогда как детерминация осей *E. coronatus* оказалась менее чувствительной к модуляции Wnt. Наши результаты говорят о критической роли зависимой спецификации осей у аннелид. В меньшей степени эта роль проявляется у ранних зародышей поясковых аннелид, что коррелирует с редукцией клеточного материала анимального полюса и выработкой дополнительных механизмов избирательного наследования ооплазматических детерминантов.

Работа выполнена на базе Морской биологической станции СПбГУ (УНБ «Беломорская»), РЦ ММ СПбГУ и ББС МГУ при поддержке грантов МК-1164.2020.4 и РФФ № 17-14-01089.

Отсроченное влияние неонатальных фебрильных судорог на экспрессию генов метаботропных рецепторов глутамата в гиппокампе крыс

П.И. Колегова^{*1,2}, А.А. Коваленко², М.В. Захарова², А.П. Шварц²

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

* *p_kolegova@mail.ru*

Эпилепсия – тяжелое неврологическое заболевание, сложно поддающееся лечению. Предполагается, что одним из основных факторов ее развития в подростковом и взрослом возрасте является нарушение формирования возбуждающей глутаматной системы мозга, возникающее на начальных этапах раннего постнатального онтогенеза. При этом одним из повреждающих факторов могут быть неонатальные фебрильные судороги (ФС). Данное исследование проведено с целью изучения влияния ФС на формирование метаботропных рецепторов глутамата.

Метаботропные рецепторы модулируют работу глутаматергического синапса за счет влияния на активность NMDA глутаматных рецепторов. Они вовлечены в регуляцию процессов памяти, обучения, ощущении тревоги, восприятию боли и других функций. Эти рецепторы включают восемь подтипов, разделенных на три группы в зависимости от аминокислотной последовательности, фармакологических свойств и путей передачи сигналов. Активация рецепторов I группы (mGluR1 и mGluR5) приводит к повышению активности рецепторов NMDA и риска эксайтотоксичности, активация рецепторов II (mGluR2 и mGluR3) и III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 и mGluR8) групп – к их снижению.

В данной работе проведена оценка отсроченного влияния ФС, перенесенных на 10-11 сутки жизни на экспрессию в подростковом возрасте генов *Grm1*, *Grm2*, *Grm3*, *Grm5*, *Grm7* и *Grm8*. ФС индуцировали нагреванием крысят потоком теплого воздуха температурой 45-46 градусов. После появления судорог, каждые 2 минуты измеряли ректальную температуру, не допуская ее повышение выше 42 градусов. Эксперимент продолжался 30 минут, после отдыха и нормализации температуры крысенка возвращали к матери в домашнюю клетку. Животных, у которых судороги не наблюдались, из эксперимента исключали. В контрольную группу включали крысят из тех же пометов, которые на аналогичное время были отлучены от матери, но не подвергались действию высокой температуры; еще одна контрольная группа была сформирована из интактных крысят из тех же пометов. Мозг для анализа извлекали на 14 и 21 сутки жизни. Анализ экспрессии генов интереса и референсного гена циклофилина А производили методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Выявлено, что ФС вызывают подавление экспрессии генов *Grm1* и *Grm5* в дорзальном гиппокампе. Эти изменения могут отражать запуск нейропротекторных механизмов в отношении развития эксайтотоксичности, однако, с другой стороны, результатом подавления экспрессии названных генов может являться развитие когнитивного дефицита у экспериментальных животных.

Поддержано грантом РФФИ N 21-15-00430.

Развитие уникальной провизорной структуры – липидного мешка и пищеварительной системы пелагических личинок пятнистого лептоклинуса *Leptoclinus maculatus*, обитающего в акватории о. Западный Шпицберген

Е.А. Кондакова*^{1,2}, С.Н. Пеккоева³, С. Фальк-Петерсен^{4,5}, Й. Берге^{5,6}, С.А. Мурзина³

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

² Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии - «ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга», Санкт-Петербург, Россия;

³ Институт биологии - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук";

⁴ "Акваплан-нива", Фрам Центр, Тромсё, Норвегия;

⁵ Арктический университет Норвегии (UiT), Тромсё, Норвегия;

⁶ Университетский центр на Шпицбергене (UNIS), Лонгйир, Норвегия

* 23eak@mail.ru

Арктическо-бореальная рыба пятнистый лептоклинус *Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838) играет важную роль в морских экосистемах, выступая промежуточным звеном в передаче и трансформации липидов и их жирных кислот от беспозвоночных к млекопитающим и птицам. Для пелагической молодежи *L. maculatus* характерна уникальная провизорная структура – липидный мешок (ЛМ). Известно, что ЛМ располагается под кишкой и состоит из билатерально расположенных полостей, наполненных липидами. Внутренний слой стенок этих полостей является симпластом с многочисленными ядрами, наружный – соединительной тканью.

В настоящей работе представлены новые данные о постэмбриональном развитии *L. maculatus*, в частности, об образовании ЛМ и пищеварительной системы.

Молодь *L. maculatus* на стадиях развития L1 (n=6), L2 (n=4), L3 (n=2) была отловлена в акватории фьордов западного побережья о. Западный Шпицберген (Рипфьорд, Конгсфьорд, Исфьорд, Биллефьорд) и зафиксирована в 4% формалине. Для гистологического исследования серийные парафиновые срезы толщиной 6 мкм были окрашены гематоксилином Карацци и эозином.

В возрасте L1 у разных особей можно видеть разные стадии развития ЛМ. Обнаружены многочисленные крупные клетки, которые могут иметь более одного ядра, располагающиеся внутри тяжа соединительной ткани. Нами с осторожностью выдвинуто предположение о том, что данные клетки являются предшественниками синцития ЛМ. У других личинок ЛМ состоял из дискретных полостей, наполненных липидами. Эти компартменты также окружены и связаны друг с другом соединительной тканью. К стадии L2 ЛМ окончательно сформирован. Средняя длина ядер синцития на стадии L1 составляет $6.29 \pm 0.11 \mu\text{m}$ (n=260, где n – количество ядер, 4 личинки). Большинство ядер правильной формы.

Впервые получены данные о развитии пищеварительной системы на L1-L3 стадиях развития. Так, эпителий ротоглоточной полости стратифицированный, неравномерной толщины, с единичными слизистыми клетками. Имеются челюстные и глоточные зубы на разных стадиях развития. Вкусовые почки редки. Эпителий пищевода стратифицированный, с многочисленными слизистыми клетками, но в дистальной части пищевода эпителий простой столбчатый, без слизистых клеток. Желудочные железы на стадиях развития L1-L3 отсутствуют. Эпителий кишки имеет складки. На стадии L1 гепатоциты содержат липидные включения, которые становятся более заметными на стадиях L2 и L3.

В рамках проведённого исследования были получены первые данные о ранних этапах развития уникальной провизорной структуры, липидного мешка. Установлено, что для молодежи *L. maculatus* характерно продолжительное развитие пищеварительной системы с поздним появлением желудочных желез.

Сбор материала исследования выполнен в научной экспедиции в рамках курса «AV320/820 – Zooplankton in Svalbard waters» Университетского центра на Шпицбергене при финансовой поддержке проектов «SpitsEco» (ES504895), «ArcticABC» (No 244319), the Norwegian Research Council. Коллектив авторов выражает благодарность команде норвежского научного судна «Helmer Hanssen» (UiT) за техническую поддержку на борту и РЦ РМИКТ СПбГУ.

Участие piРНК-пути в видообразовании и репродуктивной изоляции у *Drosophila melanogaster*

А.А. Котов*¹, В.Е. Адашев¹, С.С. Базылев¹, Л.В. Оленина¹

¹Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" - Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

* kotov_alexei@mail.ru

Одним из ключевых механизмов поддержания целостности генома в клетках зародышевого пути является piРНК-путь. Короткие piРНК (piwi-interacting RNAs) происходят из определенных геномных локусов, piРНК-кластеров, и в комплексе с белками ARGONAUTE специфично подавляют экспрессию РНК-мишеней. Основными мишенями piRNA являются мобильные элементы, однако piРНК способны подавлять экспрессию и белок-кодирующих генов.

У самцов *D. melanogaster* наиболее активным piРНК-кластером является *Su(Ste)*, расположенный на Y-хромосоме. Мишенью piРНК *Su(Ste)* являются тандемные гены *Ste* на X-хромосоме. Их дерепрессия приводит к появлению белковых агрегатов, мейотическим нарушениям и стерильности. Система *Ste-Su(Ste)* фиксирована только в геноме *D. melanogaster*. Согласно нашим данным, приобретение этой системы частью древней популяции мух, является одним из факторов гибридной стерильности при скрещивании самок мух, несущих повторы *Ste*, с самцами, у которых отсутствуют Y-сцепленные *Su(Ste)*-повторы.

Анализ piРНК в семенниках мух позволил идентифицировать другие кластеры, производящие piРНК к белок-кодирующим генам. Второй по представленности piРНК-кластер после *Su(Ste)*, состоящий из множества геномных повторов, *AT-chX*, расположен на X-хромосоме. Повторы имеют гомологию с экзонами гена *vasa*, консервативным фактором гаметогенеза у эукариот. мРНК *vasa* избегает сайленсинга у *D. melanogaster* из-за недостаточной комплементарности с *AT-chX* piРНК. Однако повторы *AT-chX* имеют очень высокую гомологию с генами *vasa* близкородственных видов (более 90%), и *AT-chX* piРНК могут эффективно подавлять их экспрессию у самцов межвидовых гибридов. Другой идентифицированный нами на Y-хромосоме видоспецифичный кластер, *petrel*, производит большое количество piРНК к X-хромосомному гену *pirate* (*CG12717*) и способен подавлять его экспрессию в семенниках мух. Короткие РНК к гомологу *pirate* отсутствуют у *D. simulans*, в то время как у *D. mauritiana* нами обнаружен другой класс коротких РНК комплементарных гену *pirate* – siРНК (small interfering RNAs). По всей видимости, в процессе эволюции *D. mauritiana* был выбран другой механизм подавления экспрессии гена *pirate*.

Одним из основных условий видообразования является прекращение потока генов между видами. По одной из гипотез половые хромосомы гетерогаметных организмов много раз возникали независимо из аутосом, при этом процессы эволюции X- и Y-хромосом отличаются. На Y-хромосоме наблюдается накопление мутаций, псевдогенизация белок-кодирующих генов, амплификация повторяющихся последовательностей ДНК и высокий уровень гетерохроматинизации. В то время как X-хромосома характеризуется сохранением предковых генов, поддержанием эухроматиновых участков и развитием механизмов компенсации, уравнивающих потерю генов на Y-хромосоме. Формирование таких видоспецифичных механизмов приводит к изоляции молодых видов в процессе эволюции. Согласно нашим данным, piРНК-путь является одним из механизмов участвующим в процессе репродуктивной изоляции и видообразования.

**Разнообразие фенотипов гонофоров у генетически полиморфных гидроидов *Sarsia lovenii*
(Hydrozoa: Corynidae) из Белого моря**

С.В. Кремнёв*^{1,2}, А.А. Ветрова², А.А. Прудковский¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* *s.kremnyov@gmail.com*

Сложный жизненный цикл гидроидных включает пелагическую медузоидную и донную полипоидную стадии развития. Медузоидные особи, гонофоры, развиваются на донных гидроидах и формируют гонады после отрыва медузы от материнской колонии. Редукция медузоидного поколения - широко распространённая эволюционная тенденция среди гидроидных. Редуцированные медузоидные особи утрачивают многие черты строения свободноплавающей медузы и формируют половые продукты, не отрываясь от материнской колонии. Молекулярные механизмы редукции медузы у гидроидных пока мало изучены. Ранее для Белого моря была описана сложная популяционная структура гидроидных *S. lovenii*, которая включает две гаплогруппы с разными типами гонофоров, а также доказана возможность гибридизации между этими гаплогруппами. Целью нашей работы было более полное описание внутривидового генетического разнообразия у *S. lovenii* в Белом море с использованием митохондриального (COI) и ядерного (ITS) фрагментов ДНК, а также поиск морфологических отличий в строении гонофоров. В работе использовались колонии гидроидов *S. lovenii*, собранные в акватории беломорской биостанции им. Н.А. Перцова, а также колонии, полученные экспериментально при скрещивании половых продуктов гонофоров разных типов (медуз и медузоидов). При анализе строения гонофоров было выявлено четыре морфотипа: 1) свободноплавающие медузы, которые рано отпочковываются от материнской колонии и формируют гонады в процессе длительного периода жизни в пелагиали; 2-3) два морфотипа гонофоров, которые долгое время удерживаются на материнской колонии и формируют гонады до момента отрыва от колонии, а в случае отрыва от материнской колонии они способны к активному движению; 4) медузоиды, которые не отпочковываются от материнской колонии и не способны к активному движению в случае случайного отрыва. Перечисленные морфотипы отличались формой и размерами колокола, строением щупальцевых бульб, наличием или отсутствием глазков и щупалец, формой манубриума. Каждый из выявленных морфотипов гонофоров имел свой характерный период появления на колониях гидроидных в море. По результатам анализа митохондриального (COI) и ядерного (ITS) фрагментов ДНК было установлено, что выделенные морфотипы маркируют генетическую структуру вида: генетический вариант "медуза", "медузоид" и гибридные формы. Предполагается использовать данный вид со сложной генетической структурой как модель для исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе видообразования, сопряженного с эволюцией сложного жизненного цикла.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-74-00129.

Изучение специфической экспрессии гена *tth D. melanogaster* с помощью флуоресцентных репортеров в двухкомпонентной системе UAS/Gal4

Е.Е. Куваева*¹, И.Б. Мерцалов¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* *lena_kuv@mail.ru*

Ген *tth* относится к семейству генов *d4*, которые представляют собой эволюционно консервативную группу генов дифференциально экспрессирующихся в центральной и периферической нервной системе. У дрозофилы обнаружено два гена-гомолога семейства, один из которых кодирует

белок с характерным С-концевым доменом цинковых пальцев PHD-типа, или D4-доменом. *tth* является уникальным, характерным лишь для двукрылых насекомых геном, кодирующим белок без домена D4. Белки семейства D4 дрозофилы входят в состав нейрональных хроматин-ремоделлирующих SWI/SNF-подобных ВАР комплексов, характерных для дифференцированных нейронов, но не нейробластов. Однако до сих пор не ясна роль генов семейства *d4* и их продуктов в развитии и функционировании нервной системы.

С целью выяснения функции *tth* в нашей лаборатории был проведён его нокаут, который показал нарушение развития оптических зачатков мозга эмбрионов. Однако антитела, специфично связывающиеся с целевым белком, не выявили локализации *tth* в оптических долях центральной нервной системы вследствие высокого уровня фона.

Для изучения специфической картины экспрессии *tth* нами были получены линии дрозофил, имеющих в геноме дополнительный локус гена, модифицированный для экспрессии флуоресцентно-меченного химерного белка ТТН::GFP и дрожжевого транскрипционного фактора Gal4 под промотором *tth*.

Анализ экспрессии ТТН::GFP показал, что его распределение и локализация у личинок соответствует картине, полученной с помощью специфических антител: в ядрах клеток кольцевой железы и слюнных желёз. Это говорит о том, что дополнительный локус *tth* длиной 22 т.п.о. функционирует как эндогенный. Однако чрезвычайно слабая экспрессия химерного белка не позволяла получить чёткую картину локализации ТТН в ЦНС. Для амплификации флуоресцентного сигнала мы использовали двухкомпонентную систему UAS-Gal4, для этого скрестили мух линии-драйвера *tth-Gal4* с мухами двух репортерных линий, одна из которых экспрессирует GFP в мембранах, другая - RFP в ядрах нейронов. Это позволило установить, что ген *tth* экспрессируется в клетках слюнных желёз, ядрах кольцевой железы, хордотональных органах кутикулы, клетках органа Болвига, нейронах зрительной области ЦНС (в нейронах ламины), нейронах центрального нейропиля, а также в глазо-антенном имагинальном диске и глазном стебельке в мембранах аксонов фоторецепторных нейронов. Дальнейший интерес представляет изучение совместной картины экспрессии ТТН и известных белков-маркеров нейронов ЦНС, участвующих в развитии зрительной системы дрозофилы.

Таким образом, по предварительным данным ген *tth* участвует в развитии центральной и периферической нервной системы, и в частности, зрительных органов дрозофилы.

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке раздела Государственного задания ИБР РАН 2021 года № 0088-2021-0007; Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

Клеточные и молекулярные механизмы агрегации клеток и восстановления исходной организации у губки *Halisarca dujardini*

А.И. Лавров^{*1}, И.Е. Борисенко², Ф.В. Большаков¹, Д.М. Саидов¹, В.С. Фролова³

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

³ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* *lavrovai.bio@yandex.ru*

Губки (тип Porifera) являются одной из базальных ветвей многоклеточных животных, которые по своей общей организации значительно отличаются от Eumetazoa. Одной из наиболее характерных черт организации губок является многофункциональность, высокая пластичность и динамика их тканей. Эти черты лежат в основе множества процессов жизнедеятельности губок, в том числе и регенерации. Регенеративные способности губок весьма велики: от репаративной регенерации после небольших повреждений до полного восстановления особи из небольшого фрагмента тела или суспензии клеток.

Восстановление губки из суспензии клеток, процесс реагрегации, являясь наиболее ярким проявлением регенеративных способностей губок, остается малоизученным.

Наша работа посвящена исследованию общей динамики, клеточных и молекулярных механизмов реагрегации клеток и восстановления исходной организации у губки *Halisarca dujardini* (кл. Demospongiae).

Подробные прижизненные и гистологические исследования показали, что в процессе реагрегации клеток *H. dujardini* можно выделить несколько ключевых стадий: 1) первичные многоклеточные агрегаты, 2) эпителизированные многоклеточные агрегаты (примморфы), 3) развивающиеся примморфы, 4) функциональная губка. Для процесса реагрегации клеток *H. dujardini* характерна внутривидовая вариабельность (в скорости и успешности протекания процесса), одной из причин которой является физиологическое состояние тканей губки, использованной для получения суспензии клеток.

Морфогенетические преобразования и формирование основных анатомических структур при развитии агрегатов происходит благодаря мезенхимальным морфогенезам - миграциям клеток, их (транс)дифференцировкам и мезенхимально-эпителиальным трансформациям. Основным клеточным источником являются амебоциты, пул которых возникает в результате массовой дедифференцировки различных клеточных типов при формировании первичных многоклеточных агрегатов.

С помощью метода TUNEL были обнаружены единичные апоптотические ядра и тельца на ранних этапах реагрегации (первичные многоклеточные агрегаты, примморфов). На более поздних стадиях развития апоптотические ядра и тельца отсутствуют.

Пролиферативная активность клеток высока на ранних стадиях реагрегации *H. dujardini*. К моменту формирования примморфов пролиферация почти полностью затухает, но при дальнейшем прогрессивном развитии снова восстанавливается до уровня интактных тканей губки.

Исследование активности генов сигнальных путей Wnt и TGF-beta методами RNA-seq и гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* выявило пространственно-временные изменения экспрессии некоторых из них. Так, лиганды Wnt и TGF-beta дифференциально экспрессируются при развитии агрегатов; транскрипты некоторых генов локализованы на полюсах агрегатов, формируя градиенты. Вероятно, эти сигнальные пути вовлечены в закладку и формирование новой оси восстанавливающейся губки в ходе прогрессивного развития примморфов.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-04-00545.

Влияние пренатального стресса на поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

А.С. Мартюшева*¹, А.Ю. Субботина¹

¹ Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия

* nphys@nphys.ru

Изучено влияние пренатального стресса на поведение крыс в разные периоды онтогенеза. Опыты проведены на 96 крысах Wistar обоих полов (12 групп по 8 особей) – полученных от самок из группы контроля и стрессированных с 10-го по 16-й день беременности на модели принудительного плавания в воде (10°C) в течение 5 мин. Руководствовались принципами гуманности (2010/63/EU). На 21-й, 30-й и 60-й день постнатального онтогенеза крыс помещали в приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) на 5 мин с регистрацией стандартных параметров поведения. Статистическую значимость различий оценивали Т-критерием Вилкоксона и U-критерием Манна-Уитни при уровне не менее $p < 0,05$.

Установлено, что самцы группы контроля в инфантильном возрасте (30 сут) чаще посещали открытые рукава (ОР) по сравнению с особями молочного кормления (21 сут). При этом время, проведенное в закрытых рукавах (ЗР), у самцов 30-го дня жизни было меньше, чем у 21-дневных особей.

Контрольные самки в ювенильном возрасте (60 сут) реже посещали ОР по сравнению с 30-дневными особями.

Анализ исследовательской активности у контрольных крыс показал, что самцы в 30-ти и 60-дневном возрасте по количеству свешиваний (СВ) превосходили показатели 21-дневных особей. У 60-дневных самок число вертикальных стоек (ВС) превышало данный показатель у особей молочного кормления.

При оценке влияния пренатального стресса на параметры поведения крыс получены следующие результаты. Самцы в 30-ти и 60-дневном возрасте проводили меньше время в ЗР, чем 21-дневные особи. Напротив, время нахождения в ОР у пренатально стрессированных самцов 60-го дня жизни было значимо больше, чем у особей молочного кормления. Эта группа особей в ювенильном возрасте проводила больше времени в ОР по сравнению с контролем. Пренатально стрессированные самцы 60-го дня жизни реже посещали ЗР по сравнению с контролем.

Самки из группы стресса в инфантильном возрасте чаще посещали ЗР, чем особи молочного кормления; на 30-й день жизни они чаще заходили в ЗР по сравнению с контрольными особями. Пренатально стрессированные самки ювенильного возраста, реже заходили в ЗР по сравнению с 30-дневными.

Показатель исследовательской активности – число СВ – у крыс обоих полов инфантильного и ювенильного возраста группы стресса был больше, чем у 21-дневных особей. У 21-дневных самок группы стресса этот параметр было меньше, чем в контроле. Пренатально стрессированные самки 30-го и 60-го дня жизни демонстрировали большее количество ВС по сравнению с 21-дневными особями.

Таким образом, пренатальный стресс плавания в холодной воде приводит к более выраженным изменениям поведения в ПКЛ у самок по сравнению с самцами. Это проявляется в снижении исследовательской активности и повышении уровня тревожности самок в возрасте молочного кормления, которые нормализуются в более поздние периоды постнатального онтогенеза. Пренатально стрессированные самцы в ювенильном возрасте характеризуются уменьшением тревожности по показателям пребывания в закрытых и открытых рукавах лабиринта.

Авторы выражают благодарность директору НИИИФ им. П.К. Анохина, чл.-корр. РАН С.С. ПЕРЦОВУ за научное руководство и помощь в выполнении представленной работы.

РНК матрицы Нох-генов в ооцитах - транскрипционный шум или специфичная экспрессия?

Г.П. Маслаков*¹, Н.С. Кулишкин¹, А.А. Суркова¹, М.А. Кулакова¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

* gequris@gmail.com

Активация зиготического генома в процессе индивидуального развития многоклеточных организмов - это часть сложного процесса oocyte-to-embryo transition, в ходе которого происходит перепрограммирование тотипотентных и плюрипотентных клеток раннего эмбриона. До активации зиготического генома всеми процессами управляют материнские РНК и белки. У многих животных они определяют разметку первичного морфогенетического поля (ооцита) и . настраивают работу зиготического генома.

Нох-гены определяют клеточные судьбы вдоль передне-задней оси тела почти всех билатерально-симметричных животных. В большинстве случаев, их скоординированная во времени и пространстве экспрессия начинается вместе с гастрულიей и для некоторых животных (позвоночные) тесно сопряжена с ней. Функция регионализации, которая лежит на Нох-кластере, несовместима с состоянием плюрипотентности. У ранних эмбрионов EuMetazoa транскрипционное «молчание» и потенциал к дальнейшей быстрой активации зиготического набора Нох-генов обеспечивается бивалентным состоянием Нох-локусов, когда репрессивные и пермиссивные эпигенетические метки

сочетаются.. Наш объект – эррантная средиземноморская аннелида *Platynereis dumerilii*, удобный модельный объект в линии спиральных животных. В нашем прошлом исследовании мы показали методом RT-PCR, что в ооцитах червя присутствуют материнские РНК большинства Нох-генов, и что, по крайней мере, один из Нох-генов (*Pdum-Hox4*) имеет и смысловой и антисмысловой транскрипты. Мы продолжили эту работу и хотим представить её результаты. Методом WMISH мы проанализировали локализацию всех материнских Нох-транскриптов в ооцитах и оценили количественный уровень сигнала относительно контрольных образцов. Кроме того, мы использовали интрон-фланкирующие праймеры для RT-PCR и выяснили, что материнские РНК шести Нох-генов сплайсируются классическим образом. Это означает, что потенциально они могут транслироваться. Антисмысловые РНК большинства Нох-генов были выявлены *in situ*-гибридизацией, а в случае трёх генов (*Pdum-Hox1*, *Pdum-Hox4*, *Pdum-Hox7*) наличие таких транскриптов подтвердилось методом нить-специфичной (strand-specific) RT-PCR.

Существуют исследования, в которых материнские транскрипты, а иногда и белки Нох-генов, обнаруживаются в ооцитах млекопитающих. Полный набор Нох-транскриптов найден в ооцитах многоножки *Strigamia*. Наше исследование на аннелидах, как и вышеупомянутые работы, высвечивает факты, которые идут вразрез с классическим представлением о функциях Нох-генов. Вероятно, мы столкнулись с неизученной, эволюционно-консервативной и паралог-неспецифической функцией Нох-кластера, которая прослеживается у животных из трёх разных эволюционных ветвей (млекопитающие, многоножки и аннелиды). Мы предполагаем, что материнский набор Нох-генов может контролировать базовые процессы оогенеза, такие, как аутофагия и/или участвовать в эпигенетической настройке зиготических Нох-локусов.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Центра коллективного пользования СПбГУ "Хромас" за помощь в работе.

Работа была поддержана грантом РФФИ (19-14-00346).

Влияние полета на фонотаксис двупятнистого сверчка: роль серотонина

М.И. Межеричкий*¹, В.Е. Дьяконова¹, Д.Д. Воронцов¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* *labor405@gmail.com*

Полет является распространенным энергозатратным видом двигательной активности насекомого, который оказывает значительное влияние на метаболизм. В естественной среде ближние и дальние миграции зачастую предшествуют размножению. При этом о возможном влиянии полета на последующее половое поведение насекомых известно немного.

Мы исследовали влияние полета на последующий наземный фонотаксис *Gryllus bimaculatus*. Фонотаксис, в данном случае - поведение, во время которого самка приближается к самцу, реагируя на акустический призывной сигнал (песню самца). Фонотаксис рассматривается как первый этап брачного поведения сверчков, который предшествует песни ухаживания и копуляции. Нами было показано, что полет значительно усиливал последующий фонотаксис как у самок, так и у самцов. Усиление фонотаксиса проявлялось главным образом в том, что сверчки лучше реагировали на призывной сигнал конспецифика: чаще подходили к динамику, транслирующему призывную песню самца, и проводили больше времени рядом с источником звука.

Далее мы проверили предположение о том, что усиление фонотаксиса после полета связано в основном с действием серотонина. Серотонин вовлечен в обеспечение локомоторной активности у многих видов позвоночных и беспозвоночных животных, а также он модулирует социальное поведение, через усиление восприимчивости животных к социальным стимулам. У сверчков в ЦНС экспрессируются по крайней мере пять типов рецепторов к серотонину. Ранее было показано, что серотонин уменьшает рефрактерный период копуляции у самцов двупятнистого сверчка. Для проверки роли серотонина в эффектах полета на фонотаксис сверчкам были сделаны инъекции его метаболического

предшественника 5-гидрокситриптофана (5-НТР), т.к. сам серотонин, не проходит или плохо проходит гематоэнцефалический барьер у данного вида насекомых. Результатом стало значительное усиление фонотаксиса, сходное с эффектом полета у самок и у самцов. Дальнейшие эксперименты показали, что удаление серотонина из ЦНС путем введения синтетической аминокислоты альфа-метилтриптофана (АМТР) блокировало фонотаксис у сверчков после полета.

Таким образом, мы выяснили, что полет существенно влияет на усиление фонотаксиса сверчков обоих полов и серотонин играет ключевую роль в данном процессе. Продемонстрированный эффект полета может быть адаптивным в естественных условиях, т.к. усиление способности к обнаружению конспецификов дает дополнительные возможности для выживания и размножения.

РФФИ №19-04-00628.

Сравнительный анализ клеточной пролиферации, миграции и смерти в интактных тканях губок

Н.П. Мельников*¹, А.А. Саидова¹, А.И. Лавров¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* melnikov.nikolay.2016@post.bio.msu.ru

Процессы клеточной пролиферации, миграции и запрограммированной смерти сопровождают развитие многоклеточных животных. В постэмбриональном периоде эти процессы играют значительную роль в поддержании гомеостаза тканей взрослого организма. Долговременное функционирование тканей основано на постоянном возобновлении: старые и поврежденные клетки элиминируются, в то время как их место занимают потомки соматических стволовых клеток.

Представители типа Porifera являются важными объектами для изучения механизмов возобновления тканей. Губки являются одной из базальных ветвей многоклеточных животных и отличаются уникальными особенностями тканевой динамики: широко известны их способности к бесполому размножению, регенерации, реагрегации и перестройке своих тканей. Данная работа посвящена сравнительному анализу динамики гибели и пролиферации интактных тканей губок *Halisarca dujardinii* (Demospongiae) и *Leucosolenia variabilis* (Calcarea).

Использование меченых нуклеотидов EdU (маркер S-фазы клеточного цикла) и антител к фосфорилированному третьему гистону рН3 (маркер поздней G2 и M-фаз) выявляет в интактных тканях данных губок значительное количество пролиферирующих клеток (6-8% и 9,5-12% у *H. dujardinii* и *L. variabilis*, соответственно). Основной тип пролиферирующих клеток – жгутиковые клетки водоносной системы, хоаноциты. Активность пролиферации остается постоянной в участках тела, которые содержат водоносную систему; тем не менее, редкие меченые клетки обнаруживаются вне хоанодермы. Клеточная гибель была исследована с помощью окраски CellEvent (маркер эффекторных каспаз) и TUNEL (маркер двухцепочечных разрывов в ДНК). Оба метода выявляют незначительное количество апоптотических клеток (менее 1%).

Меченые нуклеотиды остаются в клетках после деления, что позволяет отслеживать миграцию пролиферирующих клеток и их потомков; при помощи окраски мембран клеточным трекером CellTracker Deep Red возможно идентифицировать типы EdU-положительных клеток. В тканях *H. dujardinii* со временем наблюдается накопление EdU в клетках мезохила – археоцитах; параллельно этому процессу наблюдается появление меченых клеток других типов. В случае *L. variabilis* не происходит значительного накопления метки в мезохиле или пинакодерме; однако, она обнаруживается в ядрах пороцитов, эндо- и экзопинакоцитов, что указывает на возможную миграцию и дифференцировку пролиферирующих клеток.

Так как хоаноциты сохраняют в своих ядрах EdU, основное физиологическое значение их пролиферации заключается в поддержании гомеостаза хоанодермы. Они могут также участвовать в восполнении пула клеток мезохила: маловероятно, что увеличение доли меченых клеток мезохила

обеспечивается исключительно пролиферацией редких резидентных EdU- и pH3-положительных клеток. Мы предполагаем активное выселение хоаноцитов или их потомков в мезохил с последующей трансдифференцировкой. Таким образом, хоаноциты являются кандидатами на роль соматических стволовых клеток как у известковых, так и обыкновенных губок.

Работа поддержана грантом Президента РФ МК-1096.2021.1.4.

Роль компонентов системы piРНК-интерференции в регуляции ретротранспозонов в соматических тканях *D. melanogaster*

П.А. Миляева*¹, Л.Н. Нефедова¹, А.Р. Лавренов^{1,2}, М.Л. Никитина¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

* *atemed@mail.ru*

Система piРНК-интерференции - многостадийный процесс, включающий в себя обширный спектр белков, образующих сложные комплексы, необходимые для регуляции активности ретротранспозонов. Компоненты этой системы присутствуют у всех классов эукариот, но наиболее подробно изучены у дрозофилы, нематоды и мыши.

У дрозофилы в соматических клетках яичников и клетках зародышевого пути обнаружены два разных механизма piРНК-интерференции, которые используют разные источники piРНК. Размеры источников piРНК варьируют от одной копии мобильного элемента до большого скопления копий различных мобильных элементов - piРНК-кластеров. По своей организации и способам регуляции они могут отличаться друг от друга.

В последнее десятилетие новым направлением в области изучения piРНК-интерференции стало исследование роли её компонентов в соматических тканях. На дрозофиле показано, что кластер *flamenco* необходим для формирования нервной системы у личинок и имаго: личинки и самки имаго с пониженной экспрессией гена *caz* и повышенной экспрессией гена *aub*, участников piРНК-интерференции, демонстрировали снижение скорости передвижения из-за нарушения процессинга транскриптов кластера *flamenco*. Кроме того, небольшое количество piРНК и транскриптов центральных участников системы piРНК-интерференции присутствует в тканях головы дрозофилы.

Целью данного исследования было оценить вклад отдельных компонентов системы piРНК-интерференции в регуляцию ретротранспозонов в соматических тканях *Drosophila melanogaster*.

Измерение экспрессии различных ретротранспозонов в тканях головы, яичников и каркаса семидневных самок имаго, а также ЦНС личинок третьего возраста показало, что регуляция ретротранспозонов в тканях каркаса и головы различается. ДКП-ретротранспозоны *copia* и *roo* наиболее высоко экспрессируются в тканях каркаса, в то время как теломерные LINE-элементы *Tart A* и *Tart C* - в голове. Измерение экспрессии различных форм транскриптов кластеров *flamenco*, *42AB* и *traffic jam* показало, что регуляция кластера *42AB* в нервной системе отлична от других тканей: в нервной системе присутствует значительное количество его сплайсированных форм, в то время как в тканях яичников преобладают несплайсированные формы. Кластер *traffic jam* экспрессируется в тканях взрослых мух, но в ЦНС личинок его экспрессия тоже находится на высоком уровне относительно других кластеров. Измерение уровня экспрессии основных генов, участвующих в piРНК-интерференции, показало, что почти все анализируемые гены экспрессируются на низком уровне в соматических тканях.

Таким образом, механизмы контроля активности ретротранспозонов в соматических тканях дрозофилы различаются. Вероятно, что кластер *42AB* обладает особым способом регуляции в соматических тканях и вносит свой вклад в подавление экспрессии ретротранспозонов вместе с кластером *traffic jam*. Возможно, что основные гены piРНК-интерференции тоже участвуют в регуляции активности ретроэлементов в соматических тканях наряду с другими системами контроля.

Морфогенетические аспекты формирования адгезивных поверхностей животных

Ю.И. Молочкова*¹, Д.А. Никишин^{2,3}, Ю.Ф. Ивлев¹

¹ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия;

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* yulavas26@mail.ru

Фибриллярный адгезив подошвенной поверхности пальцев у гекконов (*Gekkonidae*, *Gekkota*), анолисов (*Polychrotidae*, *Iguania*) и сцинков (*Scincidae*, *Scincomorpha*) — это популярный прототип для биомиметических инженерных разработок, однако механика развития этого образования далека от расшифровки.

Нами был проведен комплексный анализ адгезионных структур на внутренней поверхности лапок гекконов *Hemidactylus triedrux*, *Gekko gecko*, а также каролинского анолиса (*Anolis carolinensis*).

Гистологический анализ адгезивных поверхностей ламелл гекконов, как на этапе эмбриогенеза, так и у взрослых особей в период очередной линьки ожидаемо показал схожесть механизма закладки щетинок. Эти кератиновые структуры формируются кутикулярным слоем эпидермиса и лежащим над ним блестящим слоем, который отслаивается в процессе очередной линьки. По нашим данным кератиновые фибриллы уже с самого момента их закладки «заякорены» на поверхности клеток обоих слоев, что видно при визуализации архитектоники клеток в процессе роста щетинок у *G. gecko* с помощью конфокальной микроскопии.

Окраска препаратов с помощью антител к β -тубулину и фаллоидина показывает, что микротрубочки вытянуты от апикального конца щетинки к дистальному, а актиновые микрофиламенты залегают под мембраной по периметру клеток и также образуют плотные тяжи вдоль формирующихся щетинок.

Конфигурация клеток, в которых развиваются щетинки, свидетельствует о наличии напряжений сдвига внутри внешних слоев эпидермиса. Направление этих напряжений совпадает с направлением сил, действующих на опорную поверхность пальцев при движении животных.

Для понимания молекулярных механизмов регуляции процесса формирования щетинок нами был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов на участках с адгезионным покрытием и участках свободных от него. В качестве модельного объекта был выбран *Anolis carolinensis* – каролинский анолис, геном которого был секвенирован в 2011 году и аннотирован.

Сравнительный анализ образцов эпителиальных тканей животных с адгезивной поверхностью и без нее выявил статистически достоверные различия в экспрессии 177 генов. Из них 98 генов больше экспрессируются в образцах кожи с адгезивом и 79 - в большей степени экспрессируются в образцах, не имеющих адгезива.

Практически все гены, экспрессия которых более выражена в адгезионных ламеллах, - крайне консервативны и включают гены, кодирующие транскрипционные факторы (например, *HOXC11*, *HOXC13*, *HOXD13*, *EN1*, *GLI1*) и регуляторные белки (например, *FGF7*, *FGFR1*, *RHO*). Это обстоятельство, а также результаты филогенетического анализа и палеонтологические данные позволяют предполагать, что механизмы генерации адгезионных структур у ящериц трех разных инфраотрядов являются весьма древними и универсальными.

Разработка методики оценки функциональной активности СПК в условиях *in vivo*

В.В. Мун*¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* valeriy2125@gmail.com

Клетки Сертоли (КС) – важные для сперматогенеза млекопитающих соматические клетки, расположенные в сперматогенном эпителии извитых семенных канальцев яичка и, обеспечивающие развитие и защиту половых клеток. Такая ключевая роль в сперматогенезе делает КС перспективным объектом для многих исследований, например, для развития систем *in vitro* сперматогенеза или методик лечения мужского бесплодия. Однако культивирование КС очень затруднено, что повышает интерес к поиску высокопролиферативных аналогов клеток Сертоли.

Нашей лабораторией были найдены Сертоли-подобные клетки (СПК) в области сети яичка. Они обладают схожим с КС профилем экспрессии, более активной пролиферацией, но меньшим уровнем Dmrt1, фактора важного для поддержания КС в дифференцированном состоянии.

Целью этой работы является разработка методики оценки функциональной активности СПК в условиях *in vivo*. Для этого мы селективно удаляли КС из яичек мышей с помощью инъекции раствора катионного детергента - хлорида бензалкония и трансплантировали в них СПК, выделенные от GFP мышей.

Согласно нашей методике, мы, при помощи стеклянного микрокапилляра, через выносящий каналец инъецировали 15 мкл раствора хлорида бензалкония в сеть яичка, откуда раствор попадал в извитые семенные каналцы.

Для подбора оптимальной концентрации хлорида бензалкония, была опробована серия его разведений, от 0,02%, до 0,15%, эффективность которых оценивали на 4 сутки после операции. Конфокальная микроскопия вкупе с иммуно-флуоресцентной окраской на Sox9, маркер КС и СПК, показала, что оптимальной является 0,1% концентрация вещества, которая вызывает поражение 30% семенных канальцев, при этом, пораженными считались каналцы с 0-4 клетками Сертоли на поперечный срез, нормальными - с 28-30.

Далее, на 4 сутки после инъекции хлорида бензалкония проводилась трансплантация заранее выращенной культуры СПК. Клетки, в количестве $2 \cdot 10^5$, в виде суспензии вновь вводились в сеть яичка при помощи микрокапилляра. Анализ результатов проводился на 4, 14 и 28 сутки после трансплантации. В итоге, посредством иммуно-флуоресцентной окраски на GFP и Sox9, было установлено, что СПК остаются жизнеспособными в яичках реципиента, как минимум в течении 4-х недель, при этом заполняя пустые от КС семенные каналцы. При этом клетки прикрепляются к базальной мембране и формируют новые канальцеподобные структуры. Клетки имеют отростчатую структуру, схожую с нативными КС в сперматогенном эпителии. Кроме того, было показано, что СПК сохраняют экспрессию и других своих маркеров: Dmrt1, маркер присущий КС, и Pax8 - присущий сети яичка.

Таким образом, мы получили тестовую систему, которая позволяет оценить функциональную активность СПК в условиях, максимально приближенных к нативным. В дальнейшем данная система может помочь в исследовании взаимодействия ниши сперматогониальных стволовых клеток с соматическими клетками и разработке методов лечения мужского бесплодия.

Исследование выполнено при поддержке гранта "Молодые ученые" фонда имени Геннадия Комиссарова. Работа выполнена под руководством с.н.с., к.б.н. А.Ю. Кулибина и н.с., к.б.н. Е.А. Малолиной.

Роль цитоскелетного белка Zyxin в регуляции экспрессии генов ядерных рецепторов ретиноевой кислоты *rarg* и *rxrg* в эмбриональном развитии шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*)

Е.А. Паршина*¹, Н.Ю. Мартынова¹, А.Г. Зарайский¹

¹ Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

* lana_parshina5@mail.ru

Белок Zyxin является белком клеточных контактов, участвующим в полимеризации актина, но в некоторых условиях он способен перемещаться в ядро и регулировать экспрессию генов. Для изучения роли Zyxin в эмбриогенезе мы провели сравнение транскриптомов клеток нервной пластинки *Xenopus laevis* с нормальной и нарушенной функцией Zyxin методом next generation sequencing (NGS). В результате мы выявили два гена, *rxrg* и *rarg*, кодирующие рецепторы ретиноевой кислоты (RA), количество транскриптов которых по данным NGS резко увеличивалось в ответ на подавление трансляции Zyxin. Эти рецепторы являются членами суперсемейства ядерных рецепторов: retinoic acid receptors (RARs) и retinoid X receptors (RXRs), которые образуют гетеродимерные комплексы, связываются с элементами, реагирующими на RA (RARE), и регулируют экспрессию генов ретиноидзависимым образом. В этой работе мы исследовали влияние белка Zyxin на экспрессию генов, вовлеченных в RA-зависимый каскад.

В первую очередь мы проверили данные NGS методом количественного ПЦР анализа. Оказалось, что достоверное увеличение количества транскриптов наблюдается только для *rxrg*, но не для *rarg*. То, что наблюдаемые эффекты специфичны, подтвердилось в экспериментах по восстановлению нормальной экспрессии *zyxin* у зародышей с нокадаунм этого гена.

Интересно, что разница в экспрессии *rxrg* увеличивалась в процессе развития. Подобную картину мы наблюдали в нашей предыдущей работе при исследовании экспрессии генов плюрипотентности семейства *pou5f3*. Как и один из генов этого семейства *pou5f3.3*, ген *rxrg* является материнским, т.е. его транскрипция происходит в оогенезе, и после активации собственного генома зародыша его транскрипты только деградируют. Это натолкнуло нас на мысль, что регуляция количества транскриптов *rxrg* может происходить по изученному нами ранее для семейства *pou5f3* механизму – через взаимодействие Zyxin с РНК-связывающим белком Ybx1. Действительно, при оверэкспрессии *ybx1* количество транскриптов *rxrg* увеличивалось, а при нокадауне – уменьшалось. И что самое главное, методом РНК-иммунопреципитации мы показали, что Ybx1 связывает мРНК *rxrg*, а коэкспрессия Zyxin нарушает это связывание, приводя к деградации мРНК *rxrg*.

Полученные данные о влиянии цитоскелетного белка Zyxin на экспрессию рецепторов ретиноевой кислоты позволяют предположить возможную связь клеточной адгезии с RA-зависимой разметкой дифференцировки клеток в раннем развитии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-34-90017.

Молекулярно-морфологический анализ формирования лево-правого организатора у
Xenopus laevis

Н.Д. Петри*¹, С.В. Кремнёв^{1,2}, Н. Циколия³

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

³ Медицинский университет Гёттингена - Институт анатомии и эмбриологии, Гёттинген, Германия

* *petri1543@inbox.ru*

Асимметрия тела у шпорцевых лягушек *Xenopus laevis* предположительно устанавливается во время нейруляции. Ключевую роль в этом процессе играет лево-правый организатор в крыше гастроцели, представляющий собой участок презумптивной мезодермы хорды и сомитов на средней линии эмбриона, открытый в полость гастроцели и несущий реснички. Морфология организатора хорошо изучена на стадии поздней нейрулы, когда при помощи ресничек он создаёт в полости гастроцели ток жидкости, однако особенности его возникновения и формирования на более ранних стадиях недостаточно изучены.

Мы изучали динамику развития, морфологическую организацию и молекулярную разметку лево-правого организатора в крыше гастроцели эмбрионов *X. laevis* на стадиях развития от ранней гастрюлы до поздней нейрулы методами сканирующей электронной микроскопии, гистологии и гибридизации *in situ* на гены-маркеры мезодермы, энтодермы и ресничных клеток.

Клетки презумптивной энтодермы, маркированные геном *Sox17*, на стадии ранней гастрюлы расположены на вегетативной стороне эмбриона и образуют кольцо в области будущего бластопора. На дорсальной стороне инволюирующая в ходе гастрюляции область крыши гастроцели несёт энтодермальные клетки узкой полосой вдоль переднего края инволюции, несущего колбовидные клетки; следующие за ними клетки имеют неэнтодермальную природу. К стадии нейрулы энтодермальные клетки покрывают всю крышу гастроцели с вентральной стороны, за исключением треугольного участка в районе лево-правого организатора.

Клетки презумптивной мезодермы сомитов, маркированные геном *MyoD*, перед гастрюляцией расположены незамкнутым кольцом вдоль латеральных и вентральной сторон будущего бластопора, по гистологическим данным на стадиях 11 и 12 они находятся под поверхностным слоем клеток. В ходе гастрюляции они инволюируют и оказываются на дорсальной стороне эмбриона по обе стороны от центральной линии.

Ресничные клетки, маркированные геном *Tekt2*, в начале гастрюляции находятся в дорсальной губе бластопора, в ходе гастрюляции концентрируются в треугольной области в крыше гастроцели, соответствующей лево-правому организатору.

Сканирующая электронная микроскопия показала, что через дорсальную губу бластопора инволюируют клетки более мелкие, чем находящиеся латеральнее, реснички на них замечены со стадии 11,5. Ближе к концу гастрюляции мелкие клетки формируют треугольную область в крыше гастроцели, фланкированную более крупными клетками.

Полученные нами данные демонстрируют динамику развития лево-правого организатора у эмбрионов *Xenopus laevis*. Наши данные не согласуются с общепринятыми представлениями о том, что все области презумптивного лево-правого организатора уже находятся на поверхности эмбриона на дорсальной стороне со стадии 10.5-11. В свете наших данных возникает новый вопрос о морфогенетических механизмах формирования лево-правого организатора у амфибий.

Раннее эмбриональное развитие морского паука *Phoxichilidium femoratum* (Rathke, 1799)

М.А. Петрова*¹, Е.В. Богомолова¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* *mashkaromashka225@gmail.com*

Морские пауки (Puspogonida) являются сестринской группой для всех остальных хелицероных. Их анатомическая организация и развитие отличаются уникальными особенностями, среди которых: очень большие относительно туловища ходильные ноги с расположенными на них гонопорами, трирадиальный хобот с ротовым отверстием на конце, отсутствие лабрума, вылупление личинки протонимфона и др. Эмбриогенез морских пауков представляет интерес с точки зрения реконструкции эволюции эмбрионального развития хелицероных, однако изучено слабо: основная часть работ по данному вопросу выполнена в конце 19 – начале 20 века. В данном докладе представлены предварительные данные по эмбриональному развитию морского паука *Phoxichilidium femoratum*. В лабораторных условиях были получены кладки. Методами световой и конфокальной лазерной микроскопии было прослежено развитие эмбрионов до конца гаструляции. Отложенные и оплодотворённые яйца окружены толстой оболочкой из слизи и слипаются в комки неправильной формы, которые самец носит на яйценосных ножках. После оплодотворения ядро перемещается от периферии к центру зиготы, затем оно перестаёт быть различимо, отделяются редукционные тельца. Отделение редукционных телец ранее не было отмечено для морских пауков. Вскоре перед первым делением ядро вновь становится видно в центре зиготы. Первое деление происходит спустя 11-12 часов с момента откладки яиц. Дробление равномерное, начиная с третьего деления синхронность дробления бластомеры делятся асинхронно. Бластомеры имеют пирамидальную форму, бластоцель отсутствует. Гаструляция начинается на третьи сутки: одна из клеток приобретает кеглевидную форму, затем она начинает мигрировать внутрь зародыша, за ней следуют ещё несколько клеток. Через сутки бластопор закрывается, место иммиграции клеток перестаёт быть заметно.

Сигнальный путь Hedgehog в постларвальном развитии и регенерации аннелиды *Pygospio elegans* (Spionidae)

С.Е. Платова*^{1,2}, В.В. Старунов^{1,2}, Е.Л. Новикова^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

² Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

* *sofiaplatova@gmail.com*

Сигнальный путь Hedgehog – важнейший компонент межклеточной коммуникации животных. Он необходим для нормального эмбрионального развития, важен для поддержания гомеостаза, обновления и регенерации тканей практически всех изученных животных. Hedgehog сигналинг участвует в процессах формирования нервной системы, кишки, мускулатуры и многих других органов у позвоночных и беспозвоночных животных, а также принимает участие в процессе сегментации у артропод и ряда аннелид. Основные компоненты сигнального пути (лиганд Hedgehog, трансмембранные рецепторы Patched и Smoothed и транскрипционные факторы Ci/Gli) являются высоко консервативными и сохраняются в эволюции большинства животных. При этом известно о фундаментальных отличиях в способах передачи сигнала от белка Smoothed (Smo) к факторам транскрипции Ci/Gli у дрозодилы (*Ecdysozoa*) и у позвоночных (*Deuterostomia*). Однако механизм передачи сигнала и характер экспрессии компонентов сигнального пути Hedgehog у представителей третьей группы билатеральных животных – Lophotrochozoa – на данный момент изучены гораздо менее подробно.

Нами был проведён анализ регенерационного транскриптома седентарной аннелиды *Pygospio elegans* на предмет поиска генов компонентов Hedgehog сигналинга. Был выявлен полный набор консервативных участников сигнального пути, а также ряд компонентов, наличие которых варьирует у разных животных (*Gas1*, *Hhip*, *Cdon* и др.). Данные, полученные в результате анализа последовательности белка Smoothened, а также наличие в транскриптом *P. elegans* множества генов, как известно, отвечающих за регуляцию сигналинга у позвоночных животных, предположительно, могут указывать на сходство способа передачи сигнала ниже рецептора Smoothened у позвоночных животных и аннелиды *P. elegans*.

Также нами был проведён анализ характера экспрессии генов *Pel-hh*, *Pel-ptc* и *Pel-smo* методом WMISH на ювенильных интактных червях и червях на разных стадиях, который позволил выявить несколько доменов их экспрессии. На интактных червях была обнаружена экспрессия в клетках вентральной нервной цепочки, в передней и задней кишке, а также ранее не описанный для других аннелид домен экспрессии в пальпах на голове червя. В ходе регенерации передней и задней части тела экспрессия обнаруживается со стадии 4 часов после ампутации в клетках кишки, вступивших в контакт с покровными клетками в ответ на повреждение. На более поздних стадиях (после 48 часов после ампутации), вероятно, добавляется специфичная экспрессия, связанная с формированием передней и задней кишки, закладкой сегментов и пальп на голове червя.

Данные, полученные нами в ходе анализа транскриптома, последовательностей компонентов Hedgehog сигналинга, а также при изучении пространственно-временного характера экспрессии ключевых компонентов сигналинга, важны для понимания эволюции данного сигнального пути среди разных групп животных, а также позволяют делать предположения о его функциях в процессах развития аннелид.

Выражаем благодарность РЦ "Хромас" и РЦ "Биобанк" Научного парка СПбГУ. Работа поддержана грантом РФФ 21-14-00304.

Анализ экспрессии генов сигнального пути Hedgehog у nereidной полихеты *Platynereis dumerilii*

Л.О. Полюшкевич¹, М.А. Кулакова¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

* *mila.papurika@gmail.com*

Сигнальные белки семейства Hedgehog (Hh) регулируют многочисленные процессы паттернирования у позвоночных и беспозвоночных животных. Сигнальный путь Hh необходим позвоночным для нейральных дифференцировок, развития конечностей, пищеварительного тракта и сомитов. У беспозвоночных Hedgehog контролирует сегментацию (членистоногие, полихеты), развитие кишки, гонад (дрозофила) и мышц (моллюски).

Современные данные указывают на то, что сигнальный путь Hh есть у всех билатерий, за исключением нематод. Он подробно исследован у Deuterostomia и Ecdysozoa, а сведения о характере активности данного пути у Lophotrochozoa остаются отрывочными. Одним из репрезентативных представителей лофотрохозой считается nereidная аннелида *Platynereis dumerilii*, так как этот вид сохранил много предковых черт, характерных для спиральных животных в целом. В представленном исследовании мы описываем характер экспрессии генов сигнального пути Hh у *P. dumerilii* на нескольких стадиях развития.

Опираясь на данные регенерационного транскриптома *P. dumerilii*, мы клонировали гены ключевых белков сигнального пути Hh: лиганда Hh, его рецептора Patched, транспортера Dispatched, трансмембранного активатора Smoothened и транскрипционного фактора Gli (*Cubitus interruptus*). С помощью метода гибридизации *in situ* на тотальных препаратах (WMISH) мы локализовали транскрипцию данных генов в личиночном и ювенильном развитии червя.

У личинок *P. dumerilii* Hh-позитивные клетки локализованы в эписфере, вентральной нервной пластинке и эктодермальных отделах кишки. На ранних стадиях развития сегментированной личинки (метатрохофоры) есть эктодермальный сегментационный паттерн, который исчезает у более поздней личинки (нектохеты). При этом у ювенильного червя в сформировавшихся сегментах мы вновь наблюдаем появление метамерных доменов экспрессии Hh между сегментами. Домены транскрипции Patched локализованы вблизи доменов Hh, но в клетках другого зародышевого листка - мезодермы.

В соответствии с литературными данными мы ожидали, что ген Dispatched, кодирующий трансмембранный транспортер лиганда Hh, будет активен в тех же клетках, где экспрессируется Hh. Однако транскрипты двух генов ко-локализуются лишь частично и только в нервной системе. Вероятно, в процессе развития платинереиса Dispatched берет на себя дополнительные функции, реализация которых не связана с Hh сигналингом. Кроме того, наши данные поднимают вопрос о паракринном пути Hh, который у червя либо отсутствует, либо реализуется Disp-независимым образом.

Полученные результаты являются ценным вкладом к имеющимся представлениям об эволюции компонентов сигнального пути Hedgehog и приближают нас к пониманию той молекулярной архитектуры, которую использовал для построения тела общий предок Bilateria.

Работа выполняется при поддержке гранта РФФИ (21-14-00304). Клонирование и визуализация данных выполнены на оборудовании Научного парка СПбГУ: ЦКП «Культивирование микроорганизмов» и «Хромас».

Исследование активности семиспиральных рецепторов в клетках гранулы мыши с применением генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров

П.А. Почетная*¹, Н.М. Алешина², Д.А. Никишин^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* *pochjotnaya@gmail.com*

Гуморальная регуляция процессов роста и созревания фолликулов в яичнике является актуальной фундаментальной научной проблемой, имеющей прямое прикладное отношение к технологиям сохранения репродуктивного потенциала женщин. Клетки гранулы – это звено, опосредующее влияние организма на созревающие яйцеклетки. Активность клеток гранулы регулируется большим количеством паракринных и аутокринных факторов. Одним из них является серотонин, который стимулирует стероидогенную активность фолликулярных клеток. Механизм действия серотонина и многих других факторов связан мембранными рецепторами, относящихся к семейству семиспиральных рецепторов (GPCR - рецепторы, сопряженные с G-белком). В связи с этим, определение функциональной активности GPCR является ключевой задачей в исследовании сигнальных путей в регуляции физиологического статуса фолликулярных клеток.

Бета-аррестин является основным регулятором функциональной активности GPCR. После связывания с лигандом и активации рецептор фосфорилируется киназой GRK. На следующем этапе бета-аррестин присоединяется к рецептору, что обеспечивает его десенситизацию. В дальнейшем, бета-аррестин играет роль адаптера к клатрину, что приводит к интернализации GPCR.

Целью данной работы было прижизненное исследование активности GPCR в клетках гранулы мыши с применением генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров. Данный методический подход имеет огромные преимущества, так как позволяет исследовать сигнальные механизмы как в живых клетках и в реальном времени, так и на фиксированном материале, имеет большое поле для создания методов детекции самых разнообразных молекул и процессов.

Для исследования GPCR, сопряженных с Gq-белком, к которым относится экспрессирующийся в клетках гранулы рецептор серотонина HTR2A, использовали биосенсором PH-YFP. Данный белок заякорен на мембране, а при активации рецепторов, фосфолипаза PLC гидролизует место прикрепления

биосенсора, поэтому молекула желтого флуоресцентного белка YFP уходит в толщу клетки. Таким образом, мы наблюдаем смещение сигнала из подмембранного пространства в центр клетки.

Для исследования более широкого спектра семиспиральных рецепторов нами был создан флуоресцентный биосенсор путем клонирования гена β -аррестина-2 крысы в одну рамку считывания с дальним красным флуоресцентным белком mKate2. Полученный гибридный белок при активации GPCR в клетке меняет локализацию с цитоплазматической на примембранную.

В экспериментах с применением фармакологических лигандов показана активность рецепторов к нескольким сигнальным факторам, в том числе к ФСГ и серотонину. Дальнейшее применение разработанного методического подхода позволит получить новые данные о возможных гуморальных механизмах регуляции функциональной активности клеток гранулезы и станет основой для разработки методов исследования других процессов развития.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-00303 и гранта Президента РФ МК-931.2020.4.

Кооперативные эффекты экспрессии генов-регуляторов нейрогенеза и апоптоза при формировании пространственной памяти у крыс

А.М. Ратмиров*¹, В.А. Кузина

¹ Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия

* ratmirov1@gmail.com

Целью данного исследования явилось сравнительное изучение особенностей одновременной экспрессии генов нейрогенеза *S100a6* и *Ascl1*, а также апоптоза *Bax*, *Dfffb*, *Casp-3*, *Casp-8*, *Casp-9* в гиппокампе, префронтальной коре и мозжечке у нативных крыс Вистар, а также в условиях контрольного принудительного плавания и при обучении пространственному навыку в водном лабиринте Морриса. Методы. Для выработки долговременной пространственной памяти в работе использовали поведенческую модель водного лабиринта Морриса. Генетические исследования проведены на релевантных структурах мозга - гиппокампе, префронтальной коре и мозжечке крыс с сформированной пространственной памятью. экспрессию генов изучали методом ПЦР в режиме реального времени. Результаты исследования. Выявлена специфическая экспрессия генов *Ascl1* и *S100a6* в гиппокампе, отличающаяся от префронтальной коры и мозжечка. В префронтальной коре и мозжечке мозга отмечается факт активации гена *Casp-3*, что может скорее указывать на участие фермента Casp-3 в нейропластических клеточных перестройках, чем в апоптотических реакциях при подавлении экспрессии других изучаемых генов *Bax*, *Dfffb*, *Casp-8* и *Casp-9*. У животных, обученных навигационному навыку при формировании гиппокамп-зависимой пространственной памяти, отмечается активация генов *Casp-9*, *Casp-3* и *Bax* в гиппокампе по сравнению с контролем «пассивное плавание». В префронтальной коре мозга у обученных животных отмечается выраженное увеличение экспрессии всех изучаемых генов-регуляторов апоптоза. Мозжечок у крыс с сформированной пространственной памятью манифестировал значительной активацией генов *Casp-9*, *Bax* и *Dfffb*. Корреляционный анализ выявил, что одновременное исследование экспрессии генов *Ascl1* и *S100a6*, *Bax*, *Dfffb* и *Casp-3*, *Casp-8* и *Casp-9* в данных церебральных структурах позволило обнаружить специфические внутри - и межструктурные взаимосвязи активности данных генов в мозге, возникающие при формировании долговременной пространственной памяти, отличные от таковых при принудительном плавании животных в водном лабиринте Морриса, а также от наивных крыс. Заключение. Полученные данные свидетельствуют о кооперативных эффектах экспрессии генов-регуляторов нейрогенеза и апоптоза в мозгу животных, у которых сформировалась гиппокамп-зависимая пространственная память в водном лабиринте Морриса.

Действие фебрильных судорог на возрастную динамику экспрессии астроглиальных белков в мозге крыс

А.И. Рогинская*^{1,2}, М.В. Захарова², А.А. Коваленко², А.П. Шварц²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

² Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

* *roganna5500@gmail.com*

Нарушения функциональной активности глиальных клеток, наблюдаемые в подростковом и взрослом возрасте, часто являются следствием различных патологических состояний, перенесенных в ранние периоды постнатального онтогенеза. Одним из таких патологических состояний могут быть фебрильные судороги.

Целью данной работы явился анализ влияния неонатальных фебрильных судорог на возрастную динамику экспрессии в дорзальной и вентральной областях гиппокампа крыс генов двух астроглиальных белков: *Gfap* (белок GFAP – промежуточный микрофиламент цитоскелета астроцитов; принимает участие в регуляции процессов регенерации, синаптической пластичности и реактивного глиоза) и *Sc12a* (белок EAAT2 – основной транспортер глутамата в ЦНС). Известно, что экспрессия данных белков в мозге изменяется в раннем постнатальном онтогенезе, что связано с функциональным созреванием астроцитов.

В эксперименте использованы крысы самцы Wistar в возрасте 10-11 дней жизни. Фебрильные судороги индуцировали потоком теплого воздуха температурой 45-46 градусов Цельсия, который направляли над стеклянным цилиндром диаметром 30 см и глубиной 40 см до индукции судорог. Они начинались с покусывания передних лап, вздрагивания лап и тела, постепенно развивались тонико-клонические судороги. Животных, у которых тонико-клонические судороги не наблюдались, из эксперимента исключали. После появления судорог, каждые 2 минуты измеряли ректальную температуру, не допуская ее повышения выше 42 градусов Цельсия. Эксперимент продолжался 30 минут, после отдыха и нормализации температуры крысенка возвращали к матери в домашнюю клетку. В контрольную группу включали крысят из тех же пометов, которые на аналогичное время были отлучены от матери, но не подвергались действию высокой температуры; еще одна контрольная группа была сформирована из интактных крысят из тех же пометов. Исследование изменений экспрессии генов *Gfap* и *Sc12a* выполнено методом ОТ-ПЦР в реальном времени на 14, 21 и 50-51 день жизни.

В интактной группе экспрессия гена *Gfap* в вентральном гиппокампе имела волнообразный характер: от 14 к 21 дню жизни происходило увеличение продукции его мРНК, тогда как от 21 к 51 дню отмечалось её снижение. У крыс, перенесших неонатальные фебрильные судороги, подобной возрастной динамики не наблюдалось, экспрессия гена *Gfap* оставалась неизменной во все сроки тестирования. Аналогичные данные получены в отношении экспрессии гена *Sc12a* (*EAAT2*) в дорзальном гиппокампе. Продукция его мРНК у интактных животных увеличивалась от 14 к 21 дню, после чего оставалась неизменной. У крыс, перенесших судороги, возрастной динамики не наблюдалось.

Полученные результаты указывают на то, что фебрильные судороги, перенесенные в раннем возрасте, могут влиять на развитие астроцитарных клеток в головном мозге.

Поддержано грантом РФФИ N 21-15-00430.

**Первые результаты анализа полногеномных данных балобана *Falco cherrug* Gray, 1834 и
кречета *Falco rusticolus* L., 1758**

Д.Н. Рожкова*^{1,2}, И.В. Карякин³, Г. Шрамко⁴, Л. Лазко⁴, А.М. Куликов¹, Л.С. Зиневич²

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² Всероссийский научно-исследовательский институт охраны окружающей среды, Москва, Россия;

³ ООО "Сибирский экологический центр", Новосибирск, Россия;

⁴ Дебреценский университет, Дебрецен, Венгрия

* darroznature@gmail.com

Балобан и кречет представляют эволюционно молодые виды группы *Hierofalco*. Существует ряд исследований, посвященных филогенетическим взаимодействиям данных видов. Однако понимание эволюционных процессов, повлиявших на их формирование, остается неполным. Исследование полных геномов позволяет получить дополнительные свидетельства этапов видообразования изучаемых видов.

Нами проведено секвенирование методом HiSeq геномов четырех кречетов, а также семи балобанов с запада ареала и 13 с востока. Последовательности полученных фрагментов были выровнены и картированы на референсный геном балобана (GCF_000337975.1). Сравнительный анализ показал, что исследуемые образцы могут быть отнесены к трем популяциям соответственно их географическому происхождению (кречет, западный балобан, восточный балобан). Кроме этого, картирование фрагментов и мутаций на геном было использовано для поиска потенциальных популяционных и адаптивно значимых маркеров. С помощью алгоритма, написанного на языке R, были найдены 8525 олигонуклеотидных замен, отличающихся между представленными популяциями. На основе сделанного картирования проведено сравнение найденных позиций мутаций с известными генами, соответственно расположенными в референсном геноме, и их экзон-интронной структурой. В результате выявлено 110 специфичных для популяций мутаций, расположенных как в кодирующих, так и некодирующих областях генома.

Выявленные SNP могут служить основой как для создания панели популяционных маркеров, так и для исследования адаптивной изменчивости в группе видов *Hierofalco*. Среди выявленных генов присутствуют факторы убиквитинилирования гистонов, такие, как *PCGF1*, гены, регулирующие организацию цитоскелета, такие, как *TTC28* и *CAST*, гены, изменение активности которых показано при легочной гипертензии (*CAST*, *FNBP4*, *SPTBN5*). Многие гены вовлечены в раннее развитие, например, *PCGF1* и *FNBP4*.

Наличие подобных мутаций у отдельной популяции птиц может свидетельствовать о влиянии на неё таких факторов как климат или изоляция в рефугиуме, то есть об их адаптивной значимости в процессе видообразования. Ранее было показано существование адаптивно значимых мутаций у современной популяции балобанов Тибетского нагорья по сравнению с другими балобанами. Полученные нами данные могут расширить представления о формировании группы *Hierofalco* в процессе эволюции.

Участие сигнального каскада Hippo в ранних стадия оогенеза млекопитающих

И.А. Романова¹, Ю.В. Храмова*²,

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* yul.khramova@gmail.com

Сигнальный каскад Hippo – эволюционно консервативный путь, участвующий в регуляции различных процессов: пролиферации, дифференцировки и гибели клеток. В последнее время активно исследуют его участие в процессах оо- и фолликулогенеза млекопитающих. Так, например, показано, что при разрезании яичника на фрагменты, происходит инактивация сигнального каскада Hippo, что приводит к стимуляции роста вторичных фолликулов. Однако участие данного сигнального каскада в ранних этапах оогенеза, протекающих во время внутриутробного развития организма, остается крайне малоизученным.

В данной работе исследовали активность сигнального пути Hippo в яичниках *Mus musculus* на эмбриональных стадиях развития – E14,5 – E18,5, на мышах линии CBA/Jac. Эмбриональный материал получали согласно стандартным протоколам. Половую принадлежность гонад определяли по морфологическим признакам. Методом количественного ПЦР анализа оценивали уровни экспрессии генов, кодирующих основные белки каскада (MST1,2; LATS1,2; YAP). С помощью ингибиторного анализа с применением вертепорфина – ингибитора комплекса YAP/TEAD, и XMU-MP1 – селективного ингибитора киназы MST1/2, было исследовано влияние активности сигнального каскада Hippo на процессы оогенеза в условиях *in vitro*. Для этого яичники, выделенные из эмбрионов на стадии E14,5, культивировали в присутствии ингибиторов в течение 7 суток, после чего подвергали анализу, в частности методами стандартной гистологии.

Было показано, что на стадии E16,5 в яичниках наблюдается наибольший уровень экспрессии исследованных генов (*mst2*, *lats1*, *lats2* и *yap*). Эта стадия предшествует периоду разрушения оогониальных цист и переходу от оогоний к ооцитам первого порядка. Таким образом, мы предполагаем, что активность сигнального каскада Hippo связана с этим процессом. В результате проведенного ингибиторного анализа было показано, что инактивация верхнего звена каскада Hippo – киназы MST1, приводит к повышению количества выживающих ооцитов, о чем свидетельствуют данные гистологического анализа – снижение количества клеток с пикнотическими ядрами. В то время как, ингибирование взаимодействия YAP и TEAD приводит к снижению количества выживающих ооцитов, о чем свидетельствует отставание ооцитов в развитии и слабое взаимодействие с соматическими клетками на момент окончания культивирования, что соответствует по времени моменту рождения *in vivo*. Таким образом, сигнальный каскад Hippo принимает участие в регуляции процессов раннего оогенеза, обеспечивая селекцию женских половых клеток и становление пула примордиальных фолликулов, благодаря волнообразному характеру активации каскада.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук № МК-378.2020.4 (соглашение №075-15-2020-223).

Дифференцировка ИПСК человека в эпидермальном и дермальном направлении в рамках получения эквивалентов кожи и ее дериватов

А.А. Рябинин*¹, Е.П. Калабушева¹, Е.А. Воротеляк^{1,2}

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* andrey951233@mail.ru

На текущий момент одной из важных проблем регенеративной медицины является развитие технологий получения и трансплантации живых эквивалентов кожи, которые могут быть использованы для лечения ожогов, хронических воспалений, а также ряда генетических заболеваний кожи. Одним из перспективных источников клеточного материала для генерации ЖЭК являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (ЧИПСК), поскольку они обладают неограниченным пролиферативным потенциалом и позволяют получать аутологичные эквиваленты тканей человека. Основной нерешенной проблемой получения ЖЭК являются отличия структуры, клеточного состава и состава внеклеточного матрикса в составе ЖЭК от его нативного аналога, а также отсутствие дериватов кожи.

Целью работы было получить в ходе направленной дифференцировки ЧИПСК эпидермальную и дермальную клеточные линии, пригодные для получения ЖЭК и волосных фолликулов *in vitro*.

В результате дифференцировки ЧИПСК были получены аналог кератиноцитов (ИПСК-Кц) и аналог клеток дермальной папиллы (ДП) волосного фолликула (ИПСК-ДП). Затем полученные клеточные линии были верифицированы при помощи иммуноцитохимического анализа и РВ-ПЦР выявления маркеров кератиноцитов (*p63*, *K14*, *K18*, *K10* и др.) и маркеров ДП (версикана, виментина, фибронектина, гладкомышечного актина и др.) соответственно, а также функционального теста на индукцию фолликулогенеза *in vivo* после введения ИПСК-ДП под кожу иммунодефицитных мышей линии nude с последующим иммуногистохимическим выявлением эпидермальных маркеров (К6 и К14), в составе сформированных *de novo* кожных органоидов в препаратах, полученных из зоны введения. У линий ИПСК-ДП на разных стадиях дифференцировки дополнительно анализировали экспрессию маркеров при помощи метода RNA-seq.

На следующем этапе работы ИПСК-ДП и ИПСК-Кц использовали для получения в системе transwell, а также на основе плотного коллагенового геля с лунками ЖЭК и органоидов, имитирующих ранние стадии фолликулогенеза, в системе «висячая капля». Образцы полученных препаратов использовали для иммуногистохимического выявления маркеров клеток дермальной папиллы (фибронектина и версикана), базальной мембраны (коллаген IV) и кератиноцитов (К14, К6).

Полученные результаты подтверждают целевой фенотип полученных клеточных линий и их способность к взаимной интеграции в трехмерные клеточные системы, что позволяет утверждать, что разработанные методы и полученные клеточные линии могут быть использованы для получения полноценных ЖЭК и дериватов кожи *in vitro*.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 16-14-00204 и гранта РФФИ № 21-74-30015.

МСК влияют на реорганизацию внеклеточного матрикса и развитие фиброза при лице-лопаточно-плечевой мышечной дистрофии

О.О. Сербина*¹, Е.В. Киселева¹, Е.С. Васецкий¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* olatyeva94@gmail.com

В процессе развития лице-лопаточно-плечевой мышечной дистрофии (ЛЛПМД) мышечная ткань дегенерирует с последующим фиброзом. Патофизиологический фиброз - процесс чрезмерного накопления внеклеточного матрикса (ВКМ), является конечным результатом каскада событий, происходящих от повреждения ткани через воспаление. Дисбаланс взаимодействия различных типов клеток приводит к выработке многочисленных факторов роста, протеолитических ферментов, ангиогенных факторов, белков ВКМ и цитокинов, которые вместе изменяют микроокружение поврежденной ткани и стимулируют формирование соединительной ткани, постепенно разрушая и заменяя архитектуру мышечной ткани. Помимо ремоделирования ВКМ в поврежденной мышечной ткани происходит ангиогенез, который способствует развитию новой сосудистой сети в месте повреждения, в то время как новообразованные мышечные волокна подвергаются росту и созреванию.

В скелетных мышцах присутствуют МСК, которые могут мигрировать в область воспаления и участвовать в регенерации мышц и реорганизации ВКМ наряду с другими клетками. Ранее мы показали, что миобласты от доноров с ЛЛПМД стимулируют такую миграцию МСК. В пораженной мышечной ткани МСК могут влиять на реорганизацию ВКМ, миогенную дифференцировку и развитие фиброза.

В этой работе мы показали, что миобласты от пациентов с ЛЛПМД стимулируют синтез и секрецию клетками МСК коллагена и фибронектина - основных белков внеклеточного матрикса, провоцирующих фиброз. В свою очередь, присутствие МСК в культуре миобластов ингибировало образование мышечных трубок *in vitro*. Кроме того, мы обнаружили, что МСК увеличивают экспрессию ЛЛПМД-миобластами и миотубулами факторов ангиогенеза (ангиопоэтин, VEGF), ремоделирования внеклеточного матрикса (ММР, TIMP), цитокинов и факторов роста (CXCL12, FGF, CTGF). Мы выявили увеличение экспрессии этих факторов в ЛЛПМД-миобластах и миотубулах, как таковых, по сравнению со здоровыми.

Таким образом, взаимное влияние миобластов и МСК, приводящее к нарушению баланса факторов ремоделирования ВКМ и ангиогенеза, вероятно, может быть одним из звеньев развития патологического фиброза мышц при ЛЛПМД.

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН на 2021 год № 0088-2021-0016.

Регенерация известковой губки *Leucosolenia variabilis*: динамика процесса, трансформации клеток, вклад актинового цитоскелета

К.В. Скоренцева*¹, А.А. Саидова¹, А.И. Лавров¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* *skorentseva.ksenya.2016@post.bio.msu.ru*

Заживление ран в эпителиальных тканях имеет решающее значение для восстановления тканевого гомеостаза у многоклеточных организмов. В настоящее время считается, что регенерация этих ран происходит по двум взаимодействующим механизмам: через формирование сократительного актомиозинового кольца клетками на краю раны и непосредственным коллективным движением клеток в рану, с появлением структур, ответственных за миграцию – ламеллиподий и филоподий. Эти процессы часто сопровождаются потерей апико-базальной полярности клеток и изменением их морфологии.

Губки (Porifera) представляют собой древнюю, сестринскую к остальным Eumetazoa группу, обладающую уникальным гистологическим строением (у них не показаны настоящие ткани, лишь эпителио-подобные клеточные пласты) и выдающимися способностями к регенерации. Базальное положение губок на древе многоклеточных животных делает их многообещающим объектом для изучения. Уточнение механизмов их регенерации является важным шагом на пути выявления закономерностей, лежащих в становлении истинных тканей в эволюции.

В настоящей работе рассмотрены аспекты регенерации асconoидной губки *Leucosolenia variabilis* на общем и клеточном уровнях. Проанализирована общая динамика регенерации, динамика отдельных клеток, изменение морфологии и актинового цитоскелета клеток и клеточных пластов, участвующих в процессе. Используются методы иммуноцитохимии, конфокальной микроскопии и цейтраферной съёмки.

На поздних стадиях (24 часа после операции и далее) формирования регенеративной мембраны (РМ), незадолго до закрытия раны, динамика процесса описывается кривой второго порядка. В наблюдаемых образцах площадь раны уменьшилась на 50% (от начала наблюдения) за 5-19 мин (n=7), скорость закрытия раны варьировала от 214.27 до 586.33 мкм²/мин (n=7). Скорость движения отдельных клеток мезохила составила 3.279±0.09 мкм/мин (n=68), а эффективность – 0.524± 0.025 (n=70).

В процессе формирования РМ клеточные пласты экзопинакодермы и хоанодермы претерпевают следующие трансформации: Т-образные экзопинакоциты уплощаются, формируя внешний слой РМ из полигональных клеток; призматические хоаноциты трансдифференцируются в плоские полигональные эндопинакоциты, формируя внутренний слой РМ и утрачивая морфологические особенности – жгутик и микроворсинки. Эти изменения клеток сопровождаются статистически достоверными изменениями основных морфологических параметров (площадь, циркулярность, отношение длинной и короткой осей). Наблюдаются и значительные изменения актиновых структур: кортикальный актин интактных клеток частично заменяется структурами, отвечающими за движение: ламеллиподиями, филоподиями, склероподиями. Эти преобразования свидетельствуют о коллективной миграции клеточных пластов, составляющих тело губки, в рану.

Таким образом, наши данные указывают на фундаментальную схожесть механизмов регенерации у губок с высшими многоклеточными животными, что открывает новые перспективы для эволюционной биологии и регенеративной медицины.

Работа поддержана грантами РФФИ №19-04-00563 и №21-54-15006.

Спонтанная кальциевая активность определяется сетевой биоэлектрической активностью во время развития первичных культур гиппокампа мыши

Р.А. Соколов^{*1,2}, И.В. Мухина^{3,1}

¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского;

² Научно-технологический университет "Сириус", Сочи, Россия;

³ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

* sokolov@neuro.nnov.ru

Изменения внутриклеточной концентрации кальция – критический процесс, затрагивающий работу всех клеточных функций от «рождения» до «смерти» клетки. Все клетки организма, как электровозбудимые, так и неэлектровозбудимые, способны к генерации кальциевых волн. Ионы кальция вовлечены в процессы внутриклеточной сигнализации, например кальций-зависимой активации киназ, биоэнергетики, транскрипции генов, синаптической передачи сигнала и прочих.

При помощи флуоресцентного красителя Oregon Green BAPTA AM мы изучили спонтанную динамику внутриклеточного кальция нейронов диссоциированных первичных культур гиппокампа мыши с 15 по 26 дни *in vitro*. Результаты показали увеличение максимальной амплитуды, совместно с уменьшением частоты кальциевых осцилляций по мере развития культур. Осцилляции были разделены по амплитуде на три порядка: 1й порядок (1-ПКО) до 25%, 2й порядок (2-ПКО) 25-75%, 3й порядок (3-ПКО) 75%+ от базовой линии. В ходе эксперимента одна клетка генерировала разные порядки активности, при этом каждый из порядков имел свое распределение.

Все кальциевые осцилляции зависели от внеклеточного кальция и были сопряжены с нейрональной сетевой биоэлектрической активностью, что подтверждалось отсутствием событий в безкальциевой внеклеточной среде, а также в присутствии блокатора потенциал-зависимых (ПЗ) натриевых каналов – тетродотоксина. Блокирование NMDAR (N-methyl-D-aspartate receptor) добавлением 10 мМ MgCl₂ во внеклеточный раствор приводило к исчезновению спонтанной кальциевой активности.

1-ПКО был зависим от блокатора AMPA/KAR (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor/kainate receptors) – CNQX, частота уменьшалась в присутствии блокатора GABAAR (γ -aminobutyric acid receptor) – пикротоксина и блокатора ПЗ кальциевых каналов – дилтиазема, амплитуда не зависела от блокаторов рецепторов внутриклеточных кальциевых депо – рианодиновых и инозитол-3-фосфатных (IP3R). 2-ПКО зависели от AMPA/KAR, полностью исчезая в присутствии блокатора. Блокаторы рианодиновых рецепторов и ПЗ кальциевых каналов снижали частоту, блокатор GABAAR

увеличивал среднюю амплитуду, а блокаторы NMDAR – D-APV, ПЗ калиевых каналов – тетраэтиламмоний и IP3R – 2APB уменьшали амплитуду 2-ПКО. 3-ПКО появлялся на 20й день развития культур клеток. Его появление, вероятно, отражает наступление нового этапа в регуляции кальциевого гомеостаза развивающейся *in vitro* культуры. Для 3-ПКО было характерно отсутствие зависимости от блокатора AMPA/KAR. GABAAR, ПЗ калиевые каналы и внутриклеточные кальциевые депо участвовали в формировании 3-ПКО. При помощи одновременной записи кальциевого имиджинга и метода патч-кламп было показано, соответствие 1-ПКО одиночным потенциалам действия (ПД), 2-ПКО – небольшим «пачкам» ПД (3-12), 3-ПКО – «суперпачкам» состоящим из более чем десяти ПД.

Таким образом, развитие кальциевой спонтанной активности коррелирует с биоэлектрической активностью нейронной сети и показывает существенные перестройки во время развития сети *in vitro*.

Влияние пренатального стресса на цитокиновый профиль крыс разного пола и возраста

А.Ю. Субботина*¹, А.С. Мартюшева¹

¹ Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия

* subbotina-anastasiya@list.ru

Проведена оценка характера влияния пренатального стресса на уровень цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-4, ФНО) в крови у крыс разного пола и возраста.

Исследования выполнены в соответствии с требованиями, утвержденными этической комиссией ФГБНУ НИИ НФ им. П.К. Анохина (протокол №1 от 03.09.2005 «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных») и требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA).

Эксперимент проведен на 95 крысах, 21-дневных, 30-дневных и 60-дневных самцах и самках, полученных от взрослых животных линии Вистар. Животных содержали в виварии в стандартных клетках в условиях искусственного освещения. С 10 по 16 день внутриутробного развития потомства беременных самок опытной группы подвергали принудительному плаванию в холодной воде при температуре 10°C в течение 5 минут. Животные контрольной группы находились в домашних клетках. Экспериментальные группы состояли из 8 животных одного пола и возраста.

Определение концентрации цитокинов в сыворотки крови крыс проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моно- и поликлональных антител «Вектор Бест». Измерение оптической плотности раствора измеряли на иммуноферментном анализаторе HTI ImmunoChem-2100 Microplate reader. Статистическую обработку полученных данных выполнили в программе Statistica 10.0 с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни и критерия Уилкоксона. Минимальный принятый уровень значимости наблюдающихся отличий составлял 5%.

Установлено, что стрессорная нагрузка на модели пренатального стресса плавания в холодной воде не приводит к значимым изменениям уровня содержания противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и провоспалительного цитокина ИЛ-6 у крыс 21-дневного, 30-дневного и 60-дневного возраста. Стрессорное воздействие в период внутриутробного развития сопровождается снижением уровня противовоспалительного цитокина ИЛ-4 у самцов на 30-й день, у самок на 21-й день жизни и увеличением содержания ИЛ-4 у самок на 60-е сутки. Выявлено, что у особей мужского пола, перенесших пренатальный стресс в возрасте 60-ти суток, содержание описываемого цитокина ниже, чем у 21-дневных стрессированных самцов. Показаны гендерные различия в содержании противовоспалительного цитокина ИЛ-4 в крови у 60-дневных пренатально стрессированных животных, а именно, у самцов уровень ИЛ-4 ниже, чем у самок. У крыс мужского и женского пола пренатальный стресс сопровождается выраженным увеличением концентрации цитокина ФНО в периферической крови на 60-й день развития.

Полученные данные иллюстрируют специфическое влияние пренатального стресса на содержание цитокинов в крови крыс в разные возрастные периоды раннего онтогенеза.

Авторы выражают благодарность директору НИИНФ им. П.К. Анохина, чл.-корр. РАН С.С. ПЕРЦОВУ за научное руководство и помощь в выполнении представленной работы.

Развитие 3D церебральных агрегатов в желудочках мозга взрослых мышей

К.К. Сухинич*¹, К.М. Шакирова², Э.Б. Дашинимаев^{1,2}, М.А. Александрова¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

* *transpl@hotmail.com*

Изучение развития мозга в норме и при патологии является одной из ключевых задач нейробиологии. Серьезной проблемой является моделирование ранних этапов развития мозга млекопитающих, особенно человека. Наиболее часто используемым инструментом для исследования являются 2D культуры. Однако при 2D культивировании не формируется трехмерная организация нервных и глиальных клеток и специфические пространственные межклеточные взаимодействия характерные для развивающегося мозга. Альтернативным решением является 3D культивирование и создание церебральных органоидов в системах *in vitro*. Однако моделирование органоидов связано с рядом пока нерешенных задач. Методики получения органоидов включают сложный процесс культивирования клеток, требующий специальных сред, ростовых факторов, и зачастую, использование биореактора. Даже в стандартизованных условиях формируются структуры различные по морфологии: от неорганизованных клеточных агрегатов, до структурированных мини мозгов, которые и отбираются для изучения. По естественным причинам органоиды, выращенные *in vitro*, не имеют кровоснабжения, что ограничивает их развитие. Мы отработали модель получения церебральных агрегатов, подобных органоидам *in vivo*, где возможен рост сосудов и кровоснабжение ткани, для чего трансплантировали суспензию клеток из неокортекса эмбриона мыши в боковые желудочки мозга взрослых мышей. После чего в разные сроки изучали организацию клеток и их дифференцировку, используя спектр антител-маркеров нейральной дифференцировки. В нашей модели средой для культивирования клеток служила спинномозговая жидкость, а биореактором боковые желудочки мозга, где она циркулирует. Результаты показали, что неокортекс от Э14.5 является подходящим источником стволовых/прогениторных клеток, которые самоорганизуются в трехмерные агрегаты и васкуляризируются *in vivo* в боковых желудочках мозга. Клеточные агрегаты приобретали определенную архитектуру, они состояли из центрального слоя зрелых нейронов, свободной от клеток маргинальной зоны и пограничной глиальной мембраны, что имело сходство с церебральными органоидами. Таким образом, для получения васкуляризованных клеточных агрегатов, напоминающих церебральные органоиды могут быть использованы боковые желудочки мозга взрослой мыши.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-00117).

**Эволюция смешанной системы определения пола у ракообразных *Daphnia magna*:
локализация детерминант определения пола**

В.Г. Тамбовцева*¹, А.Р. Тухбатуллин¹, Я.Р. Галимов¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* lynx1994@gmail.com

Смешанное средовое/генетическое определение пола у размножающихся циклическим партеногенезом планктонных рачков *Daphnia* - многообещающая модель для исследования ранних этапов формирования половых хромосом и генетического определения пола. В ряде популяций *D. magna* значительная часть самок (5-98%) не производит самцов ни в природе, ни при искусственной гормональной стимуляции (NMP, non male-producing). Для производства покоящихся яиц такие самки нуждаются в оплодотворении самцами из клонов, производящих потомство обоих полов (MP, male-producing), поэтому в природных популяциях NMP клоны всегда сосуществуют с MP клонами.

Неспособность производить потомство мужского пола наследуется как моногенный признак, клоны NMP гетерогаметны («WZ»), а самцы-производители гомогаметны («ZZ»). Ранее было показано, что в трёх дивергентных линиях *D. magna* этот признак сцеплен с одной и той же хромосомной областью длиной около 1,5 млн п.н. Это позволяет предполагать раннее появление W/Z гетерогаметности в эволюции *D. magna* и сохранение этого эволюционного приобретения в течение по меньшей мере в течение 2 млн. лет. Поскольку определяющий женский пол потомства W-участок наследуется исключительно по материнской линии, мы можем предполагать, что филогенетические реконструкции, основанные на последовательности митохондриальных генов, отражают эволюцию W-участка и, соответственно, NMP линий у *D. magna*.

Для проверки гипотезы необходимо исследовать внутривидовое разнообразие NMP генотипов *D. magna* на всём ареале, отдельно изучив последовательности W и Z вариантов с помощью NGS-секвенирования. Разделение W и Z, однако, затруднено в силу полного или почти полного подавления рекомбинации между ними и обилия повторяющихся мотивов в этой хромосомной области. Поэтому при фазировании W и Z нельзя обойтись биоинформатическими методами.

Таким образом, задачей настоящей работы было получение W и Z, фазированных методами классической генетики, у 10-15 NMP клонов *D. magna*, максимально полно охватывающих филогенетическое разнообразие вида. Для этого NMP клоны из примерно 40 природных популяций *D. magna* из коллекции ИБР РАН были генотипированы по меньшей мере по двум STR-локусам (Short Tandem Repeats), сцепленным с W/Z-участком, а также по 610 н.п. фрагменту гена COXI (цитохром с-оксидаза). Реконструкция филогенетических отношений на основе полученных данных подтверждает, что исследуемые клоны относятся к трем дивергентным кладам: североамериканской, европейской, центрально-азиатской. Анализ генотипов дафний первого поколения от скрещиваний ♂MPx♀NMP показал, что у 15 из 19 исследованных NMP клонов неспособность производить самцов сцеплена с STR-локусами, расположенными в W/Z-области. Полученные путём возвратного скрещивания MP особи, аутозиготные по Z-участку, при сравнении с генотипами NMP родителей, позволят фазировать NGS данные и реконструировать гаплотипы W и Z.

Развитие мезонефроса у ранних личинок воблы *Rutilus rutilus caspicus*

Н.Ю. Терпугова*^{1,2}, М.П. Грушко¹, Н.Н. Федорова¹

¹ Астраханский государственный технический университет, Астрахань, Россия;

² Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, Россия

* *n.terpugova@bk.ru*

Мезонефрос является главным органом выделительной системы, который функционирует в течение онтогенеза, участвуя в выведении продуктов метаболизма из организма, в водно-солевом обмене, а также в обеспечении фильтрации крови. Цель работы изучить строения и развитие мезонефроса у ранних личинок воблы.

Объектом исследования послужила ранняя молодь воблы *Rutilus rutilus caspicus*, выловленная на нерестилищах дельты Волги. Сбор материала (2015-2020 гг.) проводили в полях западной части р. Волги. Вылов ранних личинок осуществлялся 6-метровой волокушей, изготовленной из килечного сетного полотна с газовым кутцом в соответствии с общепринятыми методиками. По 15 особей с каждого водоёма (нерестилищ) на этапах развития C1-D1 подвергали гистологической обработке по общепринятой методике.

В результате гистологических исследований у ранних личинок воблы четко определялся мезонефрос. Первичные почки имели вид валикообразных структур, которые тянулись вдоль позвоночного столба ранних личинок рыб. Орган содержал структурные образования мезонефральные нефроны разного уровня дифференцировки: от зачатков до сформированных и функционирующих структур. Вдоль всего органа тянулся Вольфов канал – выводной проток, который был выстлан кубическим эпителием. В мезонефросе функциональные элементы находились между мезенхимных клеток, где выявляли дифференцирующие форменные элементы крови. В поперечном разрезе диаметр извитых почечных канальцев различался, стенки канальцев мезонефроса образованы однослойным призматическим эпителием, клетки которого имели разную высоту. Для почечных канальцев была характерна дистрофия.

Клетки почечных канальцев имели ядра, находящиеся в разной функциональной активности. Для эпителия канальцев отмечали наличие зернистой дистрофии. В цитоплазме этих клеток появлялись зерна, из-за наличия которых ядро эпителиоцитов смещалось к апикальному полюсу.

Кроме этого, были выявлены сформированные почечные тельца, у которых определялись капилляры сосудистых клубочков, находящиеся под двухстенной эпителиальной капсулой. Тельца имели разные размеры и форму: от округлой до неправильной вытянутой. Все капиллярные петли слились в общий клубочек (гиперцеллюлярность). Полость клубочка выстлана плоским эпителием. В полости мочевого пространства наблюдалось гранулярно-волоконистое содержимое. У почечных клубочков было отмечено не характерное утолщение и расширение мембран капилляров, которое проявлялось в виде пустых округлых образований между капиллярных петель. В нескольких мелких почечных тельцах приносящие артерии были резко расширены и заполнены форменными элементами крови.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что у ранних личинок воблы наряду с интенсивным развитием и формированием структурных элементов мезонефроса регистрируются различные морфологические нарушения, проявляющиеся в виде зернистой дистрофии эпителия почечных канальцев, утолщения и расширения мембран капилляров и гиперцеллюлярность почечных клубочков.

Tat белок вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) влияет на экспрессию генов в культивируемых В-клетках: к вопросу о механизмах онкогенеза у ВИЧ-инфицированных пациентов

М.А. Тихомирова*^{1,2}, А.А. Валяева^{3,2}, А.А. Жарикова^{3,2}, А.Н. Богомазова, Я.Р. Мусинова², А.А. Миронов³,
Е.С. Васецкий¹, Е.В. Шеваль^{2,3}

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова - НИИ Физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Москва, Россия;

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* *mariiatikh@gmail.com*

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) вызывает развитие синдрома приобретенного иммунодефицита. Разработанная и внедренная в клиническую практику антиретровирусная терапия позволяет сдерживать развитие вирусной инфекции. Однако на фоне проводимой терапии могут развиваться различные осложнения, включая В-клеточные лимфомы. В-лимфоциты не инфицируются ВИЧ, и, по-видимому, механизм онкогенеза связан с действием вирусного Tat белка, который способен высвобождается из ВИЧ-инфицированных клеток и проникать в неинфицированные клетки. Точный механизм действия Tat белка не выявлен, но проникновение вирусного белка может изменять экспрессию клеточных генов. Для изучения действия Tat белка на В-лимфоциты мы получили и охарактеризовали клеточные линии на основе культивируемых В-клеток RPMI 8866 со стабильной экспрессией Tat белка. Чтобы обнаружить возможные изменения клеточной физиологии, которые могут способствовать онкогенезу был проведен полногеномный анализ экспрессии клеточных генов (RNA-seq). Белок Tat приводит к дифференциальной экспрессии около 1000 генов. Среди них было несколько генов, экспрессия которых может привести к онкогенезу. Для прогнозирования эффектов дифференциальной экспрессии генов был проведен анализ метаболических и сигнальных путей (анализ GO BP и KEGG). Была выявлена активацию путей, участвующих в клеточных противовирусных реакциях, и подавление различных метаболических путей и пролиферации. Вероятно, что одни изменения в экспрессии генов могут быть вызваны вирусным белком, а другие могут быть результатом клеточных противовирусных (компенсаторных) реакций. При анализе пролиферации и апоптоза не было обнаружено какого-либо сильного действия Tat белка, но во время длительного культивирования клетки, экспрессирующие Tat белок, вытеснились неэкспрессирующими. Кроме того, обнаружилась повышенная частота хромосомных aberrаций в клетках, экспрессирующих Tat белок. Таким образом, были обнаружены некоторые эффекты Tat белка ВИЧ, которые могут модифицировать клетки, приводить к хромосомным перестройкам и, потенциально, к онкогенезу.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 20-34-90156).

Разработка метода получения фракции дофаминергических нейронов для молекулярно-биологических исследований

Д.В. Трошев*¹, В.Е. Блохин¹, М.В. Угрюмов^{1,2}

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² Национальный исследовательский университет "Высшая школа экономики", Москва, Россия

* *dmitry.vad.troshev@gmail.com*

Учитывая то, что дофаминергические (ДА-ергические) нейроны nigrostriatной системы мозга являются ключевым звеном центральной регуляции моторной функции, а их гибель, которую в том числе связывают с недостаточным количеством образовавшихся в процессе нейрогенеза ДА-ергических

нейронов, приводит к развитию болезни Паркинсона (БП), изучение молекулярных механизмов функционирования, дегенерации и «пластичности» этих нейронов имеет большое значение. Поскольку получение биологических образцов у больных при БП затруднено, исследования проводят в основном на моделях поэтапного развития этого заболевания у животных.

Изучение патогенеза БП должно осуществляться на основе фундаментальных знаний о клеточных и молекулярных механизмах этого заболевания. Среди них наиболее важными являются знания о молекулярных механизмах функционирования, гибели и нейропластичности nigrostriальных DA-ергических нейронов. Если экспрессию генов и синтез специфических для DA-ергических нейронов белков можно количественно изучать в гомогенате черной субстанции (ЧС) животных, то экспрессию гораздо более широкого круга генов и синтез белков, участвующих в нейротрансмиссии, гибели и нейропластичности, в этих же нейронах оценить невозможно. В первую очередь это объясняется тем, что многочисленные и не менее функционально значимые белки экспрессируются не только в DA-ергических нейронах, но и в других нейронах и в клетках глии.

Исходя из вышеизложенного, целью данного исследования явилась разработка метода получения фракции DA-ергических нейронов nigrostriальной системы мозга для молекулярно-биологического анализа.

Нами был подобран протокол выделения области ЧС с последующей ее диссоциацией. Полученную суспензию клеток инкубировали с флуоресцентными метками с неперекрывающимися спектрами эмиссии: 1) GBR-BODIPY (GBR-BP), состоящий из селективного лиганда мембранного дофаминового транспортера (ДАТ) – GBR12909 и флуоресцентной молекулы BODIPY; 2) DRAQ5 – ядерный маркер, связывающийся с двухцепочечной ДНК. Для доказательства того, что сортируемые DRAQ5+/GBR-BP+ клетки являются DA-ергическими нейронами, в фиксированных клетках проводили иммуноцитохимическое выявление тирозингидроксилазы (ТГ), а также изучали, соответствует ли профиль экспрессии основных маркеров DA-ергических нейронов в отсортированном материале тому, который наблюдается в кусочке ткани, содержащем ЧС. Для этого оценивали экспрессию ТГ, ДАТ и декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (ДАА).

Отсортированные DRAQ5+/GBR-BP+ клетки в 97% случаев являются иммунореактивными по ТГ. При этом профиль экспрессии маркеров DA-ергических нейронов: ТГ, ДАТ, ДАА, в сортируемой DRAQ5+/GBR-BP+ популяции совпадает с таковым, наблюдаемым в кусочке ткани, содержащем ЧС.

Таким образом, в рамках этого исследования был разработан метод сортировки DA-ергических нейронов, который может быть использован не только для изучения патогенеза БП, но и для получения фракции дифференцированных DA-ергических нейронов из любых гетерогенных клеточных культур.

Авторы выражают свою благодарность Украинской В.М. (лаборатория биокатализа ИБХ РАН), Ненашевой Т.А. и Измайловой Л.Ш. за помощь в работе с проточным цитометром и клеточным сортером.

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-15-2020-795, Соглашение № 13.1902.21.0027 от 29.09.2020, ID проекта: RF-190220X0027).

Влияние VAS2870 на кальциевый сигнал одиночных клеток

Е.В. Труфанова*¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* *quark-gluon@mail.ru*

Ранее в нашей лаборатории было показано на эндотелиальных клетках человека, что активные формы кислорода влияют на интегральный кальциевый ответ популяции эндотелиальных клеток (ЭК). Для более детального изучения механизма этого подавления были проведены эксперименты на одиночных эндотелиальных клетках человека. В экспериментах использовались ЭК, выделенные из

пупочной вены человека 2-5 пассажей, культивированные в 48-луночных планшетах и достигшие плотности 100%.

НАДФН-оксидаза (Никотинамидадениндинуклеотидфосфат-оксидаза, Nox) представляет собой находящийся в мембране ферментный комплекс, обращенный к внеклеточному пространству. Он может быть обнаружен в плазматической мембране, а также в мембранах фагосом, используемых нейтрофильными лейкоцитами для поглощения микроорганизмов. Изоформы человека каталитического компонента комплекса включают NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 и DUOX2. НАДФН-оксидазы семейства Nox являются важными ферментативными, но не единственными, источниками активных форм кислорода (ROS). В ЭК человека выявлены изоформы НАДФН-оксидаз, генерирующие супероксид (NOX1, NOX2 и NOX5), и изоформа, генерирующая пероксид водорода (NOX4). Для определения роли НАДФН-оксидаз в регуляции обмена кальция в ЭК в данном исследовании был использован избирательный ингибитор этих ферментов VAS2870.

Для оценки кальциевого ответа использовался внутриклеточный зонд Calcium Green™-1/AM. Эксперименты проводились на микроскопе Leica DMI6000, с фильтр-кубом 530 нм, также во время эксперимента поддерживалась температура 25°C. В качестве действующего вещества использовался гистамин (His) с конечной концентрацией 100 мкМ, для подавления кальциевого ответа использовался Vas с конечной концентрацией 10 мкМ, в качестве контроля к нему использовался DMSO, разведенный во столько же раз, во сколько и Vas2870.

После добавления 100 мкМ гистамина следует резкое увеличение $[Ca^{2+}]_{цит}$ во всех живых эндотелиальных клетках на 20% в течение 6 сек. Затем происходит медленное падение уровня кальция. Добавление 10 мкМ VAS2870 вызывает снижение кальциевого ответа на 33% ($n=250$, $P=0.0003$), а также снижения скорости ответа на 63% ($n=250$, $P=4.23E-05$), однако количество реагирующих клеток не меняется. Данные результаты могут говорить об уменьшении количества Ca^{2+} содержащих везикул под действием VAS2870, но отсутствии влияния антагониста на пропускную способность кальциевых каналов.

Филогеография обыкновенного слепыша (*Spalax microphthalmus*) на основании изменчивости маркеров митохондриальной ДНК

А.Р. Тухбатуллин*¹, С.Ю. Капустина¹, О.В. Брандлер¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* tukhbatullinandrej@gmail.com

Евразийские слепыши (подсемейство Spalacinae) являются облигатными норниками-геобионтами. Такой образ жизни привел к сужению экологической ниши и, как следствие, минимизировал анатомические варианты морфологии. Отсутствие внешних морфологических различий может приводить к образованию видов-двойников, которые затрудняют реконструкцию филогенетических отношений и понимание эволюции всей группы.

Систематика слепышей с давних пор является предметом дискуссий. Сейчас признаётся существование 2 родов: *Spalax* и *Nannospalax*, представители которых морфологически различаются только размерами тела и краниометрическими параметрами. В связи с этим актуально изучение их генетических характеристик. Ранее была обнаружена высокая изменчивость кариотипов: $2n=38-60$ для *Nannospalax* и $2n=60-62$ для *Spalax*. На основе молекулярно-генетических маркеров были построены филогении *Nannospalax* и *Spalax*, обитающих на территории Европы. В то же время изменчивость *S. microphthalmus*, обитающего на востоке Украины и западе России от Днепра до Волги, практически не изучена.

Ранее для этого вида была описана внутривидовая хромосомная изменчивость на основе транслокационных перестроек. Также было обнаружено существование 62-хромосомной формы на Северном Кавказе. Между тем молекулярно-генетическая структура вида остаётся не изученной.

В данной работе мы оценили генетические особенности и географическую изменчивость *S. microphthalmus* на основе анализа маркеров митохондриальной ДНК: контрольного региона (CR) и цитохрома b (cytb).

Нами исследованы слепыши из 10 локалитетов со всего ареала вида. Для части выборки был проведен кариотипический анализ. Для всех образцов секвенированы последовательности CR и выборочно cytb. Проведён кластерный анализ изменчивости CR *S. microphthalmus*. Для оценки уровня дифференциации и филогенетических отношений хромосомных форм *S. microphthalmus* с другими видами слепышей был проведён филогенетический анализ изменчивости cytb с использованием нуклеотидных последовательностей *Spalacinae* из GenBank.

Кариотипический анализ показал, что 60-хромосомная форма обыкновенного слепыша распространена на всей территории ареала к северу от Манычской впадины, а 62- хромосомная форма – на северном Кавказе. Анализ изменчивости CR *S. microphthalmus* показал значительную дифференциацию хромосомных форм. 60-хромосомная форма обыкновенного слепыша характеризуется высокой гаплотипической изменчивостью CR и малыми генетическими дистанциями. Филогенетический анализ по cytb показал, что уровень дифференциации хромосомных форм *S. microphthalmus* сопоставим с различиями между другими видами слепышей рода *Spalax*.

Филогеографический анализ указывает на длительную изоляцию хромосомных форм *S. microphthalmus*, возникшую, вероятно, в результате образования Манычского пролива в раннем плейстоцене. В то же время длительной изоляции каких-либо популяций внутри хромосомных форм не прослеживается.

Исследование поддержано грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 18-04-00687.

Возникновение эмбриональных аномалий несинантропных млекопитающих урбанизированных территорий г. Екатеринбург

Т.Р. Тухбатуллина^{*1}, Е.А. Кизилова², О.В. Толкачев³, М.И. Чепраков³, В.Л. Вершинин^{3,4}

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия;

² Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

⁴ Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия;

**ttukhbatullina@gmail.com*

Увеличение доли урбанизированных территорий в настоящее время становится одним из ключевых факторов, ведущих к проблемам нормального воспроизводства (нарушения репродуктивной функции самок, эмбриогенеза). Целью нашей работы был сравнительный анализ девиантных морфологических форм *Micromammalia* популяций, населяющих урбанизированные и эталонные территории.

Сбор материала произведен 2016-2018 г. на территории Юго-Западного лесопарка г. Екатеринбург, который, согласно типизации, является наименее загрязнённым. В качестве контроля использована лесная территория, расположенная в Шалинском р-не Свердловской обл., где эффект урбанизации минимален. Для сравнительного анализа использован лабораторный материал из вивария ИЦиГ СО РАН г. Новосибирск – линейные *Mic.arvalis* (CD1 outbred – сток из колонии мышей Swiss из института Рокфеллера). В целом исследовано 1887 эмбрионов от 276 самок, из них 594 эмбриона от 59 самок CD1.

За период исследований выявлено 27 вариантов аномалий. *S. araneus* 7 вариантов, *S. uralensis* - 11, *M. glareolus* – 18, в фоновом локалитете этого вида – 1, у *M. rutilus* 10, 2 варианта в выборке

контрольного локалитета, *Mic. arvalis* – 15 вариантов, 6 в выборке контрольного локалитета, *Mic. arvalis* outbred CD1 с нормальной плодовитостью – 5 вариантов аномалий, в лабораторной выборке многоплодных – 7, *A. agrarius* - 3, *Mic. agrestis* – 0, *Mic. oeconomus* – 9 вариантов.

Преобладающими типами аномалий у изученных видов являются: *S. araneus* – укорочение конечностей, *S. uralensis* – синдактилия, *M. glareolus* – деформация плаценты, брахидактилия и клиндактилия, в фоновом локалитете этого вида – деформация плаценты, у *M. rutilus* – деформация плаценты и синдактилия, в выборке этого вида фонового локалитета – деформация плаценты и обвитие пуповиной, *Mic. arvalis* – деформация плаценты, брахидактилия, клиндактилия и деформация плаценты в выборке фонового локалитета, *Mic. arvalis* outbred CD1 с нормальной плодовитостью – деформация плаценты и синдактилия, в лабораторной выборке многоплодных – клиндактилия и синдактилия, *A. agrarius* - дисморфия черепа, *Mic. oeconomus* – деформация плаценты, утолщение / укорочение конечностей, микрофтальмия.

Уровень техногенной нагрузки оказывает большее влияние на возникновение эмбриональных аномалий, чем вариант репродуктивной стратегии вида.

Тенденции изменения плодовитости по годам у всех полевок общие, что можно объяснить относительной синхронностью популяционных циклов. Наибольшая встречаемость эмбриональных аномалий зафиксирована у серых полевок. Относительно высокие показатели частоты и разнообразия аномалий на территории лесопарка свидетельствуют о негативном действии техногенных факторов на онтогенез и репродуктивный потенциал животных. У некоторых видов высокая доля эмбриональных аномальных и нежизнеспособных эмбрионов может быть обусловлена незначительной эмбриональной резорбцией или ее отсутствием.

Исследование поддержано программой 211 Правительства Российской Федерации, соглашение № 02.А03.21.0006.

Состояние цитоскелета и эпигенетические события в яичниках *Drosophila melanogaster*, полный цикл гаметогенеза которых происходил в условиях моделируемой микрогравитации

М.А. Усик*^{1,2}, М.А. Голубкова¹

¹ Государственный научный центр РФ - Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия;

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

* usik.maria@mail.ru

Перспектива увеличения продолжительности космических полетов сопряжена с необходимостью сохранения репродуктивного здоровья. Тем не менее в понимании механизмов влияния микрогравитации на репродуктивную систему все еще существуют пробелы. Целью данного исследования являлась оценка состояния цитоскелета яичников *Drosophila melanogaster*, полный цикл развития которых (от зиготы до половозрелых имаго) прошел в условиях моделируемой микрогравитации с использованием машины случайного позиционирования. Содержание белков цитоскелета и гистонов определяли с помощью вестерн-блоттинга. Относительное содержание мРНК оценивали, используя ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что относительное содержание белков микрофиламентов: бета-актина и актин-связывающего белка альфа-актинина увеличилось на 13% ($p < 0,05$) и 17% ($p < 0,05$), соответственно, при моделировании эффектов микрогравитации по сравнению с контрольными уровнями. Изменений в содержании белков основных компонентов микротрубочек: альфа- и бета-тубулина обнаружено не было.

Для изучения причин увеличения содержания актина и альфа-актинина было определено относительное содержание мРНК генов, кодирующих белки цитоскелета. Содержание мРНК альфа- и бета-тубулина осталось на уровне контроля, а содержание бета-актина и альфа-актинина в группе

моделируемой микрогравитации увеличилось на 178% ($p < 0,05$) и 133% ($p < 0,05$), соответственно, по сравнению с контрольной группой.

Для определения причин такого увеличения транскрипции мы решили провести анализ посттрансляционных модификаций гистонов, в первую очередь – анализ ацетилирования гистона H3, как одного из основных участников регуляции экспрессии гена из-за его положения в нуклеосоме. Относительное содержание гистона H3, образующего ядро нуклеосомы и участвующего в организации ДНК, не изменилось после воздействия моделируемой микрогравитации по сравнению с контрольной группой. Уровни Lys9 (H3K9ac) и Lys27 (H3K27ac) ацетилированного гистона H3 в группе моделированной микрогравитации были значительно выше по сравнению с контролем на 81% ($p < 0,05$) и 86% ($p < 0,05$), соответственно.

Таким образом, формирование адаптивного паттерна функционирования яичников плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, цикл развития которой проходил в условиях моделируемой микрогравитации, включает изменения в относительном содержании белков цитоскелета и изменения эпигенетической регуляции.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН 65.4 и Программой стратегического академического лидерства.

Роль ферритина в морфогенетических процессах губок

А.Д. Финошин*¹, К.И. Адамейко^{1,2}

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

² ООО "Генотек", Москва, Россия

* alexcolton@yandex.ru

Ферритины — консервативное семейство белков, представленное у всех видов живых организмов. У животных они играют важную роль в устойчивости к окислительно-восстановительному стрессу, иммунном ответе и дифференциации клеток. Губки (Porifera) — предположительно самые древние животные, обладающие уникальной способностью восстанавливать функциональную организацию тела после механической диссоциации в виде многоклеточных агрегатов. Мы охарактеризовали ферритины двух холодноводных губок с помощью методов протеомики, спектральной микроскопии и биоинформатического анализа. В геноме губки *Halisarca dujardini* были обнаружены недавно дублировавшиеся консервативные гены HdF1a/b, которые отличаются лишь одной аминокислотной заменой, и атипичный ген HdF2. Несколько схожих транскриптов ферритина HpF1 были идентифицированы в транскриптом губки *Halichondria panicea*. В губке *Halisarca dujardini* экспрессия консервативных генов HdF1a/b была намного выше, чем атипичного гена HdF2 во всех образцах, собранных в различные сезоны (осень, зима, лето). При этом во время эксперимента по диссоциации/реагрегации губки направление изменения экспрессии отличалось в летний и осенне-зимний сезоны. Наличие мотивов MRE (metal responsive element, металл-зависимый элемент) и HRE (hypoxia response element, гипоксии-зависимый элемент) в промоторных областях генов HdF1 и HdF2, а также мотива IRE (iron responsive element, железо-зависимый элемент) в мРНК HdF1 и HpF1 указывает на то, что регуляция экспрессии ферритинов губки может зависеть от уровня железа и кислорода в клетке. Гель-электрофорез в сочетании со специфическим окрашиванием на ионы трехвалентного железа и масс-спектрометрией подтвердили присутствие ионов железа и ферритинов в многосубъединичных комплексах. Наличие трехвалентного железа в связанной форме (в ферритине) также подтверждается методом спектральной микроскопии. 3D-моделирование предсказывает способность белков HdF1 и HpF1 связывать ионы железа в ферроксидазном центре и отсутствие связывания железа в атипичном HdF2. Интересно, что атипичные ферритины, предположительно не связывающие железо, были обнаружены в геномах многих видов беспозвоночных.

Влияние фитохромов и криптохрома 1 на активность фотосинтетического аппарата и ферментов антиоксидантной защиты в листьях растений *A. thaliana* при УФ-радиации

А.Ю. Худякова*¹, А.Н. Шмарев¹

¹ ФИЦ "Пушкинский научный центр биологических исследований РАН" - Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Россия

* *s_t_i_m_a@mail.ru*

УФ-В излучение издавна считается одним из ингибирующих факторов роста и развития растений. Однако наряду с ингибированием развиваются процессы адаптации к УФ-В, которые снижают ингибирующий эффект и защищают растение и его ФА от негативного действия УФ-В. Развитие адаптивных процессов при действии УФ-радиации во многом находится под контролем системы фитохромов и криптохромов, представляющих собой набор фоторецепторов, работающих вместе с соответствующими сигнальными системами. Однако роль фоторецепторов в фотосинтетических процессах мало изучена.

Предполагается, что регуляторные эффекты фитохромов связаны прежде всего с их воздействием на активность ферментов, которые регулируют различные метаболические процессы, в частности биосинтез низкомолекулярных антиоксидантов и фотосинтетических и других пигментов листа, а также уровень экспрессии генов, регулируемых светом.

Работа проведена на 25 дневных растениях *Arabidopsis thaliana* дикого типа (ДТ) и мутантах *hy2* (с дефицитом всех фитохромов (Фх)) и *hy3* (с дефицитом ФхВ) выращенных на белом (БС) свете, а также *hy4* (с дефицитом криптохрома 1) выращенных на БС, красном (КС) и синем (СС) свете (130 мкмоль квантов м-2 с-1). Растения подвергались УФ-В облучению (1 Вт м-2, 0,5, 1 и 2 ч) и оценивалось активность ФС2, содержание фотосинтетических и УФ-поглощающих пигментов (УФПП), активность каталазы и пероксидазы, а также содержание в листьях пула H₂O₂.

Облучение УФ-В приводило к снижению максимального и эффективного квантовых выходов ФС2 у *hy2* и *hy3*, которое возрастало при увеличении дозы. По-видимому, это снижение связано как с нарушением кислород-выделяющего комплекса на донорной стороне ФС2, так и с изменениями на акцепторной стороне ФС2. Также наблюдали уменьшение количества QB-восстанавливающих центров ФС2 и увеличение нефотохимического тушения (NPQ). Что касается мутанта *hy4*, то снижение активности ФС2 при действии УФ-В при всех дозах было также больше у *hy4* по сравнению с ДТ, выращенных на СС и БС, но не на КС, где криптохромы практически неактивны. Показано, что у мутантов *hy4*, выращенных на БС и СС, содержание УФПП и каротиноидов было меньше, чем у ДТ в 1,5–2 раза. Предполагается, что одной из причин влияния дефицита фитохромов на устойчивость ФС2 к УФ-В является обнаруженное у мутантов пониженное содержание УФПП и каротиноидов. Активность пероксидазы и каталазы у ДТ, выращенного на СС и БС, но не на КС, была значительно выше чем у *hy4*. У растений ДТ и *hy4*, выращенных на КС, заметного различия в активности этих ферментов обнаружено не было. Содержание H₂O₂ у СС растений ДТ было примерно в 2,5 раза выше, чем у *hy4*. У растений СС, облученных УФ-излучением, содержание H₂O₂ в ДТ уменьшилось на 30%, а у *hy4* возрастало на 50%. Активность указанных ферментов у *hy3* при активации Фх не изменялась после УФ-радиации, тогда как у *hy2* снижалась на 35%.

Сделано заключение, что устойчивость ФА к УФ-В в значительной степени зависит как от фитохромной системы, так и фоторецептора СС– криптохрома 1.

Работа поддержана грантом РФФИ №20-04-00512.

Моделирование регенерации кожи и волосяных фолликулов человека в полнослойном ксенотрансплантате

О.Л. Черкашина*¹, Е.И. Моргун¹, А.Л. Риппа¹, А.А. Цитрина¹, А.В. Косых¹, Э.С. Чермных¹, Е.П. Калабушева¹, Е.А. Воротеляк¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* *olgalcher@gmail.com*

Модели ксенотрансплантации кожи человека мышам с иммунодефицитом широко применимы как для изучения процессов, происходящих в коже человека в норме, так и для изучения патогенеза заболеваний, а также для тестирования лекарственных препаратов. В нашей лаборатории была разработана модель трансплантации полнослойного кожного лоскута человека, содержащего все слои дермы и подкожную жировую клетчатку, а также волосяные фолликулы, сальные и потовые железы.

Полнослойные фрагменты кожи человека с волосистой части головы трансплантировали мышам линии NOD/SCID, всего в работе использовали 15 животных. Животных содержали в SPF-условиях. Биоптат брали спустя 40, 75 и 110 дней после трансплантации, подготавливали криосрезы, которые использовали для классической гистологии и иммуногистохимии. В качестве контроля использовали фрагменты интактной кожи, замороженные до трансплантации.

Трансплантированная кожа образует единую структуру с кожей мыши, при этом наблюдается различимая граница между кожей мыши и человека. После трансплантации в коже сохраняются человеческие волосяные фолликулы, эпидермис, дерма и подкожная жировая клетчатка. Кожа васкуляризована, что указывает на отсутствие некроза в удаленных от края участках ксенотрансплантата; многочисленные мелкие сосуды замещаются крупными в ходе регенерации. На 40 сутки после трансплантации наблюдается интенсивная пролиферация клеток в дерме и эпидермисе, однако при этом в этих слоях не выявляется стратификация – отсутствует выраженное деление на папиллярную и ретикулярную дермальную ткань, а также маркер шиповатого слоя – кератин 10. Кроме того, в дерме обнаруживается воспалительный инфильтрат. Волосяные фолликулы находятся на стадии телогена. К 75 суткам количество пролиферирующих клеток снижается практически до уровня интактной кожи, в эпидермисе обнаруживается кератин 10 положительный слой. Выделяется слой папиллярной дермы. На этом сроке в коже появляются потовые железы. Волосяные фолликулы находятся в раннем анагене. На 110 сутки морфология кожи ближе к нормальной, воспаление исчезает, наблюдается активный рост волос над поверхностью кожи. Подкожная жировая клетчатка хорошо выявляется на всех исследуемых сроках.

Разработанная модель успешно воспроизводит структуру кожи человека и позволяет преодолеть существующие ограничения других моделей для изучения процессов регенерации дермы, подкожной жировой клетчатки и кожных желез.

Работа поддержана грантом РФФ №21-74-30015.

Активация клеточных источников регенерации сигнальным путём FGF в ответ на ампутацию сегментов у полихеты *Alitta virens*

А.Ю. Шалаева*¹, В.В. Козин¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

* *shalaeva.sasha@gmail.com*

Процесс регенерации животных сопровождается пролиферацией клеток, их перемещением к месту повреждения и последующей дифференцировкой. Одним из интригующих вопросов был и остаётся источник этого активирующего сигнала, а также его молекулярная природа. На нескольких

модельных организмах показано, что именно сигнальный путь, активируемый факторами роста фибробластов (FGF), выступает одним из ключевых участников запуска процесса регенерации и стимулирует клетки к миграции к месту повреждения и их локальной пролиферации. У беспозвоночных животных отмечено сходное поведение клеток в ответ на повреждение, в связи с чем возникает вопрос, можно ли говорить и консервативности процесса и на молекулярно-генетическом уровне?

Нам удалось определить репертуар лигандов и рецепторов FGF для *Alitta virens*, а также на основе их пространственно-временной экспрессии определить роль этого сигнального пути при регенерации. Начиная с ранних стадий восстановительного процесса у *A. virens* FGF-позитивные клетки обнаруживаются в брюшной нервной цепочке, раневом эпителии и вокруг кишки в клетках мезодермального происхождения. Экспрессия лигандов и рецепторов в этих структурах отмечена ещё до появления активной пролиферации клеток и, как следствие этого, бластемы, что позволяет предположить, что эти ткани выступают источником сигнала, индуцирующего клетки в ответ на повреждение.

Экспериментальное воздействие с использованием фармакологических ингибиторов FGF-сигналинга, воздействующих на него на разных уровнях (SU5402, подавляющего активацию рецептора, и U0126, подавляющего MAP-киназный путь, запускаемый FGF-сигналингом), начиная сразу с момента ампутации и на стадии формирования бластемы, подтверждает это предположение. При инкубации сразу после ампутации задней части тела наблюдалось полное подавление пролиферации клеток и, как следствие этого, отсутствие регенерационной почки. В случае воздействия начиная со стадии формирования бластемы в течение двух или четырёх последующих дней было отмечено изменение морфологии регенерата и значительное подавление деления клеток, особенно в случае SU5402, обладающего более специфичным воздействием на FGF-сигналинг.

Полученные данные позволяют предположить, что сигнальный путь FGF играет ключевую роль на ранних этапах регенерации, активируя её клеточные источники. Сходная роль и тканевая специфичность экспрессии описана для позвоночных животных. Вероятно, такой ответ на повреждение является анцестральным для всех билатеральных животных.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-34-70158.

Возможность дифференцировки клеток миелоидной линии под воздействием IL-6, LPS и BCG *in vitro*

Д.А. Шевалье*^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* *dmitry.chevalier.main@gmail.com*

Гемопоз в постэмбриональном онтогенезе отведен процесс физиологической регенерации крови. Устойчивое кроветворение переключается на экстренный миелопоз, после вызванных инфекцией системно распространяемых патогенов. Идентификация молекулярных механизмов, ответственных за миелопоз, была давней задачей, которая на сегодняшний день решается такими технологиями как транскриптомика отдельных клеток и проточная цитометрия. За последние десятилетия изучение функций субпопуляций миелоидной линии клеток при воспалении и самих медиаторов воспаления, а также компонентов внутренней среды дало представление о патогенезе с молекулярной точки зрения. Более новые технологии в области геномной инженерии и секвенирования отдельных клеток предоставляют возможность анализировать онтогенез миелоидных клеток и их гетерогенность. Разработка моделей дифференцировки клеток костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток в миелоидную линию клеток является перспективным направлением.

В рамках данной работы были получены клетки моноцитов и гранулоцитов из костного мозга и отсортированных гемопоэтических стволовых клеток мыши *in vitro*. По литературным данным

классическая модель дифференцировки задействует STAT-3 опосредованный путь используя факторы GM-CSF и IL-6. Данная комбинация факторов моделирует опухолевый процесс. Для моделирования системной инфекции мы использовали дополнительно инактивированный BCG и бактериальный LPS.

Культивирование проводили на протяжении 7 дней в 24-луночной планшете в количестве 500 тыс. клеток/луночка в среде RPMI-1640 10%FBS. Дифференцировка проводилась в 4 различных условиях: GM-CSF + IL6, GM-CSF + LPS, GM-CSF + BCG, GM-CSF + LPS (добавленный на 3 сутки). В качестве контролей использовали среду без факторов и с добавлением только одного из факторов. Анализ проводили на контрольных точках на 3, 4, 6, 7 сутки.

Данные культуры полученной миелоидной линии анализировали при помощи проточной цитометрии анализ и канфокальной микроскопии. По результатам анализа оценивали влияние медиаторов воспаления на различные субпопуляции моноцитов и гранулоцитов по маркерам LybG LybC. При помощи канфокальной микроскопии оценивали форму ядра и интенсивность флуоресценции маркеров клеточной поверхности.

В результате мы получили, что дифференцировка клеток при помощи BCG и LPS возможна, при данных условиях популяция клеток обладает более выраженным гранулоцитарным сдвигом в сравнении с моделью опухоли используя IL-6.

Неканоническая роль серотонина в мужской репродуктивной системе млекопитающих

А.Д. Шитиков*^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* *alexandr.sh98@gmail.com*

Серотонин играет важную роль в контроле мужской репродуктивной функции, включая сперматогенез, гормональные регуляции, функциональную активность сперматозоидов. Предполагается, что локальная серотонинергическая система семенников осуществляет эти регуляции через активацию рецепторов серотонина. Однако существует и другой путь действия серотонина – через накопление внутри клетки и участие в посттрансляционной модификации белков (серотонилировании). Фермент трансклутаминаза катализирует ковалентное присоединение моноаминов к белкам, что приводит к их структурно-функциональным изменениям. Серотонилирование показано как для структурных (фибронектин, актин), так и для регуляторных белков (например, малые ГТФазы). Установлена роль серотонилирования в регуляции секреции инсулина, сократимости гладкомышечных клеток, формировании внеклеточного матрикса, активации транскрипционных факторов. Нашей целью являлся поиск серотонилированных белков в гаметах млекопитающих. Для этого была отработана модификация метода визуализации серотонилированных белков в гаметах мышей и крыс с помощью клик-реакции с пропаргил-серотонином (5-PT) и иммуногистохимического маркирования антителами к серотонину и белкам, модифицированным трансклутаминазой. Паттерн распределения белков анализировали с применением канфокальной микроскопии, включая микроскопию с суперразрешением (Airyscan).

Серотонилированные белки выявлены в акросомальной части головки сперматозоидов и в проксимальном отделе жгутика. Такая локализация указывает на возможное участие серотонилированных белков в регуляции подвижности и капацитации сперматозоидов. На основе литературных данных мы предположили, что белок гомолог STUM может являться потенциальной мишенью для трансклутаминазы в сперматозоидах. Действительно, мы обнаружили экспрессию гомолога STUM в акросоме и проксимальной части жгутика, которая в значительной степени совпадала с распределением выявленных серотонилированных белков. Полученные результаты являются первым свидетельством экспрессии гомологичного белка STUM и его возможного серотонилирования в сперматозоидах млекопитающих.

Таким образом, мы впервые продемонстрировали возможность реализации эффектов серотонина в мужской репродуктивной системе млекопитающих через серотонилирование белков в гаметях, а также идентифицировали один из белков - потенциальных мишеней для трансклутаминазы. Участие серотонина в посттрансляционной модификации белков может играть роль в патогенезе нарушений репродуктивной функции, выявленных при длительном применении антидепрессантов – блокаторов мембранных транспортеров серотонина. Исследование деталей этого механизма важно для успешного развития репродуктивных технологий.

Работа проводилась на базе ЦКП ИБР РАН, при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-14-01353.

Отношение красного света к дальнему красному влияет на активность фотосинтетического аппарата растений салата при облучении светом высокой интенсивности

А.Н. Шмарев*¹, М.В. Верещагин²

¹ ФИЦ "Пушкинский научный центр биологических исследований РАН" - Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Россия;

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

* shurik_bx_04@mail.ru

В современных системах интенсивного культивирования растений режим освещения посевов является одним из наиболее действенных инструментов для обеспечения нормального роста и онтогенеза возделываемых культур и биологической ценности съедобной биомассы растений. Одну из главных ролей по улучшению роста и развития растений, а также повышению устойчивости к свету высокой интенсивности может играть соотношение красного света (КС) к дальнему красному свету (ДКС) в спектре источника освещения. При этом оптимальные соотношения КС/ДКС в физиологическом и стрессовых условиях практически не изучены и зачастую определяются видовыми и сортовыми особенностями растений.

Целью работы являлось изучение влияния соотношения КС/ДКС на фотосинтетические параметры растений салата при действии света высокой интенсивности.

Объектом исследования служили растения салата (*Lactuca sativa* L.), выращенные в течение 20 дней в контролируемых условиях с 12-ч фотопериодом при $22 \pm 1^\circ\text{C}$ днем и при освещенности 300 мкмоль квантов/м²с и температуре $18 \pm 1^\circ\text{C}$ ночью. Соотношения 2:1 и 1:1 КС/ДКС достигали с помощью светодиодов 660/730 нм. Фотосинтетическая активность ФС2 оценивалась с помощью JIP-теста. Свет высокой интенсивности (1500 мкмоль квантов/м²с, 2 ч) обеспечивался белыми светодиодами. Оценивали скорость фотосинтеза (Pn) и дыхания (R).

Было показано, что значения максимального квантового выхода первичной фотохимии ФС2 (F_v/F_m), индекса производительности ФС2 (PI_{ABS}), тепловой диссипации поглощенной в ФС2 энергии (DI_0/RC) практически одинаковы при соотношении КС/ДКС 2:1 и 1:1. Однако, по сравнению с КС/ДКС 2:1 содержание Хл *a*, Хл *b* и каротиноидов при соотношении КС/ДКС 1:1 было ниже на 10%, 16% и 18%, соответственно. Величина Pn составила 31.7 (1.6) и 17.6 (0.1) мкмоль CO₂/м²с при соотношении 2:1 и 1:1 соответственно, R 7.3 (0.7) и 3.9 (0.2) мкмоль CO₂/м²с. Таким образом, баланс по углероду (Pn - R) был вдвое больше при соотношении КС/ДКС 2:1, а коэффициент отношения дыхания к фотосинтезу был одинаков в обоих вариантах.

При действии света высокой интенсивности на растения, выращенные на КС/ДКС 2:1 значения F_v/F_m , и PI_{ABS} по мере освещения падали, а значения DI_0/RC – росли, тогда как при соотношении КС/ДКС 1:1 наблюдалось восстановление значений F_v/F_m и PI_{ABS} после 1 ч облучения до контрольных значений. Также наблюдали восстановление значений эффективного квантового выхода F'_v/F'_m и скорости фотосинтетического электронного транспорта. Максимальное значение DI_0/RC наблюдали при

**Конференция молодых учёных
«Актуальные проблемы биологии развития»**

соотношении КС/ДКС 1:1 при 1 ч облучении, а далее (при 2-ч облучении) наблюдали снижение до контрольного значения. Таким образом, с одной стороны у растений салата выращенных при соотношении КС/ДКС 1:1, скорости фотосинтеза и дыхания были ниже, с другой стороны фотосинтетический аппарат быстрее адаптировался к свету высокой интенсивности, чем при соотношении КС/ДКС 2:1.

Работа поддержана грантом РФФИ №20-04-00512а.

Выражаю благодарность научному руководителю д.б.н. Креславскому Владимиру Даниловичу за помощь в постановке экспериментов и обсуждении результатов.



**МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
«АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ»
12-14 октября 2021 г**

Издательство «Перо»
109052, Москва, Нижегородская ул., д. 29-33, стр. 27, ком. 105
Тел.: (495) 973-72-28, 665-34-36
Подписано к использованию 04.10.2021.
Объем 12,1 Мбайт. Электрон. текстовые данные. Заказ 876.