

Сегментация в полной мере развита у трех типов животных: аннелид, артропод и хордовых. Метамерную организацию у них имеют как эктодермальные, так и мезодермальные производные. Как эволюционно более молодой, мезодермальный листок имеет наибольшую вариабельность в механизмах своего формирования в разных филогенетических линиях. Примечательно, что у позвоночных сегментация мезодермы происходит автономно, индуцируя зависимое развитие повторяющихся элементов нервной системы. У ракообразных и насекомых, напротив, эктодерма приобретает метамерное строение независимо, воздействуя на мезодерму. Несмотря на очень подробное сравнение молекулярных механизмов формирования серийно повторяющихся структур, отчетливо ощущается недостаток современных данных о сегментации тела кольчатых червей.

В связи с проблемой сегментации мезодермы нами получены новые и весьма ценные сведения на материале нормального развития и регенерации нереидных полихет. С помощью гибридизации *in situ* и выявления тканеспецифичных маркеров была описана динамика молекулярной разметки мезодермы и дифференцировка мышц. В ходе эмбрионального, личиночного развития и при каудальной регенерации паттерны активности гомологов *Twist*, *Mox*, *MyoD*, *Vasa* и *Piwi* демонстрируют метамерный характер. В развитии мышц и целома отмечен последовательный переднезадний порядок созревания. Вместе с известным посегментным распределением продуктов таких регуляторных генов, как *Engrailed*, *Gbx*, некоторые *Hox* и *NK*, наши данные указывают на скрытую метамерную организацию первичной трохофорной личинки и преимущественно одновременное проявление этой особенности в эктодерме и мезодерме. Мы полагаем, что циркумблостолярная закладка и ранняя метамеризация мезодермы нереид отражает эволюционную историю формирования третьего зародышевого листка. Наши данные поддерживают архихеломатную эволюционную гипотезу, по которой круговое расположение камер кишечной полости (цикломерия) у радиально-симметричных предковых форм превратилось в метамерию Bilateria.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (16-34-00472, 16-04-00991-а) с использованием оборудования РЦ РМИКТ и РЦ ММ СПбГУ.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И КЛЕТОЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ ЗАЧАТКОВ ГОНАД, ФОРМИРУЮЩИХСЯ *de novo* ПРИ БЕСПОЛОМ РАЗМНОЖЕНИИ У *Nais communis* (CLITELLATA: NAIDIDAE)

Колосов Н.И., Костюченко Р.П.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
e-mail: nikita-kolosov@yandex.ru, r.kostyuchenko@spbu.ru

Гонады – это специализированные органы, продуцирующие гаметы, и, следовательно, являющиеся принципиально важными структурами в онтогенезе каждого животного. Одними из важнейших участников морфогенетических процессов образования зачатков гонад у большинства Metazoa являются клетки половой линии. В эмбриональном периоде половая клеточная линия формируется путем наследования определенных цитоплазматических детерминант на самых ранних этапах эмбриогенеза (преформизм) или возникает путем индукции от соседних клеток на более поздних стадиях развития (эпигенез). Однако у некоторых животных линия половых клеток образуется и в постэмбриональном периоде, например из стволовых элементов, таких как i-клетки у гидры и т.д. Более того, показано, что предшественники половой линии могут мигрировать или ожидать начала процесса активного формирования гонады, т.е. обладают некой пластичностью в поведении, особенно при регенерации и бесполом размножении. В этом смысле, несомненный интерес для изучения формирования гонад представляют аннелиды, в частности малощетинковые черви из семейства Naididae (*Nais communis*). *N. communis* – гермафродит, способный, согласно ряду зоологических исследований на природном материале, к половому размножению, демонстрируя сексуализированные особи. Однако в условиях лабораторной культуры животные этого вида размножаются исключительно бесполом путем, а именно поперечным делением по типу паратомии, при которой полноценной половой системы у организма не образуется. В ходе паратомии на одном из сегментов материнского организма возникает зона деления, разделяющая сегмент на соматогенную и цефалогенную части. В пределах соматогенной части формируется новый хвостовой конец с зоной роста и молодыми сегментами материнского организма (переднего зооида), а в пределах цефалогенной части – головные сегменты дочернего (заднего) зооида. Затем дочерняя особь отделяется, и процесс повторяется снова. При таком типе репродукции, однако, потенции к половому размножению у *N. communis*, вероятно, сохраняются. Проведенные нами эксперименты по гибридизации *in situ* выявили экспрессию некоторых маркеров половых, стволовых и мультипотентных клеток в передних сегментах и показали наличие перспективных зачатков гонад, что может говорить

о сохранении у *N. communis* потенций к сексуализации после длительного периода бесполого размножения. Следовательно, клетки половой линии должны либо передаваться от материнского организма к дочернему, например, путем миграции, либо возникать *de novo* за счет стволовых элементов или дедифференцировки соматических клеток. Однако для достоверного результата недостаточно исключительно молекулярных данных, необходимы исследования на ультраструктурном и клеточном уровнях. Только комплексный подход позволит с достоверностью сказать о механизме возникновения гонад и стратегии передачи клеток половой линии при бесполом размножении.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №16-04-00991-а с использованием оборудования РЦ РМИКТ СПбГУ.

ТРАНС-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ЭНХАНСЕРОМ И ПРОМОТОРОМ НА ПРИМЕРЕ ГЕНА *YELLOW Drosophila melanogaster*

Кравчук О.И.¹, Савицкий М.Ю.²

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

²Университет Умео, Умео, Швеция

e-mail: Kravchuk444@mail.ru

Регуляция транскрипции генов у эукариот поддерживается различными регуляторными элементами, включающими промоторы, энхансеры и инсультаторы. Энхансер может активировать промотор на большом расстоянии, причем потенциально он способен взаимодействовать как с *цис*-, так и с *транс*-промотором. Явление межклеточной комплиментации, при которой энхансер на одной хромосоме может активировать промотор, расположенный на гомологичной хромосоме, получило название трансвекции. Подробнее всего трансвекция была изучена на примере гена *yellow Drosophila melanogaster*, который определяет окраску кутикулярных структур мух и имеет четкие фенотипы. Чтобы исследовать трансвекцию в разных местах генома, мы встраивали случайным образом трансгены в составе *P* элемента, формируя репрезентативную выборку. Трансгенные конструкции моделировали природную ситуацию *транс*-взаимодействий между энхансером и промотором *yellow*. Нами показано, что *транс*-активация может иметь место в разных местах генома. Сила трансвекции зависела от геномного окружения. Инсультаторные элементы, находящиеся в обоих гомологах, способны усиливать трансвекцию. Ранее было доказано, что энхансер предпочтительно активирует промотор, находящийся в *цис* положении. *Транс*-активация начинается, если *цис*-промотор нарушен. Используя трансгенные конструкции мы обнаружили сильную трансвекцию во многих местах генома даже при наличии интактного *цис*-промотора, но в некоторых сайтах *цис*-предпочтение выполнялось. Таким образом, мы показали, что *цис*-предпочтение энхансером промотора зависит от геномного окружения, и, видимо, в полной мере имеет место только в природной позиции *yellow*.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПОЛЯРНОСТИ СЕГМЕНТОВ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОЛИХЕТЫ *Alitta virens*

Мелентий А.Г., Костюченко Р.П., Козин В.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
e-mail: blackbox96@mail.ru

Среди высокоорганизованных билатеральных животных одними из наиболее сильных регенеративных потенций обладают кольчатые черви. У некоторых полихет даже в естественных условиях встречается восстановление целостной структуры тела всего из нескольких сегментов. Изучению проблемы регенерации и сегментации полихет сейчас уделяется достаточно большое внимание, поскольку это представляет огромный интерес для разрешения многих фундаментальных и прикладных вопросов биологии развития. Результаты исследований на аннелидах подчас обеспечивают новое понимание эволюции развития животных и регенерации.

Очевидно, что во время регенерации, клетки, формирующие границы сегментов получают позиционную информацию с помощью каких-то морфогенетических механизмов, например, сигналинга. Известно, что сигнальный путь Wnt принимает участие во многих биологических процессах, таких как закладка осей тела на этапах раннего эмбрионального развития, регуляция органогенеза, регенерация и сегментация. Участие *wnt* генов в процессе регенерации показано у губок, кишечнополостных и кольчатых червей, асцидий и амфибий. У аннелид, членистоногих и позвоночных животных выявлено участие компонентов Wnt/beta-катенинового сигналинга в процессе сегментации. Одним из наиболее консервативных генов-мишеней Wnt при создании пограничных территорий является *engrailed*. Ген *engrailed* также задействован в процессах формирования нервной

системы и развитии конечностей. Показано, что у дрозофил он участвует в паттернировании границ сегментов. Учитывая факт консерватизма метамерной экспрессии *engrailed* у первичноротых, можно ожидать, что у нашего объекта он будет выполнять ту же роль. Именно поэтому, с помощью метода гибридизации *in situ*, была исследована экспрессия мРНК *wnt1* и *engrailed* в регенератах *Alitta virens* на разных сроках после ампутации.

На первый же день после ампутации в тканях вокруг анального отверстия появляется достаточно сильный сигнал *wnt1* и комплементарный ему сигнал *engrailed*, расположенный задне-латерально. На более поздних стадиях экспрессия *engrailed* проявляется кольцом у задней границы будущих сегментов, а *wnt1* выявлен на вентральной стороне на самой границе, что следует считать отражением метамерной структуры регенерата. Позднее сигнал *engrailed* на дорсальной стороне затухает. Таким образом, к 8 дню после ампутации практически весь сигнал *wnt1* и *engrailed* сосредоточен на вентральной стороне тела.

Учитывая полученные в результате гибридизации *in situ* картины экспрессии *engrailed* и *wnt1*, можно предположить, что оба гена участвуют в формировании паттерна сегментации и обеспечении позиционной информации.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-14-01089 с использованием оборудования РЦ РМИКТ СПбГУ.

ОРТОВАНАДАТ НАТРИЯ ДЕМАСКИРУЕТ ВАЗОКОНСТРИКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ СЕРТОНИНОВЫХ 2В РЕЦЕПТОРОВ ЗА СЧЕТ ПОТЕНЦИРОВАНИЯ КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА В ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

Миронова Г.Ю., Авдонин П.П., Авдонин П.В.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва
e-mail: wereshelen@gmail.com

В сосудах серотониновые 2В рецепторы (5HT_{2B}) выполняют преимущественно вазодилаторную функцию. Однако, при некоторых патологиях, они работают как вазоконстрикторы. Это может быть связано как с повышением экспрессии 5HT_{2B} в гладкомышечных клетках сосудов (ГМК), так и с увеличением эффективности передачи сигнала от 5HT_{2B} на системы мобилизации кальция в ГМК. Целью работы было проверить, экспрессируются ли сократительные 5HT_{2B} в норме в ГМК, а также выявить основные компоненты их сигнального пути.

Объектами исследования были изолированные аорта и брыжеечная артерия крысы, ГМК выделенные из аорты крысы. Изменение внутриклеточной концентрации кальция ([Ca²⁺]_i) и активных форм кислорода (АФК) в ГМК регистрировали с помощью флуоресцентных зондов Fura-2 и DCFH-DA соответственно. Сокращение изолированных сосудов исследовали с помощью миографа.

Методом количественной ПЦР было показано, что во всех объектах исследования экспрессируются 5HT_{2B}, их наличие в ГМК было также подтверждено методами иммунофлуоресценции и Western-гибридизации. Известно, что активатор 5HT_{2B} BW723C86 вызывает сокращение сосудов крыс с ДОКА-солевой гипертензией. При этой патологии в клетках сосудов накапливаются АФК, происходит ингибирование тирозиновых фосфатаз (РТР) и, как следствие, накопление продуктов тирозинового фосфорилирования. Для воспроизведения таких условий мы использовали Na₃VO₄, который ингибирует РТР по сходному механизму. По итогам экспериментов на ГМК, Na₃VO₄ значительно увеличивал кальциевые ответы BW723C86. Антагонист 5-HT_{2B} RS127445 подавлял этот эффект, что говорит о специфичности действия BW723C86. Также этот эффект ингибировали антагонист тирозиновых Src киназ PP2, антиоксидант N-ацетилцистеин и ингибитор NADPH-оксидаз VAS2870. Эксперименты с DCFH-DA показали, что BW723C86 на фоне Na₃VO₄ увеличивает образование АФК в ГМК. В экспериментах на изолированных сосудах была выявлена демаскировка вазоконстрикторного эффекта BW723C86 на фоне Na₃VO₄.

Таким образом, показано, что в ГМК в норме экспрессируются вазоконстрикторные 5-HT_{2B}. Подобраны условия для демаскировки их сократительного эффекта и выявлено, что увеличение [Ca²⁺]_i в ответ на активацию 5-HT_{2B} опосредовано работой тирозиновых Src киназ и АФК.

ГУМОРАЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОРГАНОВ-ИСТОЧНИКОВ НОРАДРЕНАЛИНА В КРИТИЧЕСКИЙ ПЕРИОД МОРФОГЕНЕЗА

Муртазина А.Р.¹, Никишина Ю.О.¹, Бондаренко Н.С.¹, Дильмухаметова Л.К.¹, Сапронова А.Я.¹, Угрюмов М.В.^{1,2}

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

²Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва
e-mail: Aliya_mr89@mail.ru

Морфогенез отдельных органов и организма в целом происходит под контролем межклеточных химических сигналов в критический период онтогенеза, который у грызунов соответствует в основном перинатальному периоду развития. Одним из морфогенетических факторов является норадреналин (НА), который участвует в регуляции развития мозга и периферических органов-мишеней. Нарушение метаболизма НА в перинатальном периоде развития приводит к тяжелым врожденным заболеваниям. НА синтезируется в нейронах головного мозга, симпатической нервной системы, а также в хромаффинной ткани надпочечников и параганглиев. В перинатальном периоде развития все эти органы могут быть потенциальными источниками в общей системе циркуляции и поддерживать физиологически активную концентрацию НА в крови. В этот период практически отсутствует симпатическая регуляция, поэтому единственный путь регуляции – гуморальный. Мы предположили, что в перинатальном периоде онтогенеза поддержание физиологически активной концентрации НА в плазме крови осуществляется благодаря гуморальному взаимодействию между его центральными и периферическими источниками.

Для проверки нашего предположения была дана оценка секреторной активности каждого из изучаемых органов при выключении одного из них. В качестве объектов исследований использованы транзиторные источники НА – мозг и орган Цукеркандля (ОЦ), а также постоянные источники – надпочечники, секретирующие НА в общую систему циркуляции. На модели хронического ингибирования синтеза НА в мозге мы оценивали экспрессию генов ферментов синтеза НА тирозингидроксилазы (ТГ) и дофамин-β-гидроксилазы (ДБГ) методом ПЦР в реальном времени. Также содержание НА в исследуемых органах и концентрацию НА в плазме крови методом ВЭЖХ. Для разрушения норадренергических нейронов крысам на 2-й день жизни в желудочки мозга вводили анти-ДБГ-сапорин - гибридный молекулярный комплекс, состоящий из антител против ДБГ, связанных с цитотоксином сапорином.

Было показано, что через 48 часов после введения иммунотоксина в мозг содержание НА в мозге снизилось в 3 раза, концентрация НА в плазме крови в 1,5 раза, тогда как изменений в периферических органах не наблюдалось. Иммуноцитохимический анализ также показал, что именно через 48 часов токсин избирательно разрушил норадренергические нейроны в мозге. При этом уже через 48 часов наблюдалось значительное увеличение содержания мРНК ТГ и ДБГ в надпочечниках и ОЦ, что свидетельствует о компенсаторном усилении экспрессии этих ферментов на уровне транскрипции. Через 72 часа содержание НА в мозге оставалось сниженным, а уровень НА в крови вернулся контрольным значениям. Кроме того, изменилась секреторная активность периферических источников НА, что проявилось в увеличении содержания НА в надпочечниках и снижении в ОЦ. Интересно, что через 72 часа экспрессия генов ТГ и ДБГ в надпочечниках остается повышенной по сравнению с контролем, а в ОЦ – сохраняется на уровне контроля.

Таким образом, снижение уровня НА в мозге неонатальных крыс и вызванное этим снижение концентрации НА в крови привело к изменению секреторной активности периферических источников НА, что, в свою очередь, привело к восстановлению физиологически активной концентрации НА в общей системе циркуляции.

Работа осуществлялась при поддержке гранта РНФ №14-15-01122.

РЕПРОДУКТИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ТРЕХИГЛОЙ КОЛЮШКИ В ОЗЕРАХ БЕЛОГО МОРЯ

Мюге Л.Н., Барминцева А.Е., Мюге Н.С.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва
e-mail: shurshunyal@yandex.ru

Трехиглая колюшка (*Gasterosteus aculeatus* L.1758) – небольшая рыбка, широко распространенная в Северном полушарии. У нее сложное репродуктивное поведение, включающее: постройку гнезда самцом, сложные брачные танцы, а также заботу о потомстве, в которой участвует только самец. Он постоянно вентилирует гнездо с развивающейся икрой, а затем охраняет несколько первых недель мальков после их выклева. Для некоторых популяций колюшки показано наличие репродуктивной