

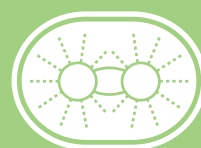
ISSN 0475-1450

Том 54, Номер 2

Март - Апрель 2023



ОНТОГЕНЕЗ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 54, номер 2, 2023

ОБЗОРЫ

Догаструляционное развитие амфибий: онтогенетическое разнообразие и эволюционно-экологические аспекты

А. Г. Десницкий

125

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генерализованная форма усачей комплекса *Barbus* (= *Labeobarbus*) *intermedius* в озере Тана: векторы морфологической изменчивости на разных стадиях постнатального онтогенеза

А. Н. Мироновский

139

Хемокин CCL2 активирует факторы гипоксического ответа, регулирует плюрипотентность и направленную эндотелиальную дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток человека

А. И. Шевченко, А. М. Арссан, С. М. Закиян, И. С. Захарова

148

Влияние разных режимов освещения и кормления на активность ферментов энергетического обмена у сеголетков атлантического лосося в условиях аквакультуры

М. В. Кузнецова, М. А. Родин, Н. С. Шульгина, М. Ю. Крупнова, А. Е. Курицын, С. А. Мурзина, Н. Н. Немова

162

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Развитие идеи Н.К. Кольцова о генетической организации междисков политенных хромосом *Drosophila melanogaster*

И. Ф. Жимулев, Т. Ю. Ватолина, В. Г. Левицкий, Т. Д. Колесникова, А. В. Цуканов

172

Консервативный белок RCC1 — новый компонент черных дисков политенных хромосом *Drosophila melanogaster*

Т. Ю. Зыкова, М. В. Мальцева, С. А. Демаков, Г. В. Похолкова, Ю. А. Веряскина, О. И. Лаврик, Т. Д. Колесникова, И. Ф. Жимулев

176

Contents

Vol. 54, No. 2, 2023

REVIEWS

Pregastrular Development of Amphibians: Ontogenetic Diversity and Eco-Devo

A. G. Desnitskiy

125

RESEARCH PAPERS

Generalized Form of Barbs of the *Barbus* (= *Labeobarbus*) *intermedius* Complex in Lake Tana: Vectors of Morphological Variability at Different Stages of Postnatal Ontogenesis

A. N. Mironovsky

139

Chemokine CCL2 Activates Hypoxia Response Factors Regulating Pluripotency and Directed Endothelial Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells

A. I. Shevchenko, A. M. Arssan, S. M. Zakian, and I. S. Zakharova

148

The Influence of Different Lighting and Feeding Regime on the Activity of Energy Metabolism Enzymes in Farmed Atlantic Salmon Fingerlings

M. V. Kuznetsova, M. A. Rodin, N. S. Shulgina, M. Yu. Krupnova, A. E. Kuritsyn, S. A. Murzina, and N. N. Nemova

162

SHORT COMMUNICATIONS

Development of N.K. Koltsov Idea about Genetic Organization of Interbands in *Drosophila melanogaster* Polytene Chromosomes

I. F. Zhimulev, T. Yu. Vatolina, V. G. Levitsky, T. D. Kolesnikova, and A. V. Tsukanov

172

Conservative Protein RCC1 Is a New Component of Black Bands of *Drosophila melanogaster* Polytene Chromosomes

T. Yu. Zyкова, M. V. Maltseva, S. A. Demakov, G. V. Pokholkova, Yu. A. Veryaskina, O. I. Lavrik, T. D. Kolesnikova, and I. F. Zhimulev

176

Статья посвящена столетию создания профессором П.П. Ивановым кабинета эмбриологии — предшественника кафедры эмбриологии Санкт-Петербургского государственного университета

ДОГАСТРУЛЯЦИОННОЕ РАЗВИТИЕ АМФИБИЙ: ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ЭВОЛЮЦИОННО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

© 2023 г. А. Г. Десницкий*, **

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра эмбриологии,
Университетская набережная, 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: adesnitskiy@mail.ru

**e-mail: a.desnitsky@spbu.ru

Поступила в редакцию 27.09.2022 г.

После доработки 30.01.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

В обзоре анализируются сравнительные и экологические аспекты преобразований раннего развития в классе Amphibia. Используются данные по разнообразию онтогенезов в ряде семейств отрядов Anura и Caudata, у которых многие виды утратили связь с водной средой. Модельные представители класса Amphibia (*Ambystoma mexicanum*, *Rana temporaria* и *Xenopus laevis*) имеют яйца небольшого размера (диаметр не более 2.5 мм), а замедление темпов клеточных делений и потеря их синхронности происходят на стадии средней бластулы. Однако филогенетически базальные виды амфибий (*Ascaplus truei*, *Cryptobranchus alleganiensis*) характеризуются крупными (диаметр 4–6 мм) и богатыми желтком яйцами и короткой серией синхронных делений бластомеров (синхронность теряется уже на 8-клеточной стадии дробления). У них нет “среднебластульного перехода” (midblastula transition), который характерен, например, для перечисленных выше модельных видов. С другой стороны, многие эволюционно продвинутые немодельные виды хвостатых и бесхвостых амфибий (например, *Desmognathus fuscus*, *Gastrotheca riobambae*, *Philoria sphagnicolus*) так же, как и базальные виды, характеризуются крупными, богатыми желтком яйцами и ранней потерей синхронности клеточных делений. Филогенетический анализ предполагает, что паттерн дробления зародышей у двух наиболее подробно изученных представителей амфибий, мексиканского аксолотля (Caudata) и африканской шпорцевой лягушки (Anura), представляет гомоплазию. Среднебластульный переход, который характерен для этих двух видов, мог эволюционировать конвергентно в двух отрядах амфибий как эмбриональная адаптация к протеканию развития в стоячей воде.

Ключевые слова: амфибии, паттерн делений дробления, размер яйца, репродуктивные стратегии, среднебластульный переход, эволюция развития

DOI: 10.31857/S0475145023020027, **EDN:** XEUFTM

ВВЕДЕНИЕ

Хвостатые амфибии *Ambystoma mexicanum*, *Lisotriton vulgaris*, *Pleurodeles waltl*, бесхвостые амфибии *Rana pipiens*, *Rana temporaria*, *Xenopus laevis* и еще несколько видов европейских, японских и североамериканских тритонов и лягушек являются модельными и обстоятельно изученными объектами биологии развития (Rugh, 1951; Dettlaff, Vassetzky, 1991; Nieuwkoop, Faber, 1994; Nieuwkoop, 1996; Детлаф, 2001 и др.). В частности, первичная дифференциация на анимальные и вегетативные бластомеры происходит на стадии

восьми клеток (в результате третьего деления дробления, борозды которого являются широкими); в анимальном полушарии раннего зародыша после оплодотворения протекают 10–12 быстрых синхронных делений дробления. Затем на стадии средней бластулы наступает так называемый “среднебластульный переход”, когда замедляется скорость клеточных делений и материнский контроль раннего онтогенеза сменяется на зиготический (Signoret, Lefresne, 1971; Newport, Kirschner, 1982; Collart et al., 2017; Jiang et al., 2017; Zhang et al., 2017; Vastenhouw et al., 2019).

Однако мексиканский аксолотль, африканская шпорцевая лягушка и несколько видов лягушек и тритонов из умеренных широт Северного полушария не представляют всех земноводных. Класс Amphibia (согласно данным на 12 сентября 2022 г.) включает 7500 видов Anura (бесхвостые амфибии), 774 вида Caudata (хвостатые амфибии) и 215 видов Gymnophiona (безногие амфибии) (AmphibiaWeb, 2022). Амфибии характеризуются большим экологическим и онтогенетическим разнообразием (Duellman, Trueb, 1994; Elinson, del Pino, 2012; Gomez-Mestre et al., 2012; Pereira et al., 2017; Liedtke et al., 2022 и др.). Их репродуктивную стратегию (reproductive mode) определяют как сочетание особенностей размножения и развития, которые включают: место откладки яйца, характеристику яйца и кладки, скорость и длительность развития, стадию и размер организма при вылуплении и тип родительской заботы, если она есть (Duellman, 1985). Особенно разнообразны репродуктивные стратегии в отряде Anura, где по новейшим данным их насчитывают около 70 (Nunes-de-Almeida et al., 2021).

Уже около ста лет тому назад было известно значительное число видов бесхвостых и хвостатых амфибий с крупными, богатыми желтком яйцами (Sampson, 1900, 1904; Eycleshymer, 1904; Hilton, 1904; Smith, 1906; Noble, 1927 и др.). Процесс дробления у них существенно отличается от “стандартного” раннего развития у таких животных, как, например, обыкновенный тритон, мексиканский аксолотль, шпорцевая и травяная лягушки. Тем не менее, в течение многих десятилетий амфибии с крупными яйцеклетками (диаметр более 2.5–3 мм) практически не привлекали внимания эмбриологов. Определенное оживление интереса к исследованиям раннего развития этих животных появилось лишь примерно 30–40 лет тому назад (del Pino, Escobar, 1981; Elinson, del Pino, 1985, del Pino, 1989; Elinson et al., 1990; Collazo, Marks, 1994; Wake, Hanken, 1996). Однако до настоящего времени больше внимания уделяли сравнительному анализу гастрюляции в классе амфибий (Keller, Shook, 2004; del Pino et al., 2007; Moysa et al., 2007; Elinson, del Pino, 2012; Desnitskiy, 2020), чем догастрюляционным этапам их эмбриогенеза.

Настоящая статья посвящена главным образом сравнительным и эволюционно-экологическим аспектам протекания догастрюляционного развития в пределах класса Amphibia. При этом неизбежно приходится использовать также и некоторые данные литературы по последующим этапам онтогенеза. Наибольшее внимание мы уделяем представителям отряда Anura, самой обширной группы земноводных. В качестве отправной точки берется рассмотрение догастрюляционного эмбриогенеза двух видов неотропических лягушек *Eleutherodactylus coqui* и *Gastrotheca riobambae*, развитие ко-

торых изучали в последние годы. Далее привлечены данные по раннему онтогенезу лягушек из других семейств и/или из других частей света. Затем после рассмотрения данных соответствующей литературы по отряду Caudata кратко обсуждаются данные по эмбриональному развитию представителей отряда Gymnophiona. Наконец, представлены результаты филогенетического анализа процесса дробления зародышей амфибий. Анцестральными онтогенетическими признаками для класса Amphibia являются крупный размер яйца (диаметр более 2.5 мм), вертикальные борозды третьего деления дробления и утрата синхронности blastomeres уже на ранних стадиях дробления (чаще всего на 8-клеточной стадии), что предполагает отсутствие среднебластульного перехода в развитии самых примитивных представителей Anura и Caudata.

РАННЕЕ РАЗВИТИЕ НЕКОТОРЫХ “НЕМОДЕЛЬНЫХ” БЕСХВОСТЫХ АМФИБИЙ

Подавляющее большинство видов бесхвостых амфибий, изучаемых эмбриологами, обитают в умеренных широтах Европы, Азии и Северной Америки. Как правило, эти животные (например, *Bufo bufo*, *Rana pipiens*, *R. temporaria*) характеризуются бифазным жизненным циклом: откладывают яйца в стоячую воду и имеют личиночную стадию плавающего экзотрофного головастика, который затем претерпевает метаморфоз перед выходом на сушу. Такой же бифазный цикл развития характерен для африканских лягушек *X. laevis* и *X. tropicalis* (семейство Pipidae), ставших к настоящему времени модельными объектами эмбриологии амфибий (Dettlaff, Vassetzky, 1991; Nieuwkoop, Faber, 1994; Hirsch et al., 2002), а также для некоторых других тропических лягушек и жаб (Haddad, Prado, 2005).

Однако у значительного числа тропических видов Anura имеет место прямое развитие без стадии головастика. Из яиц, откладываемых на землю, в подземные норы или в гнезда на деревьях, вылупляются миниатюрные лягушата (Lutz, 1947; Callery, 2006; Hedges et al., 2008; Padial et al., 2014; Liedtke et al., 2022). Стадия головастика отсутствует более чем у 1800 видов бесхвостых амфибий (более 25% от числа всех описанных видов). Прямое развитие возникало в пределах отряда Anura независимо более 10 раз. В эволюционном отношении оно является более продвинутым по сравнению с анцестральным бифазным жизненным циклом, включающим личиночную стадию (Duellman, 1989; Elinson, 1990, 2013). Прямое развитие у лягушек всегда сопряжено с увеличением диаметра яйца, значительным уменьшением числа яиц в кладке, а также наличием родительской заботы о потомстве (Gomez-Mestre et al., 2012).

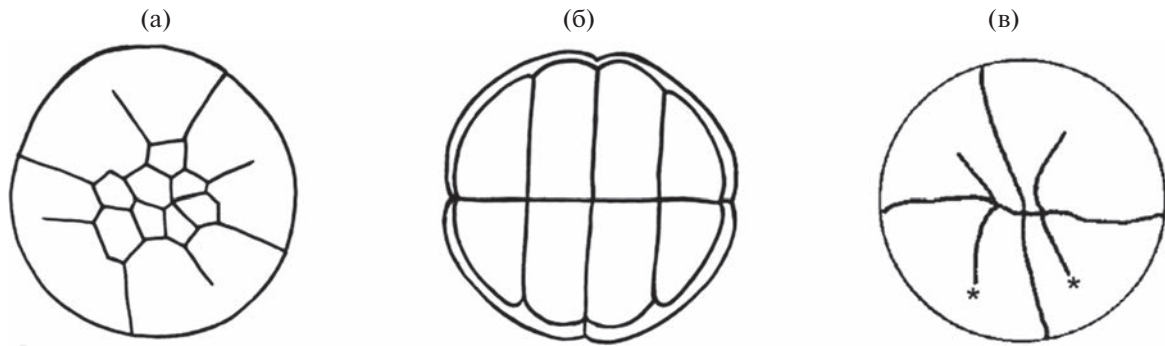


Рис. 1. Схематичное изображение ранних зародышей трех видов лягушек. Вид с анимального полюса. (а) зародыш *Eleutherodactylus portoricensis* на стадии 16 бластомеров (по: Gitlin, 1944, с упрощениями); (б) зародыш *Rana temporaria* на стадии 16 бластомеров (по: Morgan, 1897, с упрощениями); (в) зародыш *Gastrotheca riobambae* при формировании стадии восьми бластомеров (по: del Pino, Looor-Vela, 1990, с упрощениями). Звездочками обозначены две вертикальные борозды третьего деления дробления зародыша *G. riobambae*. Диаметр яйца у *E. portoricensis*, *R. temporaria* и *G. riobambae* составляет соответственно 3–4 мм, около 2 мм и около 3 мм.

Среди бесхвостых амфибий, у которых нет стадии головастика, наиболее изученным видом является листовая лягушка *E. coqui* (семейство Eleutherodactylidae), типичный представитель фауны острова Пуэрто-Рико (Elinson, 2021). Семейство Eleutherodactylidae включает 233 вида лягушек (AmphibiaWeb, 2022), обитающих во влажных тропических лесах Центральной и Южной Америки, а также на островах Карибского бассейна. Почти все эти виды, по-видимому, характеризуются прямым развитием (Callery et al., 2001). Названное семейство лягушек вместе с другими близко родственными неотропическими семействами Brachycephalidae (77 видов), Ceuthomantidae (6 видов), Craugastoridae (129 видов) и Strabomantidae (775 видов) объединяют в обширную группу Tettaraia (более 1200 видов на огромной территории от юга США до севера Аргентины). Характерными признаками для этой группы являются размножение на земле и прямое развитие, без стадии головастика (Heinike et al., 2007, 2018; Hedges et al., 2008). Самка *Eleutherodactylus* откладывает примерно 40 богатых желтком и почти непигментированных яиц диаметром 3.5–4.0 мм (Elinson et al., 1990). Напомним, что зрелое яйцо *X. laevis* имеет диаметр 1.2–1.4 мм и, таким образом, его объем примерно в 20 раз меньше объема яйца *E. coqui*. В лабораторных условиях при температуре 25°C приблизительно через 17 сут инкубации из яиц *Eleutherodactylus* вылупляются лягушата.

Более 500 видов Anura из нескольких других семейств, обитающих в Африке, Южной и Юго-Восточной Азии, Австралии и Океании также характеризуются прямым развитием (Duellman, Trueb, 1994; Callery et al., 2001; Desnitskiy, 2012; AmphibiaWeb, 2022). Однако ранний эмбриогенез у них практически не изучен и поэтому мы их сейчас не рассматриваем.

Некоторые сведения о начальных этапах эмбриогенеза *E. coqui* даны в ряде статей (del Pino, Elinson, 2003; Elinson, 2009; Elinson et al., 2011; Schmid et al., 2012; Karadge, Elinson, 2013). Порядок прохождения борозд раннего дробления отличается от такового у *Xenopus*, *Rana* и многих других бесхвостых амфибий. Так, у большинства зародышей *E. coqui* морфологическая дифференциация на анимальные и вегетативные бластомеры происходит только на 16-клеточной стадии, т.е. после четвертого деления дробления. Возникающие на этой стадии дробления восемь маленьких анимальных бластомеров составляют всего лишь около 1% от общего объема яйца *E. coqui* и впоследствии образуют очень тонкую, полупрозрачную крышу бластоцеля, состоящую из одного слоя клеток.

Сходный паттерн раннего дробления характерен и для других представителей семейства Eleutherodactylidae: *Eleutherodactylus nubicola* (Lynn, 1942), *Eleutherodactylus portoricensis* (Gitlin, 1944) и *Adelophryne maranguapensis* (de Lima et al., 2016). Однако они изучены в меньшей степени, чем *E. coqui*. На рис. 1а–1б представлено сопоставление ранних зародышей *E. portoricensis* и одного из модельных видов лягушек *R. temporaria*.

У зародышей *E. coqui* синхронность делений раннего дробления поддерживается, по-видимому, минимум до 32-клеточной стадии (del Pino, Elinson, 2003; Schmid et al., 2012). Эмбриональное развитие характеризуется быстрыми темпами, однако продолжительность интервалов между первыми пятью синхронными делениями дробления точно не определена. Очень важно отметить, что инициация зиготической транскрипции (сходной с таковой при среднебластальном переходе у *X. laevis*) сопряжена у *Eleutherodactylus* не со стадией средней бластулы, а с началом гаструляции (Chatterjee, Elinson, 2014). Полной аналогии

со среднебластульным переходом, характерным для модельных видов амфибий, скорее всего нет: у *A. mexicanum* и *X. laevis* при формировании средней бластулы происходит не только обширная активация зиготической транскрипции, но одновременно также потеря синхронности делений клеток и перестройка клеточного цикла. Таким образом, у некоторых немодельных видов Анига активация зиготической транскрипции и потеря синхронности делений бластомеров не обязательно “сцеплены” между собой и могут происходить на разных стадиях раннего развития. Разумеется, необходимо более подробный морфологический и молекулярно-генетический анализ догастрюляционных этапов эмбриогенеза неотропической лягушки *E. coqui*.

Среди других неотропических бесхвостых амфибий с “нестандартными” паттернами раннего онтогенеза относительно подробно изучали только сумчатую лягушку *G. riobambae* (семейство Hemiphractidae, которое состоит из 122 видов) (del Pino, Escobar, 1981; Elinson, del Pino, 1985; del Pino, Elinson, 2003; del Pino, 1989, 2019, 2021). Она обитает в горных долинах Эквадора на высоте 2500–3200 м над уровнем моря. Спаривание лягушек происходит на земле, а в кладке в среднем 130 богатых желтком и очень слабо пигментированных яиц диаметром около 3 мм. Зародыши развиваются в сумке на спине матери примерно в течение 3–3.5 мес. (температура в террариуме 17–23°C), после чего сформировавшиеся головастики освобождаются из сумки в воду. Таким образом, для этой сумчатой лягушки характерен бифазный жизненный цикл. Ранний эмбриогенез *G. riobambae* характеризуется очень медленными темпами: длительность первого клеточного цикла в периоде дробления при 17°C составляет около 12 ч (однако зависимость скорости развития от температуры не изучали).

В анализе особенностей начальных этапов эмбриогенеза *G. riobambae* (del Pino, Looor-Vela, 1990) была использована классификация паттернов дробления у позвоночных, предложенная Нельсеном (Nelsen, 1953, p. 283). Борозды первых двух дроблений являются меридиональными и постепенно проходят по яйцу *Gastrotheca* от анимального полюса к вегетативному. Однако борозды третьего дробления не меридиональные, а вертикальные (рис. 1в). Предполагают, что это связано с большим размером яйца (del Pino, Looor-Vela, 1990). Вертикальные борозды (так же как и меридиональные борозды предыдущих делений дробления) имеют тенденцию проходить в направлении от анимального полюса к вегетативному, но они не пересекают оба полюса яйца и не проходят через его центр. Потеря синхронности делений, появление ядрышек и связанная с этим активация синтеза рРНК происходят уже на стадии восьми бластомеров (del Pino, Looor-Vela, 1990; del

Pino, 2018). Напомним, что у *X. laevis* период синхронных делений дробления включает около десяти клеточных циклов, каждый из которых при 17°C длится 45 мин (Dettlaff, Vassetzky, 1991).

По ряду физиологических признаков (очень медленный темп дробления, ранняя потеря синхронности клеточных делений, активация синтеза РНК на начальных стадиях дробления) эмбриогенез *G. riobambae*, происходящий под защитой материнского организма, в какой-то степени напоминает раннее развитие млекопитающих. Сходство с зародышами млекопитающих проявляется еще и в том, что зародыши этой сумчатой лягушки получают от материнского организма воду, а также с помощью матери осуществляется газообмен (del Pino, Escobar, 1981; del Pino, 2018). Однако раннее развитие сумчатых лягушек, разумеется, отличается от раннего развития млекопитающих крупным размером яйцеклеток и большим запасом желтка.

Стадии средней бластулы и ранней гастрюлы у *G. riobambae* достигаются соответственно примерно через 4 и 7 дней после оплодотворения (del Pino, Escobar, 1981; Elinson, del Pino, 1985; Elinson et al., 1990; del Pino, 2019). Бластула гастрютеки состоит из маленьких анимальных бластомеров, которые образуют однослойную, полупрозрачную крышу бластоцеля, и крупных, богатых желтком вегетативных бластомеров.

Перейдем к рассмотрению раннего развития некоторых других лягушек, имеющих бифазный жизненный цикл, у которых онтогенез имеет особенности, отличные от модельных бесхвостых амфибий со стадией активно плавающего экзотрофного головастика. Особый интерес представляют данные (de Bavay, 1993) по эмбриологии австралийской моховой лягушки *Philoria* (*Kyarranus*) *sphagnicolus* (семейство Myobatrachidae), живущей во влажных горных субтропических лесах штата Новый Южный Уэльс. В кладке 30–90 непигментированных и богатых желтком яиц диаметром около 3.3 мм. Развитие протекает в пенном гнезде, находящемся в небольшой норе или впадине во влажном мху. Синхронность делений дробления утрачивается уже на 8-клеточной стадии. В этой статье показано, что “плоскость третьего дробления вертикальная, как у многих амфибий с богатыми желтком яйцами” (de Bavay, 1993, p. 151). Скорость развития достаточно медленная: при 18°C гастрюляция начинается не ранее, чем через 60 ч после оплодотворения. После вылупления головастики *P. sphagnicolus* остаются в гнезде. Они малоподвижны и питаются эндотрофно, за счет большого запаса желтка. Метаморфоз происходит в гнезде и завершается примерно через 55 дней после оплодотворения.

Развитие в пенных и студенистых гнездах вообще характерно для нескольких больших се-

мейств у тропических и субтропических лягушек на разных континентах (Gomez-Mestre et al., 2012; Pereira et al., 2017 и др.). Такие гнезда являются проявлением заботы о потомстве и создаются на базе специальных выделений одной или обеих родительских особей (в зависимости от вида). Гнезда могут защищать отложенную кладку яиц от хищников, микробных заражений, высыхания, солнечного облучения и колебаний температуры. Наличие пенного гнезда не обязательно коррелирует с большим размером яйца, развитием вне воды и формированием эндотрофного головастика.

Возвращаясь к австралийскому семейству Myobatrachidae, включающему 136 видов, заметим, что развитие эндотрофных малоподвижных головастика в наземных пенных или студенистых гнездах (сходно с *P. sphagnicolus*) характерно для примерно 10 видов из родов *Philoria*, *Crinia* и *Geocrinia* (Desnitskiy, 2010). Уместно вспомнить также о 116 эндемичных видах тропического острова Мадагаскар видах подсемейства Cophylinae (семейство Microhylidae), хотя их эмбриогенез не изучен. Узкоротые лягушки этого подсемейства имеют большие, богатые желтком яйца, из которых в пенных гнездах (на земле, под землей или в дуплах деревьев) развиваются эндотрофные малоподвижные головастики (Scherz et al., 2016; AmphibiaWeb, 2022). В нашу задачу сейчас не входит перечислять все семейства бесхвостых амфибий с крупными яйцами, которые развиваются в пенных или студенистых гнездах вне воды. Трудно назвать точное число таких видов лягушек и жаб, однако очевидно, что их не менее нескольких сотен.

Особого внимания заслуживает состоящее из двух видов семейство Ascaphidae. Эти очень примитивные (филогенетически базальные) лягушки, живущие в штатах Айдахо, Вашингтон, Калифорния, Монтана, Орегон (США) и провинции Британская Колумбия (Канада), откладывают крупные, богатые желтком и непигментированные яйца (диаметр около 4 мм) под камнями или скалами на дне горных рек с холодной быстро текущей водой. Экзотрофные плавающие головастики приступают к метаморфозу не ранее, чем после одного года личиночного развития (AmphibiaWeb, 2022). Изучение раннего эмбриогенеза *Ascaphus truei* показало, что борозды третьего деления дробления являются вертикальными, а синхронность делений бластомеров утрачивается на 8-клеточной стадии (Brown, 1975, 1989). Данные по особенностям паттерна дробления у зародышей бесхвостых амфибий из ряда других семейств, а также предложенную нами классификацию типов дробления в классе Amphibia можно найти в предыдущих публикациях (Desnitskiy, 2014; Десницкий, 2019).

Любопытно сопоставить данные по догаструляционному развитию и репродуктивным стратегиям у трех видов лягушек с крупными яйцами, вертикальной ориентацией борозд третьего дробления и очень ранней утратой синхронности клеточных делений. Как указано выше, репродуктивные стратегии этих лягушек совершенно разные: эмбриональное развитие у *G. riobambae* протекает в сумке на спине материнской особи, у *P. sphagnicolus* — в наземном пенном гнезде, а у *A. truei* — в текущей воде. Однако эти репродуктивные стратегии оказывают весьма сходное влияние на паттерн раннего дробления у представителей разных семейств бесхвостых амфибий из разных частей света.

РАННЕЕ РАЗВИТИЕ НЕКОТОРЫХ “НЕМОДЕЛЬНЫХ” ХВОСТАТЫХ АМФИБИЙ

Традиционно основными модельными объектами экспериментальной эмбриологии из числа Caudata были североамериканские амфибии *Ambystoma maculatum*, *A. mexicanum*, европейские *L. vulgaris*, *P. waltl* и еще несколько других видов из семейств Ambystomatidae и Salamandridae (Rugh, 1962; Dettlaff, Vassetzky, 1991; Signoret, Collenot, 1991; Детлаф, 2001). В отношении паттерна дробления и наличия среднебластульного перехода их догаструляционный онтогенез сходен с таковым у модельных видов Anura. Большинство немодельных хвостатых амфибий обитает в Северной Америке, герпетофауна которой вообще отличается максимальным разнообразием Caudata (AmphibiaWeb, 2022). Там живут представители девяти из десяти семейств, входящих в данный отряд амфибий (причем пять семейств обитают только на этом континенте).

В начале XX века североамериканские хвостатые амфибии с крупными, богатыми желтком яйцами из семейств Cryptobranchidae, Plethodontidae и Proteidae неоднократно служили в качестве объектов экспериментально-эмбриологических исследований (Eycleshymer, 1904; Goodale, 1911; Smith, 1922). Однако затем интерес биологов развития к этим амфибиям угас, вероятно, вследствие достижений школы Ганса Шпемана (Spemann, 1938) и других известных авторов (например, Briggs, 1972; Nieuwkoop, 1973; Toivonen et al., 1975), работавших с зародышами Caudata из семейств Ambystomatidae и Salamandridae.

Начнем с семейства Plethodontidae (безлегочные саламандры), включающего 495 видов, что составляет более 60% от общего числа видов в отряде хвостатых амфибий. Для этого семейства характерно значительное экологическое и онтогенетическое разнообразие. Большинство видов характеризуется прямым развитием, протекающим вне воды: например, в расщелинах между камня-

ми, под корой гниющих бревен, в кронах деревьев и т.д. Однако встречаются также и различные варианты бифазного жизненного цикла с водной личинкой (Wake, Hanken, 1996; AmphibiaWeb, 2022). Догастрюляционное развитие зародышей безлегочных саламандр было исследовано в ряде работ; диаметр яйца варьировал у изученных видов от 2.2 до 6.9 мм (Hilton, 1904; Goodale, 1911; Humphrey, 1928; Collazo, Marks, 1994; Marks, Collazo, 1998; Collazo, Keller, 2010 и др.). Несмотря на различия репродуктивных стратегий, синхронность делений клеток у ранних зародышей всех видов утрачивалась уже на 8-клеточной стадии (обзор: Desnitskiy, 2011). У большинства видов семейства Plethodontidae борозды третьего деления дробления проходят в направлении от анимального полюса яйца к вегетативному полюсу.

Представители семейств Cryptobranchidae (5 видов) и Proteidae (8 видов) откладывают в воду непигментированные и богатые желтком яйца диаметром 5–7 мм. У Cryptobranchidae догастрюляционный онтогенез изучен на примере американского скрытожаберника *Cryptobranchus alleganiensis* (Smith, 1906, 1922, 1926), а также азиатских *Andrias davidianus* (Luo et al., 2007) и *Andrias japonicus* (*Megalobatrachus maximus*) (de Bussy, 1905). Описания раннего дробления у зародышей этих животных хорошо совпадают с соответствующими данными, полученными на Plethodontidae (период синхронных делений короткий, а дифференцировка на анимальные и вегетативные blastomeres происходит только после четвертого деления дробления). У Proteidae начальные этапы развития изучены только у американского протей *Necturus maculosus* (Eycleshimer, 1904; Eycleshimer, Wilson, 1910; Nelsen, 1953). Паттерн дробления в основном сходен с таковым у Cryptobranchidae и Plethodontidae, однако отличается большей вариабельностью прохождения борозд раннего дробления (даже у зародышей из одной и той же кладки). Так, борозды первых двух делений дробления у *Necturus* иногда могут быть не меридиональными, а вертикальными; борозды третьего дробления вертикальные (Nelsen, 1953).

Перейдем к рассмотрению азиатского семейства Hynobiidae (88 видов). У большинства представителей этого семейства диаметр откладываемого в воду пигментированного яйца составляет 1.5–3.2 мм. Борозды третьего дробления широтные, синхронность делений анимальных blastomeres утрачивается на 16-клеточной стадии у *Hynobius nebulosus* (Kunitomo, 1910) и *Salamandrella keyserlingii* (Сытина и др., 1987). Однако для обоих этих видов характерны различия в размерах более мелких анимальных и более крупных вегетативных blastomeres такого же порядка, как у уже упомянутых зародышей аксолотля и тритонов. В целом, по-видимому, у дробления этих представителей семейства Hynobiidae имеется больше

сходства со стандартным дроблением Ambystomidae и Salamandridae, чем с нестандартным дроблением Plethodontidae, Proteidae и Cryptobranchidae. Особого внимания заслуживает *Onychodactylus japonicus* (Iwasawa, Kera, 1980). У этого вида яйцеклетки крупные и непигментированные, диаметром около 5 мм, борозды третьего дробления вертикальные (в отличие от вышеупомянутых представителей семейства Hynobiidae) и процесс дробления весьма сходен с таковым у зародышей безлегочных саламандр, американского протей и скрытожаберника. В литературе нет данных об особенностях догастрюляционного онтогенеза у четырех небольших семейств хвостатых амфибий (Amphiumidae, Dicamptodontidae, Rhyacotritonidae и Sirenidae), живущих в Северной Америке и объединяющих 16 видов.

Наконец, вернемся к семействам Ambystomidae (32 вида) и Salamandridae (130 видов), к которым принадлежат несколько хорошо изученных модельных видов со среднебластульным переходом. Отметим, что оба эти семейства представляют лишь чуть более 20% от общего числа видов хвостатых амфибий. Однако есть основания предполагать, что в семействе Salamandridae имеются виды с отклонениями от стандартного протекания догастрюляционного онтогенеза. Значительное число европейских и азиатских видов семейства Salamandridae — *Calotriton asper*, *Echinotriton andersoni*, *Euproctus montanus*, *Mertensiella caucasica*, *Pachytriton brevipes*, *Pachytriton labiatus*, *Salamandra salamandra* и другие — характеризуется крупными и богатыми желтком яйцами (Noble, 1927; Gasser, 1964; Tarkhishvili, Serbinova, 1997; Buckley et al., 2007; AmphibiaWeb, 2022). Самые начальные этапы развития происходят у *Echinotriton* на земле под опавшими листьями недалеко от водоема, у *Salamandra* в яйцеводах материнской особи, а у остальных упомянутых видов в текущей воде. Данные по паттерну дробления у живородящей *S. salamandra* (Grönroos, 1895) больше сходны с данными, полученными на видах из семейств Cryptobranchidae, Plethodontidae и Proteidae, чем с таковыми у обыкновенного, альпийского, испанского или японского тритона.

О РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ В ОТРЯДЕ БЕЗНОГИХ АМФИБИЙ

Представители отряда Gymnophiona обитают в тропиках Южной и Центральной Америки, Африки, Южной и Юго-Восточной Азии. У видов с водной личинкой и видов с прямым развитием яйца крупные и богатые желтком (диаметр соответственно до 8–10 мм и 3–6 мм); в кладке не более нескольких десятков яиц (Exbrayat, 2006; Gomez et al., 2012). У живородящих видов диаметр яйца 1–2 мм и самка обычно вынашивает лишь несколько зародышей (Wake, 2015). Первые эм-

бриологические исследования безногих амфибий были выполнены в конце XIX века (Sarasin, Sarasin, 1887; Brauer, 1899). Однако данные по раннему эмбриогенезу носили предварительный характер, по-видимому, вследствие трудностей в получении материала. Проблема получения данных по анализу ранних стадий эмбриогенеза гимнофион оставалась весьма актуальной и на протяжении всего последующего столетия, поскольку опубликованные за последние 30 лет три таблицы развития не включают стадии дробления и гаструляции (Sammouri et al., 1990; Dünker et al., 2000; Pérez et al., 2009). Таким образом, среди безногих амфибий на сегодня нет ни одного хорошо изученного модельного вида.

Единственной работой, в которой достаточно подробно анализировали дробление яйца гимнофион, является статья Свенссона (Svensson, 1938) на азиатском виде с личиночным развитием *Ichthyophis glutinosus* (семейство Ichthyophiidae, включающее 57 видов). Дробление у этого вида голобластическое с очень маленькими анимальными бластомерами. В целом оно напоминает дробление тех представителей бесхвостых и хвостатых амфибий, которые имеют крупные яйца с большим содержанием желтка. Поэтому трудно согласиться с основанным на работах конца XIX в. мнением О.М. Ивановой-Казас (1995, с. 230) о меробластическом характере дробления у Gymnophiona. Все изученные до сих пор представители класса Amphibia имеют голобластическое дробление (Elinson, del Pino, 2012; del Pino, 2018).

ПОПЫТКА ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДОГАСТРУЛЯЦИОННОГО РАЗВИТИЯ

Описываемый в учебниках (например, Signoret, Collenot, 1991; Barresi, Gilbert, 2020) паттерн догаструляционного онтогенеза характерен далеко не для всех амфибий. По-видимому, не многим более 50–60% видов отряда Anura имеют такой же (стандартный) паттерн раннего развития, как, например, *R. temporaria* или *X. laevis* и не более 20% видов отряда Caudata — такой же, как *A. mexicanum* или *P. waltil*. В отряде Gymnophiona видов со стандартным паттерном дробления (характерным для модельных видов Anura и Caudata) и последующим среднебластульным переходом, по-видимому, вообще нет.

Большой размер яйца очень часто связан с переходом к асинхронным делениям уже на ранних этапах дробления зародыша (Desnitskiy, 2018; Десницкий, 2019). Это могут быть как филогенетически базальные виды (хвостатые амфибии *A. davidianus*, *A. japonicus*, *C. alleganiensis*, лягушка *A. truei*), так и эволюционно продвинутые виды (безлегочная саламандра *Ensatina eschscholtzii*, лягушки *G. riobambae*, *P. sphagnicolus*, *Rhacophorus ar-*

boreus). Такой же ход дробления характерен и для двоякодышащих рыб *Lepidosiren paradoxa* и *Neoceratodus forsteri* (Kemp, 1982; Kershaw et al., 2009; Desnitskiy, 2015), которые являются ближайшими живыми родственниками наземных позвоночных (Brinkmann et al., 2004; Liang et al., 2013).

Было высказано предположение (Desnitskiy, 2014), что паттерн догаструляционного онтогенеза с утратой синхронности делений уже на 8-клеточной стадии и отсутствием дифференцировки на анимальные и вегетативные бластомеры в ходе третьего дробления является анцестральным для класса Amphibia, хотя многие эволюционно продвинутые виды бесхвостых и хвостатых земноводных тоже имеют этот же паттерн развития. Стандартный паттерн раннего онтогенеза (обширная серия 10–12 быстрых синхронных делений бластомеров, включая широтные борозды третьего дробления), характерный для модельных видов *A. mexicanum* и *X. laevis*, вероятно, является эволюционно продвинутым и возник независимо в отрядах Anura и Caudata. На наш взгляд, в пользу конвергентного возникновения среднебластульного перехода говорит факт некоторых различий в отношении цитофизиологии стадии бластулы у этих двух видов. У аксолотля развитие блокируется на среднебластульном переходе под воздействием ингибитора транскрипции α -аманитина (Signoret, 1980; Lefresne et al., 1998). Напротив, у шпорцевой лягушки процесс десинхронизации клеток не чувствителен к α -аманитину (Newport, Kirschner, 1982). Наконец, сразу после среднебластульного перехода клетки зародыша *X. laevis* приобретают индивидуальную подвижность, тогда как у зародыша *A. mexicanum* этого не наблюдали (Andéol, 1994; Lefresne et al., 1998).

Представляло интерес выполнить сравнительно-филогенетический анализ процесса догаструляционного развития амфибий с целью проверить и уточнить наши интуитивные предположения. Исследование такого типа не имеет аналогов в мировой литературе. Однако нам пришлось ограничиться только отрядом Caudata, поскольку ситуация в систематике и филогении Anura менее стабильна, чем ситуация в систематике и филогении хвостатых амфибий. Представления о классификации и эволюции бесхвостых амфибий постоянно уточняются или даже пересматриваются (например, Streicher et al., 2018). Кроме того, число современных видов Anura почти в десять раз превышает число современных видов Caudata (AmphibiaWeb, 2022). Данные по особенностям паттерна дробления известны примерно для 4.65% видов хвостатых амфибий. Для бесхвостых амфибий соответствующая информация имеется в литературе менее чем для 1% видов.

Для проведенного нами сравнительного и филогенетического анализа процесса дробления у

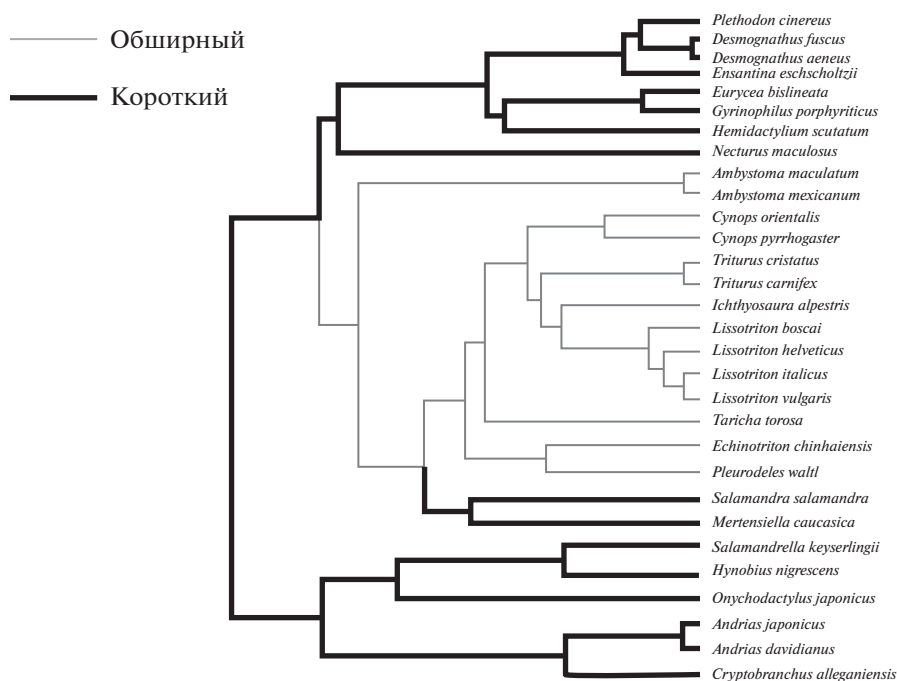


Рис. 2. Особенности дробления зародышей у разных видов Caudata, помещенные на филогенетическое дерево этого отряда (по: Desnitskiy, Litvinchuk, 2015, с упрощениями). Размер периода синхронных делений дробления: обширный (до 10–12 делений) или короткий (до 3–4 делений).

зародышей отряда Caudata (Desnitskiy, Litvinchuk, 2015) были важны 1) наличие или отсутствие обширной серии быстрых синхронных делений дробления (до 10–12 клеточных циклов) в анимальном полушарии раннего зародыша и 2) ориентация борозды третьего деления дробления: широтная, вертикальная или варьирующая. У видов с варьированием борозд третьего дробления они в пределах одной и той же кладки у одних зародышей широтные, а у других вертикальные. Были собраны опубликованные в эмбриологической и герпетологической литературе данные по зародышам 36 видов из шести семейств: Ambystomatidae, Cryptobranchidae, Hynobiidae, Proteidae, Plethodontidae и Salamandridae. Каждый признак был помещен на филогенетическое дерево отряда Caudata, построенное по результатам эволюционных исследований последних лет (San Mauro, 2010; Pyron, Wiens, 2011; Vieites et al., 2011; Zheng et al., 2012; Shen et al., 2013 и др.) (рис. 2 и 3). Кроме того, в нашем анализе были использованы данные по размеру яйца, которые известны для представителей всех десяти семейств отряда хвостатых амфибий, и признак “размер яйца” был тоже помещен на филогенетическое дерево (рис. 4).

Наше исследование показало, что догаструляционное развитие больших, богатых желтком яиц с короткой серией синхронных делений и вертикальными бороздами третьего дробления — это анцестральный набор онтогенетических признаков для отряда Caudata. Напротив, широтные бо-

розды третьего дробления и период 10–12 быстрых синхронных делений, за которым следует среднебластульный переход, являются эволюционно продвинутыми признаками. Филогенетический анализ догаструляционного онтогенеза у зародышей хвостатых амфибий (Desnitskiy, Litvinchuk, 2015) полностью подтвердил идею об эволюционных взаимоотношениях типов дробления, высказанную ранее (Десницкий, 2014).

Анализ размера яйцеклеток показал, что одним из важных анцестральных признаков отряда Caudata является большой размер яйца. Кроме того, для хвостатых амфибий характерен эволюционный переход от крупного размера яйца к маленькому, а затем неоднократные обратные переходы от малого размера яйца к большому размеру в семействе Salamandridae, например у *C. asper* и *S. salamandra* (Desnitskiy, Litvinchuk, 2015). Отметим, что уменьшение размера яйца в семействах Ambystomatidae и Salamandridae было сопряжено с приобретением серии 10–12 быстрых синхронных делений, сопровождаемой среднебластульным переходом (*A. mexicanum*, *L. vulgaris*, *P. waltl* и несколько других видов).

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Согласно молекулярно-филогенетическим данным (San Mauro, 2010), отряды хвостатых и бесхвостых амфибий дивергировали около 290 миллио-

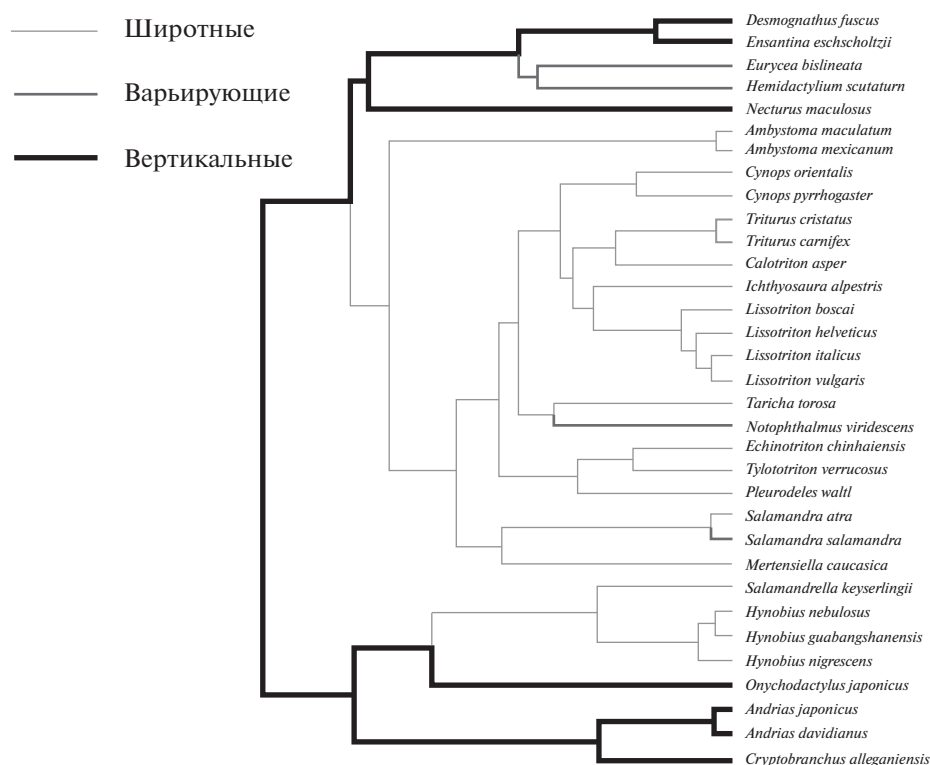


Рис. 3. Особенности дробления зародышей у разных видов Caudata, помещенные на филогенетическое дерево этого отряда (по: Desnitskiy, Litvinchuk, 2015, с упрощениями). Ориентация борозд третьего деления дробления: широтные, варьирующие или вертикальные.

нов лет тому назад (в начале пермского периода). Наши исследования предполагают, что паттерн дробления, характерный для ранних зародышей модельных видов *A. mexicanum* (Caudata) и *X. laevis* (Anura), представляет гомоплазию. Этот паттерн дробления сопряжен с наличием в кладках многочисленных маленьких яиц, а также с протеканием эмбрионального и личиночного развития в стоячих водоемах (где возможности для экзогенного питания личинок гораздо лучше, чем в текущей воде). В связи со сказанным, логичным является предположение, что среднебластульный переход, который следует за периодом синхронных делений яйца у значительного числа модельных и немодельных видов Anura и Caudata, возник конвергентно в двух отрядах класса Amphibia как эмбриональная адаптация к обитанию и развитию в стоячей воде.

Для дальнейшего сравнительного анализа догаструляционного развития представляют определенный интерес некоторые немодельные виды отряда бесхвостых амфибий. Например, крупное и богатое желтком яйцо, вертикальные борозды третьего дробления и отсутствие среднебластульного перехода характерны не только для филогенетически базальной лягушки *A. truei* (Archaeobatrachia), но также и для представителей различных семейств эволюционно продвинутых лягушек

(Neobatrachia) — *E. coqui*, *G. riobambae* и *P. spanglicolus*. Всегда ли в нескольких филогенетических линиях Neobatrachia сохранялся крупный размер яйца или последовательно происходили утрата и повторное приобретение упомянутого признака (и других сопутствующих особенностей)? В настоящее время однозначного ответа на это вопрос нет.

Наконец, у некоторых немодельных видов Anura переход от материнского контроля онтогенеза к зиготическому происходит не на стадии средней бластулы, но на других этапах развития: на стадии раннего дробления у сумчатой лягушки *G. riobambae* и в начале гастрюляции у *E. coqui*, имеющей прямое развитие. В связи с этим возникает ряд вопросов. Когда происходит смена контроля над развитием у других групп лягушек с прямым развитием: из Австралии, Азии, Африки или Океании (поскольку оно у них возникало независимо от прямого развития неотропических Terrarana)? Когда происходит смена контроля над ранним развитием у безлегочных саламандр (Plethodontidae) с прямым развитием и с бифазным жизненным циклом?

Завершая обзор, заметим, что как в случае отряда Anura, так и в случае отряда Caudata, несомненно, существует достаточно гибкая связь между репродуктивной стратегией и особенностями догаструляционного развития. Онтогенетическое разнообра-

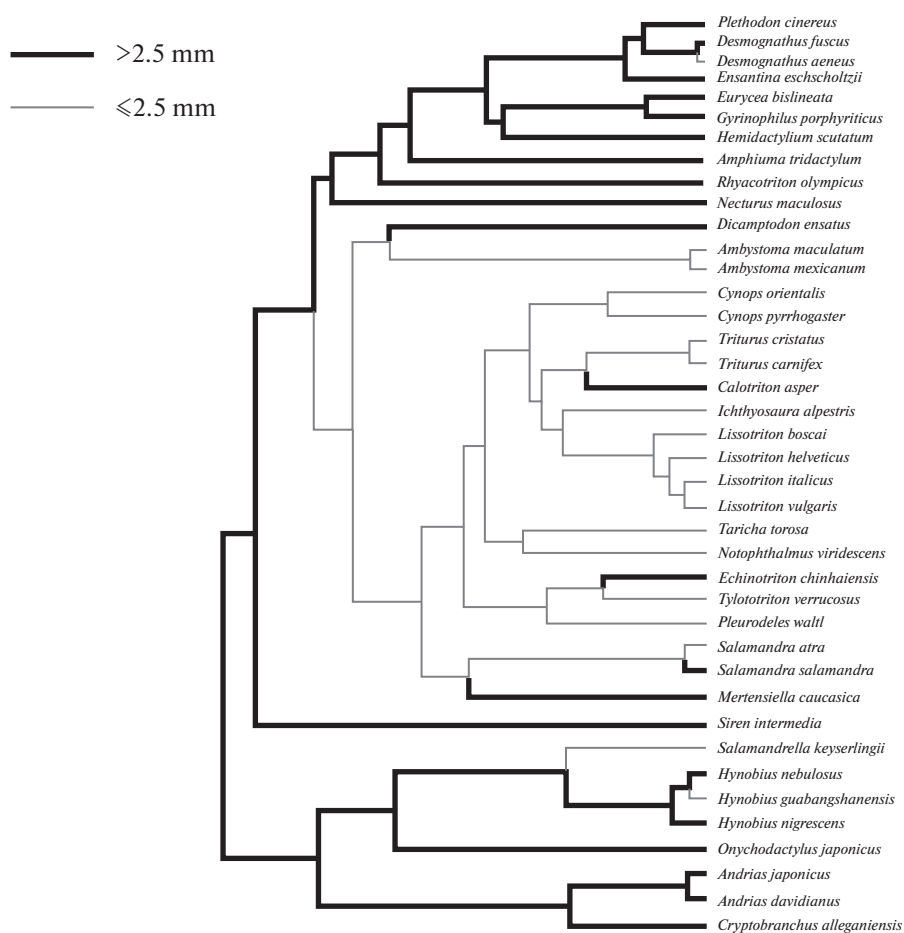


Рис. 4. Размер яйца у разных видов Caudata, помещенный на филогенетическое дерево этого отряда (по: Desnitskiy, Litvinchuk, 2015, с упрощениями).

разие амфибий является отражением их экологического разнообразия, и разные репродуктивные стратегии могут, по-видимому, оказывать весьма сходное (хотя не обязательно идентичное) влияние на паттерн дробления. Для дальнейшей разработки этой концепции (и выяснения причинно-следственных связей между экологическими и онтогенетическими признаками) было бы важно привлечь дополнительную информацию по начальным этапам развития у значительного числа немодельных видов амфибий, которые, однако, пока почти не привлекают внимание эмбриологов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Статья посвящена столетию создания профессором П.П. Ивановым кабинета эмбриологии — предшественника кафедры эмбриологии Санкт-Петербургского государственного университета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При подготовке этой статьи люди и животные не были использованы в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Десницкий А.Г. Разнообразие начальных этапов эмбриогенеза у амфибий. СПб.: Лань, 2019. 112 с.
- Детлаф Т.А. Температурно-временные закономерности развития пойкилотермных животных. М.: Наука, 2001. 211 с.
- Иванова-Казас О.М. Эволюционная эмбриология животных. СПб.: Наука, 1995. 565 с.
- Сытина Л.А., Медведева И.М., Година Л.Б. Развитие сибирского углозуба. М.: Наука, 1987. 88 с.
- AmphibiaWeb. Information on amphibian biology and conservation. Berkeley (California): Electronic database accessible at <http://amphibiaweb.org/>. 2022. Accessed: 12 September 2022.
- Andéol Y. Early transcription in different animal species: implication for transition from maternal to zygotic control in development // Wilhelm Roux's Arch. 1994. V. 204. № 1. P. 3–10.

- Barresi M.J.F., Gilbert S.F. Developmental biology. 12th ed. N.Y., Oxford: Oxford Univ. Press, 2020. 1258 p.
- Brauer A. Beiträge zur Kenntniss der Entwicklung und Anatomie der Gymnophionen. II. Die Entwicklung der äussern Form. Zool. Jahrb. Anat. 1899. Bd. 12. № 3. P. 477–508.
- Briggs R. Further studies on the maternal effect of the *o* gene in the Mexican axolotl // J. Exp. Zool. 1972. V. 181. № 2. P. 271–280.
- Brinkmann H., Venkatesh B., Brenner S. et al. Nuclear protein-coding genes support lungfish and not the coelacanth as the closest living relatives of land vertebrates // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 14. P. 4900–4905.
- Brown H.A. Temperature and development of the tailed frog, *Ascaphus truei* // Comp. Biochem. Physiol. 1975. V. 50. № 2. P. 397–405.
- Brown H.A. Developmental anatomy of the tailed frog (*Ascaphus truei*): a primitive frog with large eggs and slow development // J. Zool. (London). 1989. V. 217. № 4. P. 525–537.
- Buckley D., Alcobendas M., Garcia-Paris M. et al. Heterochrony, cannibalism, and the evolution of viviparity in *Salamandra salamandra* // Evol. Devel. 2007. V. 9. № 1. P. 105–115.
- Callery E.M. There's more than one frog in the pond: a survey of the Amphibia and their contributions to developmental biology // Semin. Cell Devel. Biol. 2006. V. 17. № 1. P. 80–92.
- Callery E.M., Fang H., Elinson R.P. Frogs without polliwogs: evolution of anuran direct development // BioEssays. 2001. V. 23. № 3. P. 233–241.
- Chatterjee S., Elinson R.P. Commitment to nutritional endoderm in *Eleutherodactylus coqui* involves altered nodal signaling and global transcriptional repression // J. Exp. Zool. B. Mol. Devel. Evol. 2014. V. 322. № 1. P. 27–44.
- Collart C., Smith J.C., Zegerman P. Chk1 Inhibition of the replication factor Drf1 guarantees cell-cycle elongation at the *Xenopus laevis* mid-blastula transition // Dev. Cell. 2017. V. 42. № 1. P. 82–96.
- Collazo A., Marks S.B. Development of *Gyrinophilus porphyriticus*: identification of the ancestral developmental pattern in the salamander family Plethodontidae // J. Exp. Zool. 1994. V. 268. № 3. P. 239–258.
- Collazo A., Keller R. Early development of *Ensatina eschscholtzii*: an amphibian with a large, yolky egg // EvoDevo. 2010. V. 1. P. 6. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-1-6>
- de Bavay J.M. The developmental stages of the sphagnum frog, *Kyarranus sphagnicolus* Moore (Anura: Myobatrachidae) // Austral. J. Zool. 1993. V. 41. № 2. P. 151–201.
- de Bussy L.P. Die ersten Entwicklungsstadien des *Megalobatrachus maximus* // Zool. Anz. 1905. Bd. 28. P. 523–536.
- de Lima A.V., Reis A.H., Amado N.G. et al. Developmental aspects of the direct-developing frog *Adelophryne maranguapensis* // Genesis. 2016. V. 54. № 5. P. 257–271.
- del Pino E.M. Modifications of oogenesis and development in marsupial frogs // Development. 1989. V. 107. № 2. P. 169–187.
- del Pino E.M. The extraordinary biology and development of marsupial frogs (Hemiphractidae) in comparison with fish, mammals, birds, amphibians and other animals // Mech. Dev. 2018. V. 154. P. 2–11.
- del Pino E.M. Embryogenesis of marsupial frogs (Hemiphractidae), and the changes that accompany terrestrial development in frogs // Res. Probl. Cell Differ. 2019. V. 68. P. 379–418.
- del Pino E.M. From egg to embryo in marsupial frogs // Curr. Top. Dev. Biol. 2021. V. 145. P. 91–109.
- del Pino E.M., Escobar B. Embryonic stages of *Gastrotheca riobambae* (Fowler) during maternal incubation and comparison of development with that of other egg-brooding hylid frogs // J. Morphol. 1981. V. 167. № 3. P. 277–295.
- del Pino E.M., Looor-Vela S. The pattern of early cleavage of the marsupial frog *Gastrotheca riobambae* // Development. 1990. V. 110. P. 781–789.
- del Pino E.M., Elinson R.P. The organizer in amphibians with large eggs: problems and perspectives // The Vertebrate Organizer / Ed. by H. Grunz. Berlin: Springer, 2003. P. 359–374.
- del Pino E.M., Venegas-Ferrín M., Romero-Carvajal A. et al. A comparative analysis of frog early development // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 29. P. 11882–11888.
- Desnitskiy A.G. Evolutionary reorganizations of ontogenesis in related frog species of the family Myobatrachidae // Russ. J. Dev. Biol. 2010. V. 41. № 3. P. 133–138.
- Desnitskiy A.G. On the diversity of the primary steps of embryonic development in the caudate amphibians // Russ. J. Dev. Biol. 2011. V. 42. № 4. P. 207–211.
- Desnitskiy A.G. On the diversity of the initial steps of embryonic development in anuran amphibians // Russ. J. Herpetol. 2012. V. 19. № 3. P. 221–231.
- Desnitskiy A.G. On the classification of the cleavage patterns in amphibian embryos // Russ. J. Dev. Biol. 2014. V. 45. № 1. P. 1–10.
- Desnitskiy A.G. On the features of embryonic cleavage in diverse fish species // Russ. J. Dev. Biol. 2015. V. 46. № 6. P. 326–332.
- Desnitskiy A.G. Cell cycles during early steps of amphibian embryogenesis: a review // Biosystems. 2018. V. 173. P. 100–103.
- Desnitskiy A.G. Surface contraction waves or cell proliferation waves in the presumptive neurectoderm during amphibian gastrulation: Mexican axolotl versus African clawed frog // Biosystems. 2020. V. 198. P. 104286. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2020.104286>
- Desnitskiy A.G., Litvinchuk S.N. Comparative and phylogenetic perspectives of the cleavage process in tailed amphibians // Zygote. 2015. V. 23. № 5. P. 722–731.
- Dettlaff T.A., Vassetzky S.G. Animal Species for Developmental Studies: Vertebrates. N.Y.: Consultants Bureau, 1991. V. 2. 453 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3654-3>
- Duellman W.E. Reproductive modes in anuran amphibians: phylogenetic significance of adaptive strategies // South Afr. J. Sci. 1985. V. 81. P. 174–178.
- Duellman W.E. Alternative life-history styles in anuran amphibians: evolutionary and ecological implications // Alternative Life-History Styles of Animals / Ed. by

- M.N. Bruton. Dordrecht (Netherlands): Kluwer Acad. Publ., 1989. P. 101–126.
- Duellman W.E., Trueb L. The biology of amphibians, 2nd ed. Baltimore and London: Johns Hopkins Univ. Press, 1994. 671 p.
- Dünker N., Wake M.H., Olson W.M. Embryonic and larval development in the Caecilian *Ichthyophis kohtaoensis* (Amphibia, Gymnophiona). A staging table // J. Morphol. 2000. V. 243. № 1. P. 3–34.
- Elinson R.P. Direct development in frogs: wiping the recapitulationist slate clean // Semin. Devel. Biol. 1990. V. 1. P. 263–270.
- Elinson R.P. Nutritional endoderm: a way to breach the holoblastic-meroblastic barrier in tetrapods // J. Exp. Zool. Part B. 2009. V. 312. № 6. P. 526–532.
- Elinson R.P. Metamorphosis in a frog that does not have a tadpole // Curr. Top. Dev. Biol. 2013. V. 103. P. 259–276.
- Elinson R.P. Development of a non-amphibious amphibian – an interview with a coquí // Int. J. Dev. Biol. 2021. V. 65. № 1–3. P. 171–176.
- Elinson R.P., del Pino E.M. Cleavage and gastrulation in the egg-brooding, marsupial frog, *Gastrotheca riobambae* // J. Embryol. Exp. Morphol. 1985. V. 90. P. 223–232.
- Elinson R.P., del Pino E.M., Townsend D.S. et al. A practical guide to the developmental biology of terrestrial-breeding frogs // Biol. Bull. 1990. V. 179. № 2. P. 163–177.
- Elinson R.P., Sabo M.C., Fisher C. et al. Germ plasm in *Eleutherodactylus coqui*, a direct developing frog with large eggs // Evodevo. 2011. V. 2. P. 20. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-2-20>
- Elinson R.P., del Pino E.M. Developmental diversity of amphibians // Wiley Interdisciplinary Reviews: Devel. Biol. 2012. V. 1. № 3. P. 345–369.
- Exbrayat J.-M. Fertilization and embryonic development // Reproductive Biology and Phylogeny of Gymnophiona (Caecilians) / Ed. by Exbrayat J.-M. Enfield (New Hampshire, USA): Science Publishers, 2006. P. 359–386.
- Eycleshymer A.C. Bilateral symmetry in the egg of *Necturus* // Anat. Anz. 1904. V. 25. P. 230–240.
- Eycleshymer A.C., Wilson J.M. Normal Plates of the Development of *Necturus maculosus*. Jena (Germany): Verlag von Gustav Fischer, 1910. 50 p.
- Gasser F. Observations sur les stades initiaux du développement de l'urodèle Pyrénéen *Euproctus asper* // Bull. Soc. Zool. France. 1964. V. 89. P. 423–428.
- Gitlin D. The development of *Eleutherodactylus portoricensis* // Copeia. 1944. V. 1944. № 2. P. 91–98.
- Gomes A.D., Moreira R.G., Navas C.A. et al. Review of the reproductive biology of caecilians (Amphibia, Gymnophiona) // South Amer. J. Herpetol. 2012. V. 7. № 3. P. 191–202.
- Gomez-Mestre I., Pyron R.A., Wiens J.J. Phylogenetic analyses reveal unexpected patterns in the evolution of reproductive modes in frogs // Evolution. 2012. V. 66. № 12. P. 3687–3700.
- Goodale H.D. The early development of *Spelerpes bilineatus* (Green) // Amer. J. Anat. 1911. V. 12. P. 173–247.
- Grönroos H. Zur Entwicklungsgeschichte des Erdsalamanders (*Salamandra maculosa* Laur.) // Anat. Hefte. 1895. Bd. 6. P. 153–247.
- Haddad C.F.B., Prado C.P.A. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil // BioScience. 2005. V. 55. № 3. P. 207–217.
- Hedges S.B., Duellman W.E., Heinicke M.P. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation // Zootaxa. 2008. № 1737. P. 1–182.
- Heinicke M.P., Duellman W.E., Hedges S.B. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 24. P. 10092–10097.
- Heinicke M.P., Lemmon A.R., Lemmon E.M. et al. Phylogenomic support for evolutionary relationships of New World direct-developing frogs (Anura: Terraranae) // Mol. Phylogenet. Evol. 2018. V. 118. P. 145–155.
- Hilton W.A. Segmentation of the ovum of *Desmognathus fusca* // Amer. Nat. 1904. V. 38. № 451–452. P. 498–500.
- Hirsch N., Zimmerman L.B., Grainger R.M. *Xenopus*, the next generation: *X. tropicalis* genetics and genomics // Devel. Dyn. 2002. V. 225. № 4. P. 422–433.
- Humphrey R.R. Ovulation in the four-toed salamander, *Hemidactylium scutatum*, and the external features of cleavage and gastrulation // Biol. Bull. 1928. V. 54. № 4. P. 307–323.
- Iwasawa H., Kera Y. Normal stages of development of the Japanese lungless salamander, *Onychodactylus japonicus* (Houttuyn) // Japan. J. Herpetol. 1980. V. 8. № 3. P. 73–89.
- Jiang P., Nelson J.D., Leng N. et al. Analysis of embryonic development in the unsequenced axolotl: waves of transcriptomic upheaval and stability // Devel. Biol. 2017. V. 426. № 2. P. 143–154.
- Karadge U., Elinson R.P. Characterization of the nutritional endoderm in the direct developing frog *Eleutherodactylus coqui* // Devel., Genes Evol. 2013. V. 223. № 6. P. 351–362.
- Keller R., Shook D.R. Gastrulation in Amphibians // Gastrulation: From Cells to Embryo / Ed. by Stern C.D. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. P. 171–203.
- Kemp A. The embryological development of the Queensland lungfish, *Neoceratodus forsteri* (Krefft) // Mem. Queensland Mus. 1982. V. 20. P. 553–597.
- Kershaw F., Joss G.H., Joss J.M.P. Early development in Sarcophagid fishes // Development of Non-Teleost Fishes / Ed. by Kunz Y.W., Luer C.A. and Kapoor B.G. Enfield (NH, USA): Science Publishers, 2009. P. 275–289.
- Kunitomo K. Über die Entwicklungsgeschichte des *Hynobius nebulosus* // Anat. Hefte. 1910. Bd. 40. P. 193–283.
- Lefresne J., Andéol Y., Signoret J. Evidence for introduction of a variable G1 phase at the midblastula transition during early development in axolotl // Devel. Growth Differ. 1998. V. 40. № 5. P. 497–508.
- Liang D., Shen X.X., Zhang P. One thousand two hundred ninety nuclear genes from a genome-wide survey support lungfishes as the sister group of tetrapods // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. № 8. P. 1803–1807.

- Liedtke H.C., Wiens J.J., Gomez-Mestre I. The evolution of reproductive modes and life cycles in amphibians // Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 7039. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34474-4>
- Luo J., Xiao Y., Luo K. et al. Embryonic development and organogenesis of Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* // Progr. Nat. Sci. 2007. V. 17. P. 1303–1311.
- Lutz B. Trends towards non-aquatic and direct development in frogs // Copeia. 1947. V. 1947. № 4. P. 242–252.
- Lynn W.G. The embryology of *Eleutherodactylus nubicola*, an anuran which has no tadpole stage // Contributions to Embryology (Publ. Carnegie Inst. Washington). 1942. V. 190. P. 27–62.
- Marks S.B., Collazo A. Direct development in *Desmognathus aeneus* (Caudata: Plethodontidae): a staging table // Copeia. 1998. V. 1998. № 3. P. 637–648.
- Morgan T.H. The Development of the Frog's Egg: An Introduction to Experimental Embryology. N.Y.: MacMillan Co., 1897. 192 p.
- Moya I.M., Alarcón I., del Pino E.M. Gastrulation of *Gastrotheca riobambae* in comparison with other frogs // Devel. Biol. 2007. V. 304. № 2. P. 467–478.
- Nelsen O.E. Comparative Embryology of the Vertebrates. N.Y., Toronto, London: McGraw-Hill Book Co., 1953. 982 p.
- Newport J., Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: 1. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage // Cell. 1982. V. 30. № 3. P. 675–686.
- Nieuwkoop P.D. The organization center of the amphibian embryo: its origin, spatial organization, and morphogenetic action // Adv. Morphogen. 1973. V. 10. P. 1–39.
- Nieuwkoop P.D. What are the key advantages and disadvantages of urodele species compared to anurans as a model system for experimental analysis of early development? // Int. J. Devel. Biol. 1996. V. 40. № 4. P. 617–619.
- Nieuwkoop P.D., Faber J. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin): Systematic and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis. N.Y., London: Garland Publ. Inc., 1994. 282 p.
- Noble G.K. The value of life history data in the study of the evolution of the amphibia // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1927. V. 30. № 1. P. 31–128.
- Nunes-de-Almeida C.H.L., Haddad C.F.B., Toledo L.F. A revised classification of the amphibian reproductive modes // Salamandra. 2021. V. 57. № 3. P. 413–427.
- Padial J.M., Grant T., Frost D.R. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria // Zootaxa. 2014. V. 3825. № 1. P. 1–132.
- Pereira E.B., Pinto-Ledezma J.N., De Freitas C.G. et al. Evolution of the anuran foam nest: trait conservatism and lineage diversification // Biol. J. Linn. Soc. 2017. V. 122. № 4. P. 814–823.
- Pérez O.D., Lai N.B., Buckley D. et al. The morphology of prehatching embryos of *Caecilia orientalis* (Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae) // J. Morphol. 2009. V. 270. № 12. P. 1492–1502.
- Pyron R.A., Wiens J.J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians // Mol. Phylogenet. Evol. 2011. V. 61. № 2. P. 543–583.
- Rugh R. The Frog; Its Reproduction and Development. Philadelphia: Blakiston Comp., 1951. 336 p.
- Rugh R. Experimental embryology. Techniques and Procedures. 3rd ed. Minneapolis (Minnesota): Burgess Publ. Com., 1962. 501 p.
- Sammouri R., Renous S., Exbrayat J.M. et al. Développement embryonnaire de *Typhlonectes compressicaudus* (Amphibia, Gymnophiona) // Ann. Sci. Nat. Zool. Paris. 1990. V. 11. № 3. P. 135–163.
- Sampson L.V. Unusual modes of breeding and development among Anura // Amer. Nat. 1900. V. 34. № 405. P. 687–715.
- Sampson L.V. A contribution to the embryology of *Hylodes martinicensis* // Amer. J. Anat. 1904. V. 3. № 4. P. 473–504.
- San Mauro D. A multilocus timescale for the origin of extant amphibians // Mol. Phylogenet. Evol. 2010. V. 56. № 2. P. 554–561.
- Sarasin P., Sarasin F. Ergebnisse naturwissenschaftlicher Forschungen auf Ceylon in den Jahren 1884–1886. Band 2. Heft 1. Zur Entwicklungsgeschichte und Anatomie der ceylonesischen Blindwühle *Ichthyophis glutinosus*. Teil 1: Einleitung, das Ei, Befruchtung und Brutpflege, Entwicklung der Körperform, Historisches, Systematisches und Vergleichendes. Wiesbaden: C.W. Kreidel's Verlag, 1887. P. 1–40 + Tafeln 1–5.
- Scherz M.D., Vences M., Rakotoarison A. et al. Reconciling molecular phylogeny, morphological divergence and classification of Madagascan narrow-mouthed frogs (Amphibia: Microhylidae) // Mol. Phylogenet. Evol. 2016. V. 100. P. 372–381.
- Schmid M., Steinlein C., Bogart J.P. et al. The hemiphractid frogs: phylogeny, embryology, life history, and cytogenetics (review) // Cytogenet. Genome Res. 2012. V. 138. № 2–4. P. 69–367.
- Shen X.X., Liang D., Feng Y.J. et al. A versatile and highly efficient toolkit including 102 nuclear markers for vertebrate phylogenomics, tested by resolving the higher level relationships of the Caudata // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. № 10. P. 2235–2248.
- Signoret J. Evidence of the first genetic activity required in axolotl development // Res. Probl. Cell Differ. 1980. V. 11. P. 71–74.
- Signoret J., Lefresne J. Contribution à l'étude de la segmentation de l'oeuf d'axolotl: 1. Définition de la transition blastulienne // Ann. Embryol. Morphogen. 1971. V. 4. № 2. P. 113–123.
- Signoret J., Collenot A. L'organisme en développement. Des gamètes à l'embryon. Paris: Hermann, 1991. 278 p.
- Smith B.G. Preliminary report on the embryology of *Cryptobranchus allegheniensis* // Biol. Bull. 1906. V. 11. № 3. P. 146–164.
- Smith B.G. The origin of bilateral symmetry in the embryo of *Cryptobranchus allegheniensis* // J. Morphol. 1922. V. 36. № 3. P. 357–399.
- Smith B.G. The embryology of *Cryptobranchus allegheniensis*. 3. Formation of the blastula // J. Morphol. Physiol. 1926. V. 42. № 1. P. 197–252.

- Spemann H.* Embryonic Development and Induction. New Haven: Yale Univ. Press, 1938. 401 p.
- Streicher J.W., Miller E.C., Guerrero P.C. et al.* Evaluating methods for phylogenomic analyses, and a new phylogeny for a major frog clade (Hylidae) based on 2214 loci // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2018. V. 119. P. 128–143.
- Svensson G.S.O.* Zur Kenntnis der Furchung bei den Gymnophionen // *Acta Zool. (Stockholm)*. 1938. Bd. 19. № 1–2. P. 191–207.
- Tarkhnishvili D.N., Serbinova I.A.* Normal development of the Caucasian salamander (*Mertensiella caucasica*) // *Adv. Amphib. Res. Former Soviet Union*. 1997. V. 2. P. 13–30.
- Toivonen S., Tarin D., Saxén L. et al.* Transfilter studies on neural induction in the newt // *Differentiation*. 1975. V. 4. № 1. P. 1–7.
- Vastenhouw N.L., Cao W.X., Lipshitz H.D.* The maternal-to-zygotic transition revisited // *Development*. 2019. V. 146: dev161471. <https://doi.org/10.1242/dev.161471>
- Vieites D., Román S.N., Wake M.H. et al.* A multigenic perspective on phylogenetic relationships in the largest family of salamanders, the Plethodontidae // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2011. V. 59. P. 623–635.
- Wake D.B., Hanken J.* Direct development in the lungless salamanders: what are the consequences for developmental biology, evolution and phylogenesis? // *Int. J. Devel. Biol.* 1996. V. 40. № 4. P. 859–869.
- Wake M.H.* Fetal adaptations for viviparity in amphibians // *J. Morphol.* 2015. V. 276. № 8. P. 941–960.
- Zhang M., Skirkanich J., Lampson M.A. et al.* Cell cycle re-modeling and zygotic gene activation at the midblastula transition // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. V. 953. P. 441–487.
- Zheng Y., Peng R., Murphy R.W. et al.* Matrilineal genealogy of *Hynobius* (Caudata: Hynobiidae) and a temporal perspective on varying levels of diversity among lineages of salamanders on the Japanese Islands // *Asian Herpetol. Res.* 2012. V. 3. № 4. P. 288–302.

Pregastrular Development of Amphibians: Ontogenetic Diversity and Eco-Devo

A. G. Desnitskiy*, **

Department of Embryology, Saint-Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, Saint-Petersburg, 190034 Russia

*e-mail: adesnitskiy@mail.ru

**e-mail: a.desnitsky@spbu.ru

Comparative and ecological aspects of the reorganizations of early development in the class Amphibia are analyzed. We used data on the developmental diversity in a number of families belonging to the orders Anura and Caudata, in which many species had lost their connection with the aquatic environment. Model representatives of the class Amphibia (*Ambystoma mexicanum*, *Rana temporaria*, and *Xenopus laevis*) have small eggs (no more than 2.5 mm in diameter). In these species, the slowdown in the rate of cell divisions and the loss of synchrony occur at the midblastula stage. However, phylogenetically basal amphibian species (*Ascaplus truei*, *Cryptobranchus alleganiensis*) are characterized by the large (4–6 mm in diameter) yolky eggs and a short series of synchronous blastomere divisions (the synchrony is already lost at the 8-cell stage of cleavage). They do not have a “midblastula transition”, which is characteristic of the above model species. On the other hand, many evolutionarily advanced non-model species of caudate and anuran amphibians (for example, *Desmognathus fuscus*, *Gastrotheca riobambae*, *Phyllorhina sphagnicola*), as well as the basal species, are characterized by the large, yolk-rich eggs and the early loss of cell division synchrony. Phylogenetic analysis suggests that the cleavage pattern of the most extensively studied amphibians, the Mexican axolotl (Caudata) and the African clawed frog (Anura), represents a homoplasy. The midblastula transition, which is characteristic of these two species, might have evolved convergently in these two orders of amphibians as an embryonic adaptation to development in lentic water.

Keywords: amphibians, cleavage division pattern, egg size, evolution of development, midblastula transition, reproductive strategies

**ГЕНЕРАЛИЗОВАННАЯ ФОРМА УСАЧЕЙ КОМПЛЕКСА
BARBUS (= *LABEOBARBUS*) *INTERMEDIUS* В ОЗЕРЕ ТАНА:
ВЕКТОРЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ
НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА**

© 2023 г. А. Н. Мироновский*

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

*e-mail: adissa@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 05.02.2023 г.

Принята к публикации 27.02.2023 г.

Рыбы комплекса *Barbus* (= *Labeobarbus*) *intermedius* (Actinopterygii, Cyprinidae), в русскоязычной литературе известные как крупные африканские усачи, широко распространены в водоемах Африки. Характерной особенностью морфологического разнообразия этой группы рыб является симпатрическое сосуществование морфо-экологических форм в локальных популяциях. Наиболее известный пример такого сосуществования имеет место в расположенном на севере Эфиопии оз. Тана, где по оценкам разных авторов обитает до 15 морфо-экологических форм (морфотипов). Отличительные признаки усачей танских морфотипов отчетливо проявляются по достижению стандартной длины (*SL*) примерно 15 см. При меньшей длине представители большинства морфотипов между собой неразличимы. Это дает основания предположить, что в онтогенезе главные векторы морфологической изменчивости танских усачей могут быть разными до и после достижения особями длины 15 см. Целью настоящего исследования стала проверка этого предположения. Полученные результаты подтверждают, что в данной популяции стандартная длина (*SL*), равная примерно 15 см, разграничивает две стадии постнатального онтогенеза у исследуемой группы рыб. У особей *SL* < 15 см основной вектор изменчивости — это следствие изменения морфологических пропорций по мере роста особи. У особей *SL* > 15 см основной вектор изменчивости, по всей вероятности, связан с разделением пищевых ресурсов. Оригинальный подход, использованный в исследовании, полагается перспективным в анализе особенностей изменчивости на разных стадиях онтогенеза не только изучаемой, но и других систематических групп.

Ключевые слова: генерализованная форма, *Barbus* (= *Labeobarbus*) *intermedius* комплекс, симпатрическое формообразование, постнатальный онтогенез, векторы изменчивости

DOI: 10.31857/S0475145023020040, **EDN:** XFAOLX

ВВЕДЕНИЕ

Ихтиофауна оз. Тана, расположенного в северной части Эфиопии, примечательна, прежде всего, обилием морфо-экологических форм (или морфотипов) крупных африканских усачей комплекса *Barbus* (= *Labeobarbus*) *intermedius* (sensu Banister, 1973). Считается, что комплекс “танских” морфотипов — это результат адаптивной радиации в процессе разделения пищевых ресурсов (Sibbing et al., 1998; Sibbing, Nagelkerke, 2001; Nagelkerke, Rossberg, 2014). В пользу этого предположения свидетельствуют данные о дифференциации танских усачей по признаками, отражающим строение челюстного аппарата (Мироновский, 2017, 2021a, 2021б).

Наряду с усачами специализированных морфотипов в оз. Тана обитают особи без выраженных признаков какой-либо пищевой специализации (Mina, 2001). Такие особи именуются генерализованными и, если большинство морфотипов — это эндемики озера, то усачи генерализованной формы широко распространены в реках и озерах Африки. Они слагают мономорфные популяции крупных африканских усачей, а в полиморфных популяциях доминируют по численности. Предполагается, что генерализованная форма является предковой, в процессе диверсификации давшей начало многообразию комплекса *B. intermedius* в ареале (Nagelkerke et al., 1994; Mina, 2001; Голубцов, 2010; Shkil et al., 2015; Levin et al., 2019, 2020). В пользу такого предположения свидетельствуют результаты исследования изменчивости генерализованной формы комплекса *B. intermedius* в сравнении с изменчивостью симпатрических морфотипов и аллопатрических видов крупных африканских усачей (Мироновский, 2020, 2021б).

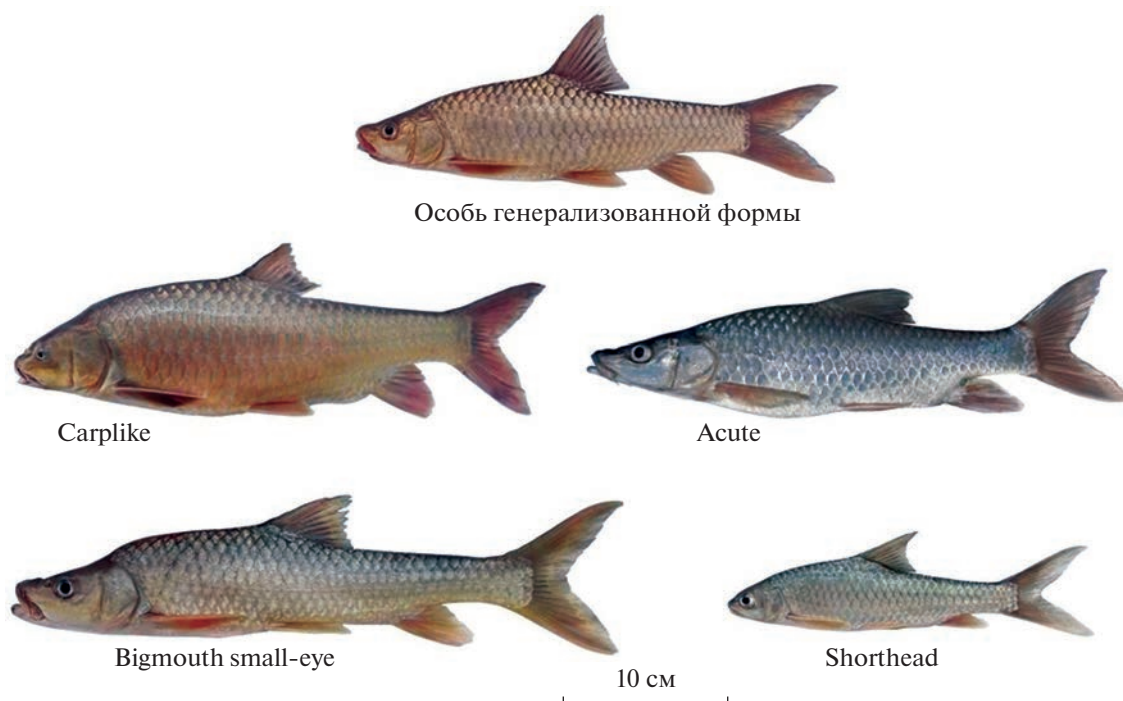


Рис. 1. Особи генерализованной и некоторых специализированных форм (морфотипов) крупных африканских усачей из оз. Тана. Названия морфотипов приведены, согласно классификации Нагелькерке с соавт. (Nagelkerke et al., 1994, 1995). Фотографии публикуются с любезного разрешения Ф.Н. Шкиля и Е.В. Есина (ИБР РАН и ИПЭЭ РАН).

Хотя различия между некоторыми формами усачей оз. Тана весьма велики и, как отмечают Нагелькерке с соавторами (Nagelkerke et al., 1994), сопоставимы с различиями видов и даже родов *Cyprinidae* Евразии (рис. 1), принадлежность особи к тому или иному морфотипу может быть определена лишь по достижению некоторой длины. Согласно М.В. Мине с соавторами (Mina et al., 1996; Мина и др., 2011), для большинства морфотипов такая длина лежит в диапазоне $SL = 20\text{--}25$ см; при меньших размерах идентифицируются лишь два морфотипа: *acute* и *bigmouth big-eye*. Нагелькерке с соавторами (Nagelkerke et al., 1995) утверждали, что 11 из 14 морфотипов различимы при SL менее 10 см. Вместе с тем, позже, предложив идентификационный ключ для определения танских морфотипов, Нагелькерке и Сиббинг (Nagelkerke, Sibbing, 2000) настоятельно рекомендуют использовать его только для особей стандартной длиной больше 15 см. Так или иначе, несмотря на расхождение мнений о надежной длине идентификации, нет сомнений в том, что характерные признаки танских морфотипов проявляются по мере увеличения общих размеров рыб. Это дает основания предположить, что недавно выявленные главные векторы изменчивости усачей генерализованной формы (Мироновский, 2020, 2021б) могут быть не одинаковыми в разных размерных группах.

Сказанное определило цель настоящего исследования: сравнение главных векторов изменчивости в разных размерных группах усачей генерализованной формы в оз. Тана, в качестве рабочей гипотезы рассматривая рубеж $SL = 15$ см, предложенный Нагелькерке и Сиббингом (2000).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал собран в оз. Тана в 1992–2010 гг. Рыб отлавливали накидными и жаберными (ячей 0.5–8.0 см) сетями, брали из уловов местных рыбаков. Всего рассматриваются 172 особи генерализованной формы стандартной длиной от 10 до 35 см. В расчетах рыб делили на размерные группы “мелких” SL 10–15 см (30 особей) и “крупных” 15–35 см (142 особи). Отметим, что генерализованная форма (далее — GF¹) комплекса *B. intermedius sensu* Banister (1973) в оз. Тана описана как морфотип *intermedius*² (Nagelkerke et al., 1994; Мина и др.,

¹ GF — аббревиатура от англ. “generalized form” — генерализованная форма.

² Латинское “intermedius”, как и определение “генерализованная”, указывает на обобщенность облика особей GF — промежуточного, или усредненного между другими танскими морфотипами. В качестве одного из диагностических признаков морфотипа *intermedius* Нагелькерке с соавторами (Nagelkerke et al., 1994. Р. 3) указывают: “No extreme characters”, т.е., отсутствие экстремальных признаков, под “экстремальными” понимая диагностические признаки специализированных морфотипов озера.

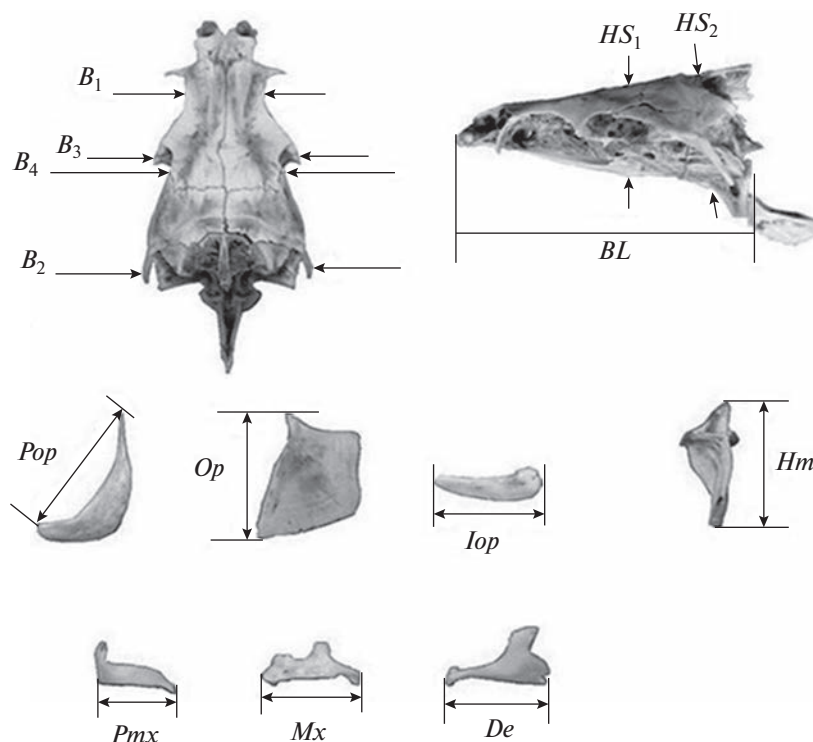


Рис. 2. Схема промеров черепа усачей комплекса *B. intermedius*. Параметры осевого черепа: *BL* — базальная длина черепа; *B₁*, *B₂*, *B₃* — расстояние между внешними краями соответственно frontalia, pterotica и sphenotica; *B₄* — ширина черепа на уровне соединения frontale и pteroticum, *HS₁* и *HS₂* — высота черепа на уровне соответственно изгиба parasphenoidium и заднего края parasphenoidium. Параметры висцерального черепа: *Hm* — высота hyomandibulare, *Pop* — длина praеoperculum, *Op* — высота передней части operculum, *Iop* — длина interoperculum, *Pmx*, *Mx* и *De* — длина praemaxillare, maxillare и dentale соответственно.

2016). Принадлежность исследуемых особей к данному морфотипу определяли по диагнозу в работе Нагелькерке с соавторами (Nagelkerke et al., 1994).

В полевых условиях головы рыб фиксировали поваренной солью для камеральной обработки. После препарирования и изготовления сухих остеологических препаратов измеряли 14 параметров, характеризующих пропорции осевого и висцерального черепа (рис. 2). Исследования показывают, что, обладая высокой разрешающей способностью и хорошей воспроизводимостью результатов измерений как одним, так и несколькими операторами, данный набор признаков позволяет уверенно оценивать фенетические отношения разных форм усачей, равно как и рыб других систематических групп Cyprinidae (Mina et al., 1993, 1996, 1998; Мироновский, 2006; Дгебуадзе и др., 2020; Кожара и др., 2020).

Статистическая обработка данных выполнена средствами пакетов NTSYS 2.02k и Statistica 6. В расчетах использованы индексы, представляющие собой отношения абсолютных значений промеров к базальной длине черепа (*BL*). Далее, упоминая тот или иной признак, мы будем иметь в виду его индекс, а не сам промер. Значения ин-

дексов преобразовывали в натуральные логарифмы для нормализации распределений. В анализе главных компонент (АГК) собственные векторы считали по корреляционной матрице; длину вектора принимали равной 1. В отличие от работ, где АГК используют для уменьшения числа переменных с последующим анализом распределения точек-объектов в двух- или трехмерном пространстве первых ГК, настоящее исследование основано на анализе собственных векторов (СВ) корреляционных матриц, которые характеризуют главные направления дисперсии объектов анализируемых множеств (Андреев, 1980; Дгебуадзе и др., 2008; Мироновский, 2020, 2021б; Мина, Мироновский, 2022). Главные направления дисперсии рассматриваются как главные направления изменчивости (диверсификации, дивергенции) усачей изучаемых совокупностей. О сходстве собственных векторов судили, анализируя графики распределения факторных нагрузок рассматриваемых параметров, а также вычисляя коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (r_s) и линейной корреляции Пирсона (r_n); статистическую значимость корреляций оценивали средствами пакета Statistica 6. Дендрограммы, отражающие корреляции между признаками, строились методом полной связи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении векторов изменчивости особей изучаемых совокупностей на осях системы прямоугольных координат откладывались факторные нагрузки рассматриваемых переменных на соответствующие СВ (рис. 3). В гипотетическом случае, когда направления изменчивости в паре сопоставляемых совокупностей полностью совпадают, точки, соответствующие нагрузкам, ложатся на прямую, расположенную под углом 45° к осям координат, корреляция между значениями нагрузок будет равна 1. Точки на таких графиках тем дальше расположены от начала координат, чем большую относительную нагрузку в данном направлении изменчивости несет данный признак. У начала координат оказываются точки, соответствующие переменным с наименьшими нагрузками.

На рис. 3а приведен график распределения факторных нагрузок на первые собственные векторы дисперсии “мелких” ($SL = 10-15$ см) и “крупных” ($SL = 15-35$ см) особей GF оз. Тана. Как видим, у “крупных” особей распределение характеризуется оппозицией (противостоянием) нагрузок параметров осевого черепа и челюстной дуги. Нагрузки первых на СВ1 имеют знак “+”, нагрузки вторых “-”. К параметрам осевого черепа примыкает признак гиоидной дуги *Hm*, к параметрам челюстной дуги – один из параметров жаберной крышки *Iop*. По абсолютным значениям (без учета знака) факторные нагрузки черепных и челюстных признаков примерно равны, из чего следует, что примерно равны их вклады в данный вектор изменчивости. У “мелких” особей распределение иное, здесь оппозиции знаков нет, нагрузки всех параметров на СВ1 положительны. При этом, если у “крупных” особей нагрузки параметров жаберной крышки *Op* и *Por* близки к 0, то у мелких они на уровне нагрузок остальных признаков. Полное отсутствие сходства в распределении факторных нагрузок в сопоставляемых векторах отражают стремящиеся к 0 значения корреляций. Таким образом, сделанное во введении предположение, что изменчивость “мелких” и “крупных” особей может идти по-разному, соответствует действительности: основной вектор изменчивости усачей длиной меньше 15 см ($SL < 15$) и основной вектор изменчивости усачей длиной больше 15 см ($SL > 15$) – это, несомненно, разные векторы.

Проверим, меняются ли главные векторы дисперсии особей $SL > 15$ см по мере их дальнейшего роста, или после $SL \sim 15$ см они (главные векторы дисперсии) неизменны? Для этого сравним СВ1 особей $SL = 15-20$ см и СВ1 особей $SL = 20-35$ см (рис. 3б). Сходство распределения факторных нагрузок по обеим осям (X и Y), в сочетании с высокими статистически значимыми корреляциями

не оставляет сомнений в том, что между собой сравниваются не разные векторы, но разные реализации одного и того же вектора. Таким образом, по достижении длины 15 см главный вектор дисперсии остается неизменным. Некоторая разница между сравниваемыми СВ1 заключается в доле общей дисперсии, отражаемой каждым из них. У особей $SL = 15-20$ см она равна 28%, у особей $SL = 20-35$ см увеличивается до 32%. Из этого следует, что по мере роста рыб роль данного вектора в их изменчивости увеличивается.

Сравнение собственных векторов разного ранга: СВ2 особей $SL = 10-15$ см и СВ1 особей $SL = 15-35$ (рис. 3в) показывает, что и в этом случае имеет место противостояние знаков факторных нагрузок параметров нейрокраниума (знак “+”) и челюстной дуги (знак “-”) в сочетании с высокими достоверными корреляциями между сравниваемыми параметрами. Это дает основания утверждать, что и здесь между собой сопоставляются разные реализации одного вектора. У “крупных” особей этот вектор определяет основную долю изменчивости (СВ1), тогда как у “мелких” особей его роль второстепенна (СВ2).

Ключ к пониманию природы изменчивости, объясняемой СВ1 “мелких” особей и СВ1 “крупных” особей GF оз. Тана, как представляется, дает сравнительный анализ дендрограмм, отражающих корреляционные связи между признаками усачей каждой из этих размерных групп (рис. 4). Структура корреляционных связей признаков особей $SL > 15$ см (рис. 4а) показывает, что анализируемые параметры образуют два основных кластера, состав которых полностью соответствует отмеченному выше (рис. 3б) разделению признаков с положительными (+) и отрицательными (–) нагрузками на СВ1 этой размерной группы. На дендрограмме (рис. 4а) в одном кластере объединились $B_1, B_2, B_3, B_4, HS_1, HS_2, Hm, Por$ и Op . Второй кластер дендрограммы образуют три параметра челюстной дуги Pmx, Mx, De и параметр *Iop*, отражающий длину межкрышечной кости. В черепе усачей эта кость протянулась за зубной, что, видимо, определяет тесную корреляцию между *De* и *Iop*, равно как и близость *Iop* к группе трех параметров челюстной дуги по оси Y на рис. 3а, 3б, 3в. Высокая статистически значимая отрицательная корреляция между кластерами свидетельствует о том, что увеличение параметров, вошедших в один кластер, сопровождается уменьшением параметров другого кластера. В рассматриваемом случае, это означает: чем длиннее челюсти (и больше рот), тем ниже и уже осевой череп и голова в целом, что хорошо соответствует разнице облика особей GF и большеротых усачей специализированных морфотипов озера (Mina et al., 2001). Ранее было обосновано предположение, что такая топография дендрограммы отражает корреляции между признаками при изменчиво-

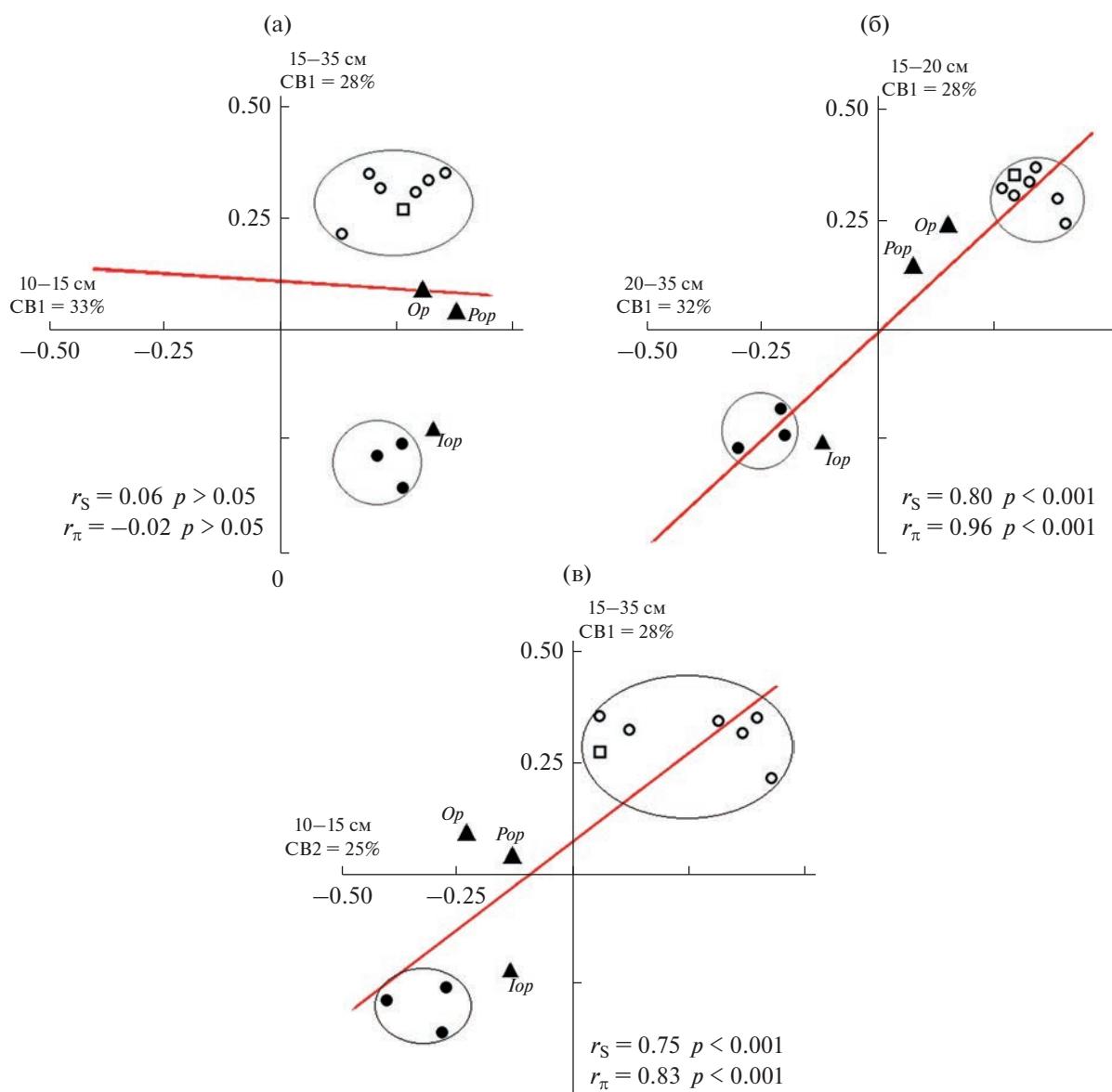


Рис. 3. Сопоставление собственных векторов (CB) корреляционных матриц между признаками особей разных размерных групп генерализованной формы (GF) комплекса *B. intermedius*. (а) — ось X: CB1 особей $SL = 10–15$ см, ось Y: CB1 особей $SL = 15–35$ см; (б) — ось X: CB1 особей $SL = 20–35$ см, ось Y: CB1 особей $SL = 15–20$ см; (в) — ось X: CB2 особей $SL = 10–15$ см, ось Y: CB1 особей $SL = 15–35$ см. Символами обозначены нагрузки: ● — параметров челюстной дуги *Pmx*, *Mx*, *De*; ▲ — параметров жаберной крышки *Pop*, *Op* и *Iop*; ○ — параметров осевого черепа B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , HS_1 , HS_2 ; □ — параметра гиоидной дуги *Hm*.

сти, направленной на разделение пищевых ресурсов (Мироновский, 2017, 2020, 2021). Следует обратить внимание на то, что признаки “крупных” особей формируют кластеры вне зависимости от своей принадлежности к тому или иному отделу черепа (рис. 4а). Параметры осевого черепа (B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , HS_1 , HS_2) и висцерального черепа (*Pmx*, *Mx*, *De*, *Iop*, *Pop*, *Op* и *Hm*) в разные кластеры не обособляются. Параметр жаберной крышки *Iop* находится в кластере челюстной дуги, тогда как два другие параметра жаберной крышки

(*Pop* и *Op*) — в одном кластере с параметрами осевого черепа. Туда же попадает параметр гиоидной дуги *Hm*. Параметр осевого черепа B_2 объединяется в кластер с *Pop*, *Op* и *Hm*. Все это свидетельствует о том, что у особей $SL > 15$ см корреляции между изменением структур одного и того же отдела черепа часто оказываются меньше корреляций между изменением структур разных отделов черепа.

В группе особей $SL < 15$ см структура корреляций иная (рис. 4б). На первом уровне ветвления

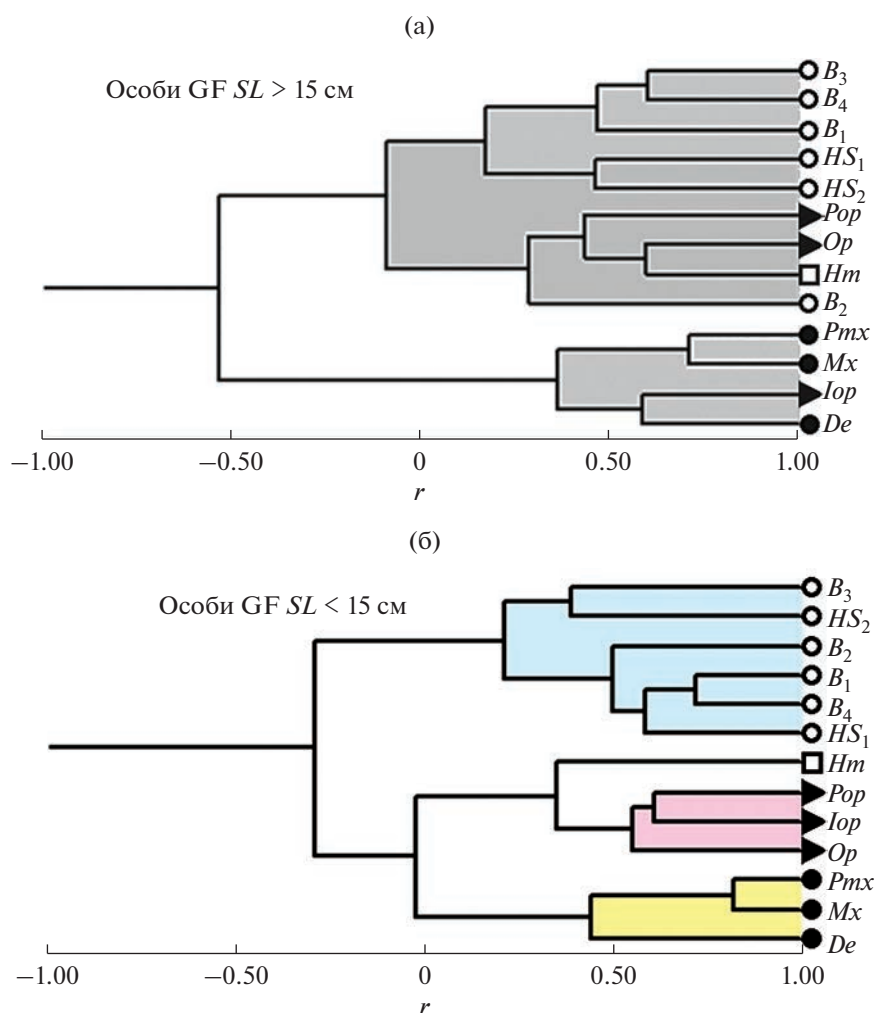


Рис. 4. Дендрограммы корреляций между рассматриваемыми признаками изучаемых совокупностей генерализованных особей комплекса *B. intermedius*. (а) корреляции между признаками особей $SL > 15$ см; (б) корреляции между признаками особей $SL < 15$ см. Параметры осевого черепа: B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , HS_1 , HS_2 (○); параметры висцерального черепа: челюстная дуга — Pmx , Mx , De (●); жаберная крышка — Pop , Op , Iop (►); гиоидная дуга — Hm (□).

дендрограммы параметры осевого черепа и параметры висцерального черепа расходятся в разные кластеры. Далее в разные кластеры расходятся параметры челюстной дуги (Pmx , Mx и De) и параметры жаберной крышки (Iop , Pop , Op). Параметр гиоидной дуги Hm присоединяется к параметрам жаберной крышки после того, как последние объединились между собой. Таким образом, в группе $SL < 15$ см признаки, характеризующие структуры одного и того же отдела черепа, сходятся в один целостный кластер, т.е. у особей $SL < 15$ см корреляции между изменением структур **одного** и того же отдела черепа теснее корреляций между изменением структур **разных** отделов черепа. Это свидетельствует о том, что в группе $SL < 15$ см корреляции определяет соразмерное развитие структур данного отдела черепа по мере роста особи. То есть, главный фактор изменчивости в

этой группе — это сопряженность изменения пропорций черепа в процессе онтогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты дают основания утверждать, что стандартная длина 15 см действительно является границей между стадиями постнатального онтогенеза, характеризующимися разными векторами изменчивости. Важно подчеркнуть, что вектор, определяемый оппозицией нагрузок параметров челюстной дуги и осевого черепа, присутствует и в изменчивости особей $SL < 15$ см (рис. 3в). И если предположение о связи этого вектора с процессами разделения пищевых ресурсов справедливо, таковые процессы имеют место и у мелких особей. Но здесь эти процессы в изменчивости не основные, они — второстепенные,

о чем свидетельствует второй по значению ранг данного вектора — СВ2. Усиление роли данного вектора до ранга СВ1 по достижении *SL* 15 см, видимо, объясняется тем, что при такой длине особи становятся способными поедать себе подобных, резко интенсифицируя хищничество. Следует также отметить, что, наряду с разграничением этапов онтогенеза и анализом особенностей развития на каждом из них, подход, основанный на сравнении собственных векторов (СВ), с успехом используется и для изучения эволюционных аспектов изменчивости. Так, сопоставление соответствующих векторов дисперсии (СВ1) показало, что диверсификация генерализованных особей в оз. Тана, диверсификация особей 14 танских морфотипов и особей 4 аллопатрических видов усачей рек и озер Эфиопии — это последовательные этапы одного процесса, и дивергенция симпатрических морфотипов, а затем — аллопатрических видов идет в направлении, заданном диверсификацией особей генерализованной формы (Мироновский, 2020). Чуть позже анализ структуры корреляционных связей собственных векторов генерализованной и ряда рыбоядных форм позволил получить данные в пользу гипотезы, согласно которой фенетическая иерархия морфотипов крупных африканских усачей в оз. Тана возникла в процессе независимых ответвлений онтогенетических каналов специализированных форм от канала морфотипа *intermedius*, то есть, генерализованной формы (Мина, Мироновский, 2022). Кроме того, предварительные расчеты дают основание полагать, что механизмы формирования рыбоядных и нерыбоядных представителей танского комплекса форм могут различаться между собой, что, очевидно, определяет одно из важных направлений дальнейших исследований с использованием описанного подхода.

ВЫВОДЫ

1. В оз. Тана у особей генерализованной формы комплекса *Barbus intermedius* на разных стадиях онтогенеза доминируют разные векторы изменчивости.

2. У особей *SL* < 15 см основной вектор изменчивости определяет сопряженное изменение морфологических пропорций по мере линейного роста.

3. У особей *SL* > 15 см основной вектор изменчивости, по всей вероятности, связан с разделением пищевых ресурсов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор искренне благодарен участникам экспедиции, принимавшим участие в сборе материала: А.С. Голубцову и А.А. Даркову (ИПЭЭ РАН), равно как и Ф.Н. Шкилю (ИБР РАН), А.С. Комаровой, А.В. Кожаре и Е.Е. Слынько (ИБВВ РАН), нашедшим время ознако-

миться с исходным вариантом рукописи и сделать ценные замечания. Особая благодарность М.В. Мине (ИБР РАН) и Ю.Ю. Дгебуадзе (ИПЭЭ РАН), чья последовательная, принципиальная критика позволила автору избежать ряда не вполне обоснованных суждений. Автор также глубоко признателен Ф.Н. Шкилю и Е.В. Есину (ИБР РАН и ИПЭЭ РАН), предоставившим для публикации фотографии морфотипов танских усачей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках государственных заданий ИПЭЭ РАН (№ 0109-2018-0076 AAAA-A18-118042490059-5 и № FFER-2021-0006) и ИБВВ РАН (№ 121051100104-6). Материал собран на средства Долгосрочного международного проекта РАН “Совместная российско-эфиопская биологическая экспедиция”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В отношении объектов исследования соблюдались применимые этические нормы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреев В.Л. Классификационные построения в экологии и систематике. М.: Наука, 1980. 141 с.
- Голубцов А.С. “Пучки видов” рыб в реках и озерах: симпатрическая дивергенция в фаунистически обедненных рыбных сообществах как особый модус эволюции // Актуальные проблемы современной ихтиологии. К 100-летию Г.В. Никольского. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2010. 96 с.
- Дгебуадзе Ю.Ю., Мина М.В., Мироновский А.Н. К оценке фенетических отношений алтайских османов *Oreoleuciscus* (Cyprinidae) из трех озер Монголии по признакам черепа // Вопр. ихтиол. 2008. Т. 48. № 3. С. 315–323.
- Дгебуадзе Ю.Ю., Мироновский А.Н., Мэндсайхан Б. и др. Быстрая морфологическая диверсификация карповой рыбы *Oreoleuciscus potanini* (Cyprinidae) при образовании водохранилища на реке семиаридной зоны // ДАН. Науки о жизни. 2020. Т. 490. С. 85–89. <https://doi.org/10.31857/S2686738920010060>
- Кожара А.В., Маврин А.С., Мироновский А.Н. Структура фенетического разнообразия и систематика краснопёрки *Scardinius erythrophthalmus* водоемов и водотоков России и сопредельных стран. // Биология внутр. вод. 2020. № 6. С. 538–549. <https://doi.org/10.31857/S0320965220060121>
- Мина М.В., Мироновский А.Н., Капитанова Д.В. Фенетические отношения и вероятные пути морфологической диверсификации африканских усачей комплекса *Barbus intermedius* из озера Тана (Эфиопия) // Вопр. ихтиологии. 2011. Т. 51. № 2. С. 149–163.

- Мина М.В., Держинский К.Ф., Мироновский А.Н. и др. Фенетическое разнообразие крупных усачей *Barbus intermedius* complex sensu Banister из прибрежной зоны Бахардарского залива (озеро Тана, Эфиопия) // *Вопр. ихтиологии*. 2013. Т. 53. № 6. С. 627–644. <https://doi.org/10.7868/S0042875213050081>
- Мина М.В., Мироновский А.Н., Дгебуадзе Ю.Ю. Полиморфизм по пропорциям черепа у крупных африканских усачей *Barbus intermedius* sensu Banister, 1973 (Cyprinidae) из озер Аваса и Лангано (Рифтовая долина, Эфиопия) // *Вопр. ихтиологии*. 2016. Т. 56. № 4. С. 403–409. <https://doi.org/10.7868/S0042875216040081>
- Мина М.В., Мироновский А.Н. Сравнительный анализ структуры различий между некоторыми морфотипами крупных африканских усачей рода *Barbus* (*Labeobarbus auctorum*) из озера Тана, Эфиопия // *Вопр. ихтиологии*. 2022. Т. 62. № 3. С. 272–280. <https://doi.org/10.31857/S0042875222030134>
- Мироновский А.Н. Факторы, обуславливающие сопоставимость данных, полученных путем оценки пластических признаков рыб // *Вопр. ихтиологии*. 2006. Т. 46. № 2. С. 240–251.
- Мироновский А.Н. Место генерализованной формы в структуре фенетического разнообразия крупных африканских усачей комплекса *Barbus intermedius*. Метод корреляционных плеяд // *Вопр. ихтиологии*. 2017. Т. 57. № 4. С. 393–404. <https://doi.org/10.7868/S0042875217040105>
- Мироновский А.Н. Крупные африканские усачи: векторы диверсификации особей генерализованной формы как основа морфологического разнообразия комплекса *Barbus intermedius* в озере Тана, Эфиопия // *Вопр. ихтиологии*. 2020. Т. 60. № 3. С. 283–294. <https://doi.org/10.31857/S0042875220030121>
- Мироновский А.Н. Изменчивость усачей комплекса *Barbus intermedius* в трех озерах Эфиопии: дифференциация особей генерализованной формы по признакам, связанным с разделением пищевых ресурсов. Метод корреляционных плеяд // *Экология*. 2021a. № 3. С. 225–233. <https://doi.org/10.31857/S0367059721020062>
- Мироновский А.Н. Вектор разделения пищевых ресурсов в изменчивости особей генерализованной формы крупных африканских усачей комплекса *Barbus* (= *Labeobarbus*) *intermedius* в озерах Тана, Лангано и Аваса, Эфиопия // *Вопр. ихтиологии*. 2021b. Т. 61. № 4. С. 455–463. <https://doi.org/10.31857/S0042875221040135>
- Banister K.E. A revision of the large *Barbus* (Pisces, Cyprinidae) of East and Central Africa. Pt. II // *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. Zool.* 1973. V. 26. P. 1–148. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.204>
- Levin B.A., Casal-López M., Simonov E. et al. Adaptive radiation of barbs of the genus *Labeobarbus* (Cyprinidae) in the East African river // *Freshwater Biol.* 2019. V. 64. Iss. 10. P. 1–15. <https://doi.org/10.1111/fwb.13364>
- Levin B.A., Simonov E., Dgebuadze Yu.Yu. et al. In the rivers: Multiple adaptive radiations of cyprinid fishes (*Labeobarbus*) in Ethiopian Highlands // *Scientific Reports*. 2020. V. 10:7192. P. 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64350-4>
- Mina M.V. Morphological diversification of fish as a consequence of the divergence of ontogenetic trajectories // *Russian J. of Developmental Biology*. 2001. V. 32. № 6. P. 397–401. <https://doi.org/10.1023/A:1012842221732>
- Mina M.V., Mironovsky A.N., Dgebuadze Yu.Yu. Allometrie et divergence entre les barbeaux du lac Tana (Ethiopie) // *Cahiers d’Ethologie*. 1993. V. 13. P. 219–222.
- Mina M.V., Mironovsky A.N., Dgebuadze Yu.Yu. Lake Tana large barbs: phenetics, growth and diversification // *J. Fish Biol.* 1996. V. 48. P. 383–404. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb01435.x>
- Mina M.V., Mironovsky A.N., Golubtsov A.S. et al. ‘*Barbus*’ intermedius species flock in Lake Tana (Ethiopia). II. Morphological diversity of “large barbs” from Lake Tana and neighbouring areas: homoplasies or synapomorphies? // *Ital. J. Zool.* 1998. V. 65. Suppl. P. 9–14. <https://doi.org/10.1080/11250009809386789>
- Mina M.V., Mironovsky A.N., Golani D. Consequences and modes of morphological diversification of East African and Eurasian barbins (genera *Barbus*, *Varicorhinus* and *Capoeta*) with particular reference to *Barbus intermedius* complex // *Environ. Biol. Fish.* 2001. V. 61. P. 241–252. <https://doi.org/10.1023/A:1010952108081>
- Nagelkerke L.A.J., Sibbing F.A., Osse J.W.M. Morphological divergence during growth in the large barbs (*Barbus* spp.) of Lake Tana, Ethiopia // *Environ. Biol. Fish.* 1995. V. 61. P. 431–454. <https://doi.org/10.1163/156854295X00401>
- Nagelkerke L.A.J., Sibbing F.A. The large barbs (*Barbus* spp., Cyprinidae, Teleostei) of Lake Tana (Ethiopia), with a description of a new species, *Barbus osseensis* // *Netherl. J. Zool.* 2000. V. 50. № 2. P. 179–214. <https://doi.org/10.1163/156854200505946>
- Nagelkerke L.A.J., Sibbing F.A., van den Boogaart J.G.M. et al. The barbs (*Barbus* spp.) of Lake Tana: a forgotten species flock? // *Environ. Biol. Fish.* 1994. V. 39. P. 1–22. <https://doi.org/10.1007/BF00004751>
- Nagelkerke L.A.J., Rossberg A.G. Trophic niche-space imaging, using resource and consumer traits. // *Theoretical Ecology*. 2014. V. 7. № 4. P. 423–434. <https://doi.org/10.1007/s12080-014-0229-5>
- Shkil F.N., Lazebnyi O.E., Kapitanova D.V. Ontogenetic mechanisms of explosive morphological divergence in the lake Tana (Ethiopia) species flock of large African barbs (*Labeobarbus*; Cyprinidae, Teleostei) // *Russian J. Developmental Biology*. 2015. V. 46. № 5. P. 294–306. <https://doi.org/10.1134/S1062360415050069>
- Sibbing F.A., Nagelkerke L.A.J., Stet R.J.M., Osse J.W.M. Speciation of endemic Lake Tana barbs (Cyprinidae, Ethiopia) driven by trophic resource partitioning; a molecular and ecomorphological approach // *Aquat. Ecol.* 1998. V. 32. P. 217–227. <https://doi.org/10.1023/A:1009920522235>
- Sibbing F.A., Nagelkerke L.A.J. Resource partitioning by Lake Tana barbs predicted from fish morphometrics and prey characteristics // *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 2001. V. 10(4). P. 393.

Generalized Form of Barbs of the *Barbus* (= *Labeobarbus*) *intermedius* Complex in Lake Tana: Vectors of Morphological Variability at Different Stages of Postnatal Ontogenesis

A. N. Mironovsky*

*Severtsov Institute of Problems of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences,
Leninsky pr-t. 33, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: adissa@mail.ru*

Fishes of the *Barbus* (= *Labeobarbus*) *intermedius* complex (Actinopterygii, Cyprinidae), known in Russian-language literature as Large African Barbs, are widely distributed in Africa water bodies. A special feature of the morphological diversity of this group of fish is the sympatric coexistence of morpho-ecological forms in local populations. The most famous example of such coexistence takes place in Lake Tana located in the north of Ethiopia, where, according to different authors, up to 15 morpho-ecological forms (morphotypes) live. The diagnostic features of the barbs of Lake Tana morphotypes are clearly manifested upon reaching a standard length (*SL*) of about 15 cm. With a shorter length, representatives of most morphotypes are indistinguishable from each other. This suggests that in ontogenesis, the main vectors of morphological variability of the Tana Lake barbs may be different before and after individuals reach a length of 15 cm. The aim of this study was to test this assumption. The results obtained confirm that in this population, the standard length (*SL*), equal to about 15 cm, delimits two stages of postnatal ontogenesis in the studied group of fish. In individuals with *SL* < 15 cm, the main vector of variability is a consequence of changes in morphological proportions as the individual grows. In individuals with *SL* > 15 cm, the main vector of variability is most likely associated with the trophic resource partitioning. The original approach used in the study is considered promising in analyzing the peculiarities of variability at different stages of ontogenesis not only of the studied group, but also of other systematic groups.

Keywords: generalized form, *Barbus* (= *Labeobarbus*) *intermedius* complex, sympatric speciation, postnatal ontogenesis, vectors of variability

ХЕМОКИН CCL2 АКТИВИРУЕТ ФАКТОРЫ ГИПОКСИЧЕСКОГО ОТВЕТА, РЕГУЛИРУЕТ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ И НАПРАВЛЕННУЮ ЭНДОТЕЛИАЛЬНУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. А. И. Шевченко^а, А. М. Арссан^а, С. М. Закиян^а, И. С. Захарова^{а, *}

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение

“Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук”, просп. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: zakharova@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 22.10.2022 г.

После доработки 01.02.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Современные исследования плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека ставят своей задачей подбор условий и факторов роста, которые позволят лучше имитировать преимплантационное развитие и дифференцировку зародышевых клеток, что имеет важное значение для создания клеточных моделей заболеваний. Ранее было показано, что в присутствии хемокина CCL2 ПСК человека приобретают свойства, присущие преимплантационным бластомерам, а именно активируют сигнальный путь JAK-STAT3 и повышают уровень мРНК генов гипоксического ответа. Однако CCL2 практически не используется при культивировании ПСК человека, а его действие описано в единственном исследовании. Мы продолжили изучение влияния CCL2 на ПСК человека и показали, что эмбриональные и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека, культивированные с CCL2, имеют повышенный уровень белка кислородзависимых субъединиц HIF1A и HIF2A, необходимых для запуска гипоксического ответа, а также повышенный уровень белков ключевых транскрипционных факторов плюрипотентности OCT4, NANOG, KLF4, SOX2 и TFCP2L1. Кроме того, присутствие CCL2 положительно влияет на направленную эндотелиальную дифференцировку, ускоряя созревание предшественников и усиливая ангиогенный потенциал дифференцированных производных.

Ключевые слова: плюрипотентные стволовые клетки, хемокин CCL2, гипоксический ответ, направленная эндотелиальная дифференцировка

DOI: 10.31857/S0475145023020052, **EDN:** XFKLPE

ВВЕДЕНИЕ

Актуальным направлением исследований культивируемых плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека, к которым относят эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), остается совершенствование условий их получения, поддержания и дифференцировки. Обычные линии ПСК человека, получаемые и поддерживаемые за счет фактора bFGF, отражают более позднюю стадию эмбрионального развития, характерную клеткам постимплантационного эпибласта (Collier, Rugg-Gunn, 2018), что подтверждено данными транскриптомного анализа (Nakamura et al., 2016). Плюрипотентное состояние этих клеток определяется как “праймированное”. Смысл оптимизации условий культивирования ПСК человека — получение культур плюрипотентных кле-

ток, соответствующих более ранним стадиям эмбрионального развития, а именно эпибласту преимплантационной бластоцисты. К преимуществам таких ПСК, названных “наивными”, относят их повышенную жизнеспособность и клоногенность, низкий уровень спонтанной дифференцировки при культивировании, способность более полно воспроизводить процессы раннего развития, а также неограниченный потенциал для получения дифференцированных производных, включая возможность формировать функциональные гаметы (Collier, Rugg-Gunn, 2018).

Для получения ПСК человека в “наивном” состоянии, в том числе из праймированных клеточных линий, предложен ряд протоколов (Hanna et al., 2010; Chan et al., 2013; Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014; Ware et al., 2014; Guo et al., 2017). Однако трудно сказать,

какие из существующих подходов позволяют получать ПСК человека, максимально приближенные к “наивному” состоянию, из-за недостаточной изученности этого вопроса и отсутствия общепринятых критериев “наивной” плюрипотентности. Попытки совершенствования подходов к получению “наивных” ПСК человека продолжают и направлены, главным образом, на усиление сигнального каскада JAK-STAT3, активируемого фактором LIF, и ослабление сигнальных путей, запускаемых фактором bFGF (An et al., 2020; Bi et al., 2020). Кроме того, считается, что становлению и поддержанию “наивного” состояния плюрипотентности могут способствовать пониженная концентрация кислорода (3–5%), в условиях которой в норме проходит раннее развитие и запускается сигнальный каскад транскрипционного фактора HIF, индуцируемого гипоксией (Dunwoodie, 2009; Sperber et al., 2015). Так, показано, что культивирование ПСК при 5% O₂ способствует поддержанию плюрипотентности, препятствует спонтанной дифференцировке, уменьшает хромосомные aberrации, стабилизирует эпигенетическое состояние (Ezashi et al., 2005; Forsyth et al., 2006; Forristal et al., 2009; Lengner et al., 2010).

Данная работа посвящена исследованию влияния цитокина CCL2 на свойства плюрипотентных клеток человека и возможности его использования в протоколах направленной дифференцировки в эндотелиальные клетки. Ранее было продемонстрировано, что CCL2 в плюрипотентных клетках мыши, крысы и человека активирует сигнальный каскад JAK-STAT3 и может использоваться при культивировании ПСК вместо фактора LIF (Hasegawa et al., 2011, 2014). Данные транскриптомного анализа показывают, что культивирование ПСК человека с CCL2 усиливает экспрессию генов, связанных с плюрипотентным состоянием, и активирует гены, связанные с гипоксией, говоря о том, что CCL2 может индуцировать ответ, подобный тому, что возникает в клетках при пониженной концентрации кислорода (Hasegawa et al., 2014). Эти данные позволяют предположить, что хемокин CCL2 может быть перспективным фактором для получения и поддержания ПСК человека с более высоким статусом плюрипотентности. Однако исследование 2014 г., выявившее положительное влияние фактора CCL2 на плюрипотентное состояние четырех независимых линий ИПСК человека, было и остается единственным. В этой работе мы продолжили исследования эффектов фактора CCL2 на свойства плюрипотентных клеток и выяснили, как его применение при культивировании ЭСК и ИПСК человека влияет на экспрессию кислородозависимых субъединиц транскрипционного фактора HIF и генов плюрипотентности на уровне белка. Поскольку известно, что кислородозависимые субъединицы транскрипционного фактора HIF участвуют

в регуляции ангиогенеза и свойств клеток сосудов (Skuli et al., 2009; Schödel et al., 2011), в данном исследовании мы уделили внимание вопросам о том, как добавление к среде CCL2 повлияет на направленную дифференцировку ПСК человека в эндотелиальные клетки, а также на свойства полученных эндотелиоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток

В работе использовали линию эмбриональных стволовых клеток человека HuES9, (номер hPSCreg: HVRDe009-A) (Cowan et al., 2004) и линию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека K7-4 (номер hPSCreg: ICGi022-A) (Malakhova et al., 2020). ПСК культивировали на слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши в среде KnockOut DMEM (Thermo Fisher Scientific), содержащей 15% заменителя сыворотки KnockOut SR (Thermo Fisher Scientific), 1% раствора заменимых аминокислот NEAA, 0.25 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ глутамина GlutaMax (все – Thermo Fisher Scientific), 200 мкг/мл примоцина (InvivoGen) и 10 нг/мл bFGF (Sci-store). К среде добавляли CCL2 (Biolegend) в концентрации 10 нг/мл. Для пересадки колонии плюрипотентных клеток ферментативно диссоциировали с помощью TrypLE (Thermo Fisher Scientific) и рассаживали в соотношении 1 : 10 с добавлением 10 мМ ингибитора киназы Rho Y-27632 (Tocris Bioscience). Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Спонтанную дифференцировку ПСК проводили методом формирования эмбрионидных телец по ранее описанному протоколу (Zakharova et al., 2022).

Направленная дифференцировка ПСК в эндотелиальные клетки, магнитный сортинг и культивирование эндотелия

Направленную дифференцировку ПСК в эндотелиоциты проводили по ранее опубликованному протоколу с модификациями (Gu, 2018). Для этого ПСК пересаживали на поверхность, обработанную матригелем (Corning), так, чтобы через сутки конфлюентность клеток составляла 60–70%. На следующий день среду для ПСК заменяли средой для дифференцировки в мезодермальном направлении, содержащей среду RPMI 1640, добавку B27 без инсулина, 6 мкМ CHIR99021 (все – Thermo Fisher Scientific), 200 мкг/мл примоцина (InvivoGen), и оставляли клетки на двое суток при 37°C в атмосфере 5% CO₂. На третий день дифференцирующиеся клетки переводили на среду EGM-2 (Lonza) для роста эндотелия с добавлением 50 нг/мл VEGF, 25 нг/мл bFGF (все – Sci-store), 10 мкМ SB431542 (Stem cell technologies). В дальнейшем на протяжении еще 10 дней

Таблица 1. Последовательности праймеров в реакциях полуколичественного ПЦР в режиме реального времени

Ген	Последовательность олигонуклеотидов, 5' – 3'	Длина ампликона, п.н.
<i>ACTB</i>	AGGCACCAGGGCGTGAT GATAGCACAGCCTGGATAGCA	308
<i>B2M</i>	CACCCCCACTGAAAAAGATG ATATTAAAAAGCAAGCAAGCAGAA	167
<i>TFRC</i>	GTCGCTGGTCAGTTTCGTGATT AGCAGTTGGCTGTTGTACCTCTC	80
<i>HIF-1a</i>	TGCAACATGGAAGGTATTGC TTCACAAATCAGCACCAAGC	118
<i>HIF-2a</i>	TGCTACGCCACCAGTACCA CAGTTCGGGCAGCAGGTAGG	
<i>GLUT1</i>	GATTGGCTCCTTCTCTGTGG TCAAAGGACTTGCCCAGTTT	129
<i>GLUT3</i>	CAATGCTCCTGAGAAGATCATAA AAAGCGGTTGACGAAGAGT	172
<i>BRACHYURY</i>	ACCTTCCATGTGAAGCAGCAA CTCCACAGTTGGGTTTCATCTGTAA	258

культурам ежедневно проводили смену половины эндотелиальной среды. При использовании в протоколе дифференцировки хемокина CCL2 (Biolegend), его концентрация в средах составляла 10 нг/мл. Обогащение суммарной культуры после дифференцировки эндотелиальными клетками проводили методом магнитного сортирования с использованием антител к CD31 (Miltenyi Biotec), высевали на культуральную поверхность, покрытую человеческим коллагеном 4 типа (Sigma-Aldrich) в среде EGM2 (Lonza) и помещали в инкубатор при 5% CO₂ и 37°C.

Выделение РНК, синтез кДНК и ПЦР в режиме реального времени

РНК выделяли из клеток с помощью реактива TRIzol (Thermo Fisher Scientific) по инструкции производителя. Концентрацию РНК в препарате измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop. Синтез кДНК проводили с использованием набора SuperScript III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific), на одну реакцию обратной транскрипции использовали 1 мкг тотальной РНК. В качестве отрицательного контроля использовали реакционную смесь без ревертазы.

Реакции ПЦР в режиме реального времени проводили с ПЦР-смесью БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс) по инструкции производителя на приборе LightCycler480 (Roche), программа 480 SW1.5.1. Каждый образец анализировали в трех биологических и трех технических повторностях. Последовательности праймеров приведены в табл. 1. В качестве референсных генов были вы-

браны *ACTB*, *B2M* и *TFRC*. Полуколичественный анализ результатов проводили, используя обобщенный метод $\Delta\Delta C_t$ с учетом эффективности реакции, рассчитанной по результатам построения калибровочной кривой по пяти точкам (разведения матрицы с шагом в пять раз) (Hellemans et al., 2008).

Белковый иммуноблот

Белковый экстракт готовили из 10⁵ клеток в буфере RIPA (Sigma-Aldrich). 8 мкг белкового экстракта для каждого образца разделяли с помощью 10% SDS-PAGE с использованием системы BIORAD Mini-Protein Electrophoresis Tetra System (Bio-Rad). Белки переносили на PVDF мембрану (Bio-Rad) с использованием системы влажного переноса Mini Trans-Blot (Bio-Rad). Мембрану делили на две части, руководствуясь предокрашенным белковым маркером молекулярного веса. Одну часть мембраны использовали для precipitation с исследуемым белком, другую – с референсным белком ACTB или SMC1. Для детекции использовали конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антитела к IgG кролика или мыши. Список первичных и вторичных антител и их разведения приведены в табл. 2. Детекцию хемилюминесцентного сигнала осуществляли набором Bio-Rad Clarity Max Western ECL Substrate (из расчета 30 мкл рабочего раствора на 1 см² мембраны) на приборе Bio-Rad ChemiDoc MP. Денситометрический анализ для измерения различий в уровнях белков был выполнен с использованием программы ImageJ (<https://ij.imjoy.io/>). По результа-

Таблица 2. Антитела, используемые при иммуноблоттинге и иммунофлуоресцентном окрашивании

Антигены	Производитель	Каталожный номер	Изотип	Разведение
OCT4	Santa-Cruz	SC-5279	Поликлональные IgG кролика	1/1000
NANOG	Reprocell	RCAB004P-F	Поликлональные IgG кролика	1/500
KLF4	Abcam	Ab104846	Моноклональные IgG1 мыши	1/1000
SOX2	Cell Signaling	3579S	Поликлональные IgG кролика	1/1000
TFCP2L1	MERK	HPA029708	Поликлональные IgG кролика	1/1000
STAT3	Cell Signaling	9131	Поликлональные IgG кролика	1/1000
HIF-1a	Sigma Aldrich	SAB2703132	Моноклональные IgG1 кролика	1/2500
HIF-2a	Sigma Aldrich	SAB2701992	Моноклональные IgG1 кролика	1/2500
SMC1	Bethyl	A300-055A	Поликлональные IgG кролика	1/5000
ACTB	Abcam	ab228001	Поликлональные IgG кролика	1/5000
IgG мыши + + пероксидаза	Jackson ImmunoResearch	715-035-150	Поликлональные IgG осла	1/5000
IgG кролика + + пероксидаза	Jackson ImmunoResearch	711-035-152	Поликлональные IgG осла	1/5000
CD 31	DAKO	14028292	Моноклональные IgG1 мыши	1/200
Фактор фон Виллебранда	Life Technologies	A21134	Поликлональные IgG кролика	1/200
GFAP	DAKO	Z0334	Поликлональные IgG кролика	1/1000
CD90	eBioscience	14-0909-82	Моноклональные IgG1 мыши	1/100
FOXA2	Santa Cruz Biotechnology	sc-374376	Моноклональные IgG1 мыши	1/100
TUBB3	BioLegend	801201	Моноклональные IgG2a мыши	1/500
aSMA	DAKO	M0851	Моноклональные IgG2a мыши	1/100
AFP	MAB1368	R&D	Моноклональные IgG1 мыши	1/200
IgM мыши + + Alexa 568	Invitrogen	A21043	Поликлональные IgG козы	1/400
IgG кролика + + Alexa 488	Invitrogen	A110088	Поликлональные IgG козы	1/400

там измерений получали отношение интенсивностей сигналов исследуемого белка к референсному. Статистические сравнения проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

Проточная цитометрия и иммунофлуоресцентное окрашивание клеток

Для характеристики клеточных культур с помощью проточной цитометрии проводили их дезагрегацию до одноклеточного состояния. Нефиксированные клетки окрашивали йодидом пропидия и анексином V, конъюгированным с FITC (набор компании BioLegend) для определения жизнеспособности, а также флуоресцентно меченными антителами, характеризующими разные стадии дифференцировки ПСК в эндотелиоциты: CD31-APC (17-0319-42, eBioscience), VEGFR2-PE (560494, BD Biosciences) и VE-Cadherin (17-0909-

42, eBioscience), как описано ранее (Vaskova et al., 2015; Zakharova et al., 2017). В качестве негативно-го контроля использовали неокрашенные клетки и клетки, инкубированные с флуоресцентно мечеными иммуноглобулинами мыши, соответствующими изотипу применяемых моноклональных антител. Анализ клеток (10^4 событий) проводили на приборе FACS Aria III (Becton Dickinson).

При иммунофлуоресцентном окрашивании клетки, выращиваемые в культуральных планшетах, фиксировали 4% формальдегидом. Процедура иммуноокрашивания описана ранее (Vaskova et al., 2015; Zakharova et al., 2017, 2022). Используемые антитела, их производители, видовое происхождение и разведения перечислены в табл. 2. Препараты анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Ti-E и программы Nikon AR.

Функциональная характеристика эндотелиальных клеток

Флуоресцентно меченную ацетилированную форму липопротеина низкой плотности (Thermo Fisher Scientific) добавляли к эндотелиальной среде EGM-2 (Lonza) без сыворотки в концентрации 15 мкг/мл и инкубировали клетки в течение 24 ч. Способность эндотелиоцитов поглощать асLDL анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Ti-E.

При тестировании ангиогенного потенциала суспензию эндотелиальных клеток в количестве 2×10^5 в среде EGM-2 (Lonza) наносили на слой из 200 мкл матригеля (Corning), предварительно разведенного 1 : 1 со средой EGM-2 и полимеризованного в течение 15 мин при 37°C в лунке площадью 1 см². Равномерно распределяли суспензию клеток по поверхности и помещали в инкубатор при 37°C. Детекцию капилляроподобных структур проводили через 4 ч. Оценка характеристик капилляроподобных структур, образованных эндотелиальными клетками, проводилась с помощью программы AngioTool (Zudaire et al., 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние хемокина CCL2 на свойства ПСК

Ранее в единственном исследовании влияния фактора CCL2 на свойства плюрипотентных клеток человека было показано, что добавление CCL2 к ИПСК человека приводит к повышению уровня мРНК ряда генов, характерных для условий гипоксии (кислородного голодания) (Hasegawa et al., 2014). Мы продолжили это исследование и выяснили, как добавление CCL2 к ЭСК (линия HuES9) и ИПСК (линия K7-4) человека влияет на уровень кислородзависимых белков HIF1A и HIF2A, входящих в состав мультисубъединичного транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией (HIF). Известно, что HIF1A и HIF2A деградируют в клетках при атмосферной концентрации кислорода, но при концентрации кислорода менее 10% их деградация прекращается, формируется стабильный фактор HIF, способный связываться с сайтами в промоторах генов-мишеней, запуская гипоксический ответ (Hashimoto, Shibasaki, 2015). Мы обнаружили, что как в ЭСК, так и в ИПСК человека, обработанных CCL2 и находящихся при атмосферной концентрации кислорода (~21%), происходит значимое повышение уровней белков кислородзависимых субъединиц HIF1A и HIF2A (рис. 1а). Следует отметить, что при этом достоверное повышение уровня мРНК с помощью полуколичественного ПЦР в режиме реального времени детектируется только для гена HIF2A (рис. 1б). Кроме того, мы установили, что в клетках с повышенным уровнем белков HIF1A и HIF2A происходит повышение уровня мРНК

транспортеров глюкозы GLUT1 и GLUT3 (рис. 1б), являющихся мишенью транскрипционного фактора HIF. Это свидетельствует об активации гипоксического ответа в плюрипотентных клетках, в частности, об усилении гликолитического метаболизма в ПСК в присутствии CCL2.

Мы выяснили, как добавление CCL2 влияет на уровень белков транскрипционных факторов, вовлеченных в поддержание плюрипотентности. С помощью полуколичественного иммуноблоттинга мы подтвердили, что в ПСК, обработанных CCL2, резко повышается уровень фосфорилированной (активной) формы транскрипционного фактора STAT3 (рис. 2), за трансактивацию которого отвечают киназы JAK1/2. Таким образом, мы еще раз продемонстрировали ранее установленный факт, что в присутствии CCL2 в плюрипотентных клетках активируется сигнальный каскад JAK-STAT3. Кроме того, полуколичественный иммуноблоттинг показал значимое повышение уровня белка для факторов OCT4, NANOG, TFCEP2L1 в плюрипотентных клетках, обработанных CCL2, по сравнению с ПСК, культивируемыми только в присутствии bFGF (рис. 2). Повышение уровня белка KLF4 регистрировалось только в линии ИПСК, а SOX2 — только в линии ЭСК. Вероятно, эти различия в действии CCL2 могут быть связаны с исходным уровнем транскрипционных факторов в линиях плюрипотентных клеток. Если исходный уровень низкий — при добавлении CCL2 наблюдается статистически значимое повышение, если исходный уровень близок к максимально возможному, при культивировании с CCL2 включаются посттрансляционные механизмы, препятствующие резкому повышению уровня белка. Следует отметить, что прямыми мишенями транскрипционного фактора STAT3 являются гены NANOG, KLF4 и TFCEP2L1. Известно, что повышенный уровень белка транскрипционных факторов TFCEP2L1, KLF4 и NANOG является свойством наивных ПСК (Messmer et al., 2019; An et al., 2020; Bi et al., 2020). Таким образом, вероятно, присутствие в среде хемокина CCL2 способствует переходу культивируемых ПСК человека в более высокое плюрипотентное состояние.

Мы подтвердили, что ПСК, культивируемые в присутствии CCL2, сохраняют способность давать производные трех зародышевых листков (экто-, мезо- и энтодермы) при спонтанной дифференцировке (рис. 3).

Ряд добавок, используемых при культивировании ПСК человека, могут понижать жизнеспособность и вызывать гибель части клеток в культуре (Theunissen et al., 2014; Guo et al., 2017). В связи с этим мы проанализировали жизнеспособность ПСК в присутствии CCL2 и без него с помощью маркеров некроза и апоптоза йодида пропидия и аннексина V методом проточной цитометрии

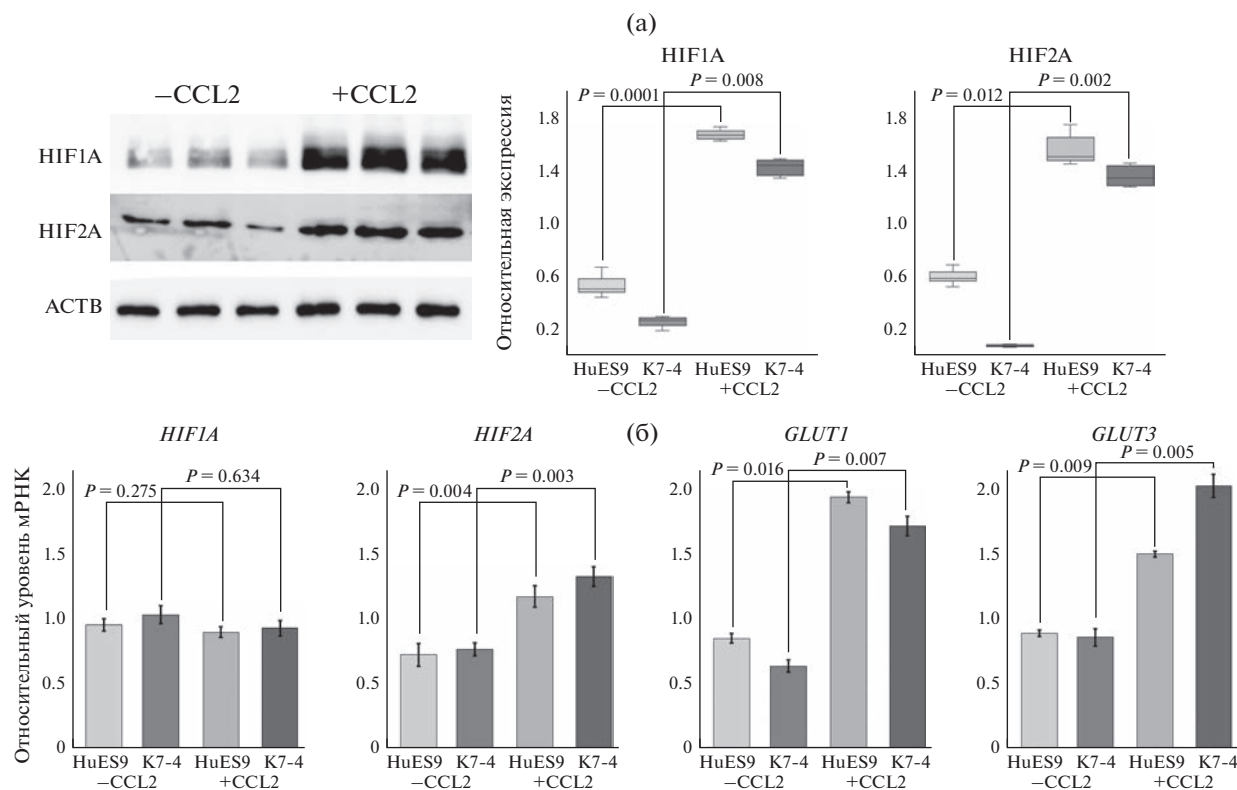


Рис. 1. Добавление CCL2 к культуре плюрипотентных стволовых клеток человека вызывает гипоксический ответ при атмосферной концентрации кислорода. (а) Повышение уровней белков кислородзависимых субъединиц HIF1A и HIF2A при культивировании с хемокином CCL2 ЭСК линии HuES9 и ИПСК линии K7-4. Примеры иммуноблоттинга белковых лизатов линии HuES9. На диаграммах размаха представлены относительные уровни белков HIF1A и HIF2A, нормированные на ACTB и SMC1, на основании данных денситометрии по результатам белкового иммуноблота с лизатами эмбриональных стволовых клеток HuES9 и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток K7-4, культивируемых с CCL2 (+CCL2) и без CCL2 (–CCL2). Примеры иммуноблоттинга белковых лизатов представлены для линии HuES9. (б) Сравнение относительного уровня экспрессии генов, связанных с гипоксией: *HIF1A* и *HIF2A* (а), *GLUT1* и *GLUT3* (б), в культурах ЭСК линии HuES9 и ИПСК линии K7-4, выращенных с добавлением (+CCL2) и без добавления (–CCL2) хемокина CCL2.

(рис. 4). К удивлению, клетки в присутствии CCL2 не только не снижали, но воспроизводимо демонстрировали статистически более высокий уровень жизнеспособности, по сравнению с клетками, культивируемыми без CCL2.

Влияние хемокина CCL2 на направленную дифференцировку ПСК в эндотелиальные производные

В ряде работ показано, что гипоксия и повышение уровня кислородзависимых субъединиц HIF1A и HIF2A при атмосферной концентрации кислорода способствует эндотелиальной дифференцировке ПСК человека и повышает ангиогенный потенциал полученных эндотелиальных производных за счет регуляции генов-мишеней фактора HIF (Podkalicka et al., 2020). Этот эффект был установлен при исследовании направленной эндотелиальной дифференцировки более чем 50 линий ПСК. На основании этого мы предпо-

ложили, что повышение белкового уровня субъединиц HIF-1a и HIF-2a, наблюдаемое в присутствии фактора CCL2, также может иметь позитивный эффект на направленную эндотелиальную дифференцировку ПСК и свойства дифференцированных производных. Для проверки этого предположения мы провели эксперимент по направленной дифференцировке, в котором линии ЭСК и ИПСК человека, культивируемые с CCL2, последовательно помещали в среды для мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки, также содержащие CCL2 (рис. 5). Для контроля культивирование исходных линий ПСК и их последующую дифференцировку проводили в средах без CCL2.

После первого этапа дифференцировки ПСК в мезодермальном направлении мы с помощью метода полуколичественного ПЦР в режиме реального времени провели анализ экспрессии гена, который кодирует транскрипционный фактор BRACHYURY, являющийся ключевым для запус-

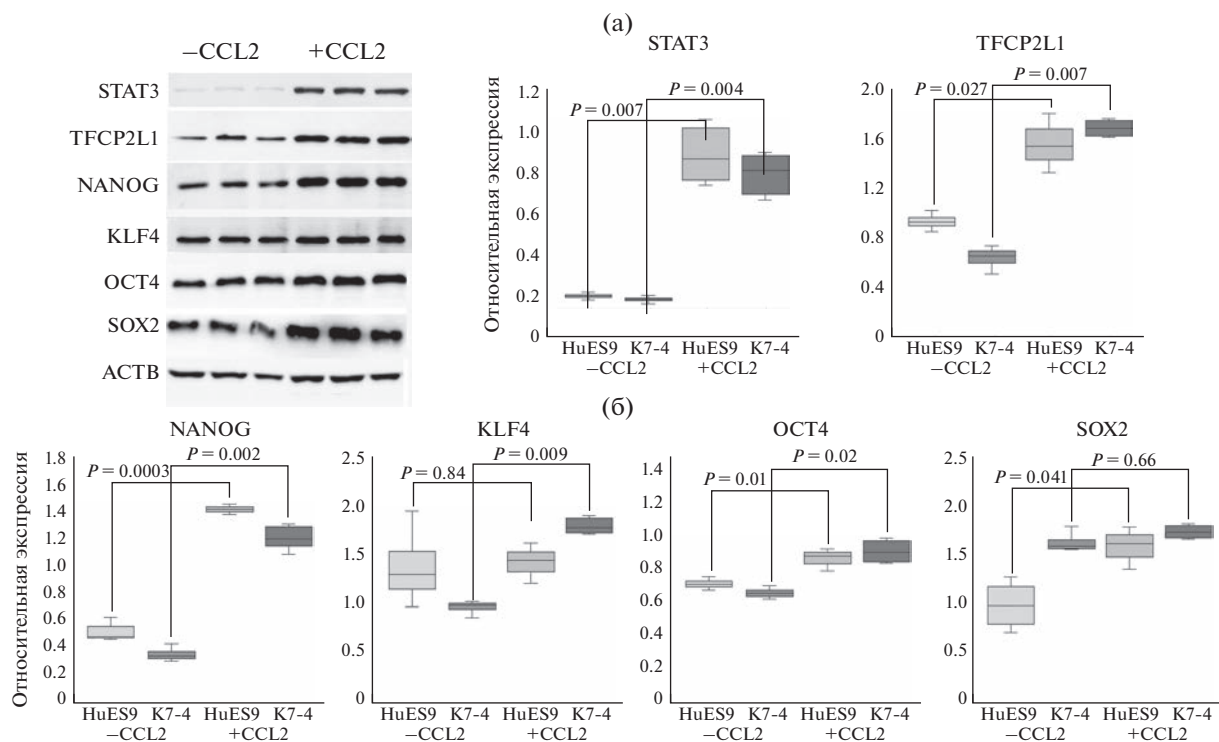


Рис. 2. Относительный уровень белков транскрипционных факторов плюрипотентности при культивировании плюрипотентных стволовых клеток человека с хемокином CCL2 (+CCL2) и без него (–CCL2). На диаграммах размаха представлены относительные уровни фосфорилированной формы транскрипционного фактора STAT3, а также факторов OCT4, TFCEP2L1, KLF4, NANOG, SOX2, нормированные на ACTB и SMC1, на основании данных денситометрии по результатам белкового иммуноблота с лизатами эмбриональных стволовых клеток HuES9 и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток K7-4. Примеры иммуноблоттинга белковых лизатов представлены для линии HuES9.

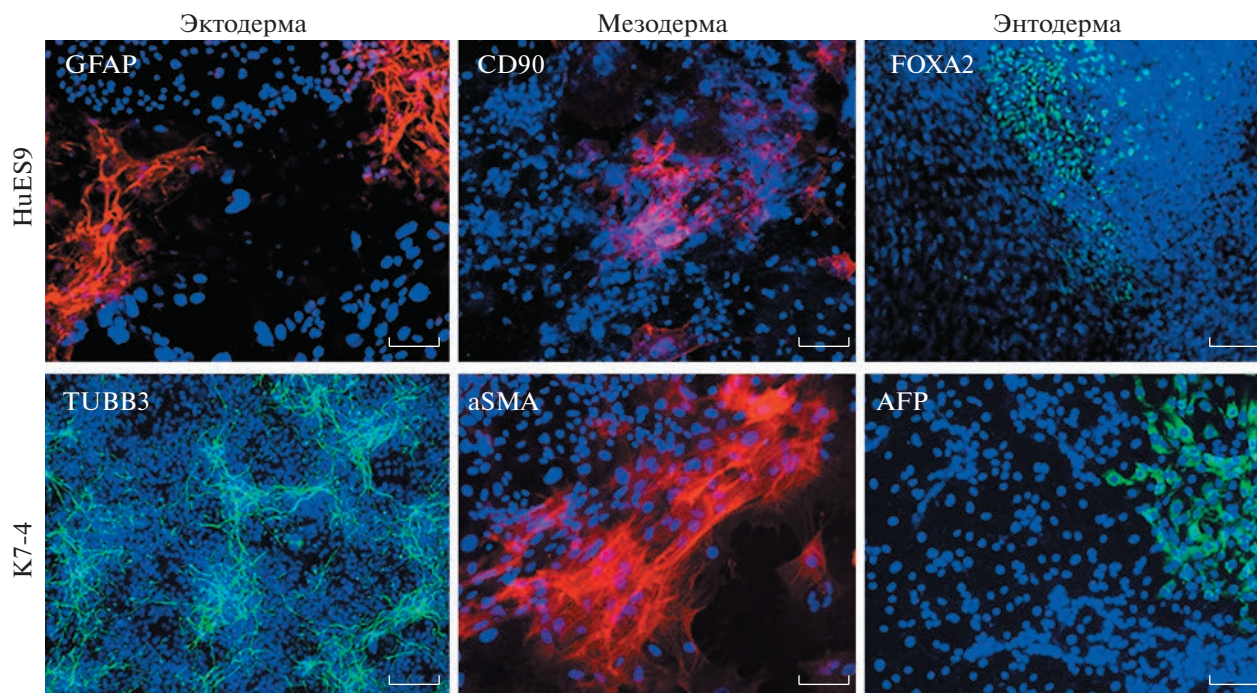


Рис. 3. Производные трех первичных зародышевых листков (экто-, мезо- и энтодермы), детектируемые в производных ЭСК линии HuES9 и ИПСК линии K7-4 после спонтанной дифференцировки. Линейка — 100 мкм.

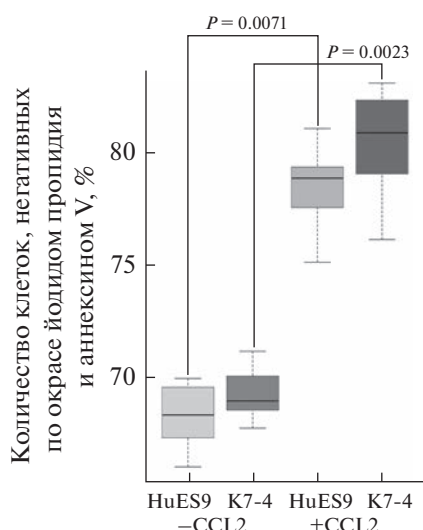


Рис. 4. Жизнеспособность ЭСК человека линии HuES9 и ИПСК линии K7-4, культивируемых без добавления (–CCL2) и с добавлением хемокина CCL2 (+CCL2).

ка развития мезодермы (рис. 6а). Результаты показывают, что относительный уровень мРНК данного гена достоверно не отличается между клетками линий HuES9 и K7-4, дифференцирующимися с CCL2 и без него. Таким образом, CCL2 не снижает эффективность мезодермальной дифференцировки.

На второй и восьмой день непосредственно эндотелиальной дифференцировки ПСК в среде EGM-2 мы оценили содержание эндотелиальных предшественников по наличию рецептора VEGFR2, а также долю клеток с маркерами VE-Cadherin и CD31, характерными для более поздних стадий эндотелиальной дифференцировки. На второй день дифференцированные производные, полученные с CCL2, имели на 20% больше клеток с маркером VE-Cadherin, который характерен более поздним стадиям эндотелиальной

дифференцировки (рис. 6б). Финальные результаты о доле клеток с маркерами VEGFR2, VE-Cadherin и CD31 на восьмой день не отличались между дифференцированными производными, полученными обычным способом, и с использованием CCL2 (рис. 6в). Таким образом, применение CCL2 не улучшает и не ухудшает эффективность протокола направленной эндотелиальной дифференцировки, однако, вероятно, способствует более быстрому переходу эндотелиальных предшественников к стадии более зрелых VE-Cadherin-позитивных эндотелиальных производных.

Эндотелиальные клетки, полученные в результате направленной дифференцировки двух линий ПСК человека в присутствии фактора CCL2, обладают характерными признаками: позитивны по маркеру зрелых эндотелиоцитов CD31, синтезируют фактор фон Виллебранда, поглощают ацетилированную форму липопротеина низкой плотности (рис. 7).

При исследовании ангиогенного потенциала по способности образовывать капилляроподобные структуры в матриксе мы обнаружили, что эндотелиальные производные, полученные с CCL2, имеют статистически достоверные преимущества по общей длине сети капилляроподобных структур, а также числу точек ветвления (рис. 8). Таким образом, эндотелиоциты, полученные и поддерживаемые с использованием CCL2, демонстрируют более высокий ангиогенный потенциал.

ОБСУЖДЕНИЕ

Первые исследования отрицали необходимость фактора LIF и запускаемого им сигнального каскада JAK-STAT3 в поддержании ПСК человека, приписывая ключевую роль сигнальному пути TGFβ-ACTIVIN-NODAL, активируемому фактором bFGF (Matsuda et al., 1999; Dahéron et al., 2004). Позже было показано, что путь JAK-STAT3,



Рис. 5. Схема направленной эндотелиальной дифференцировки ПСК человека.

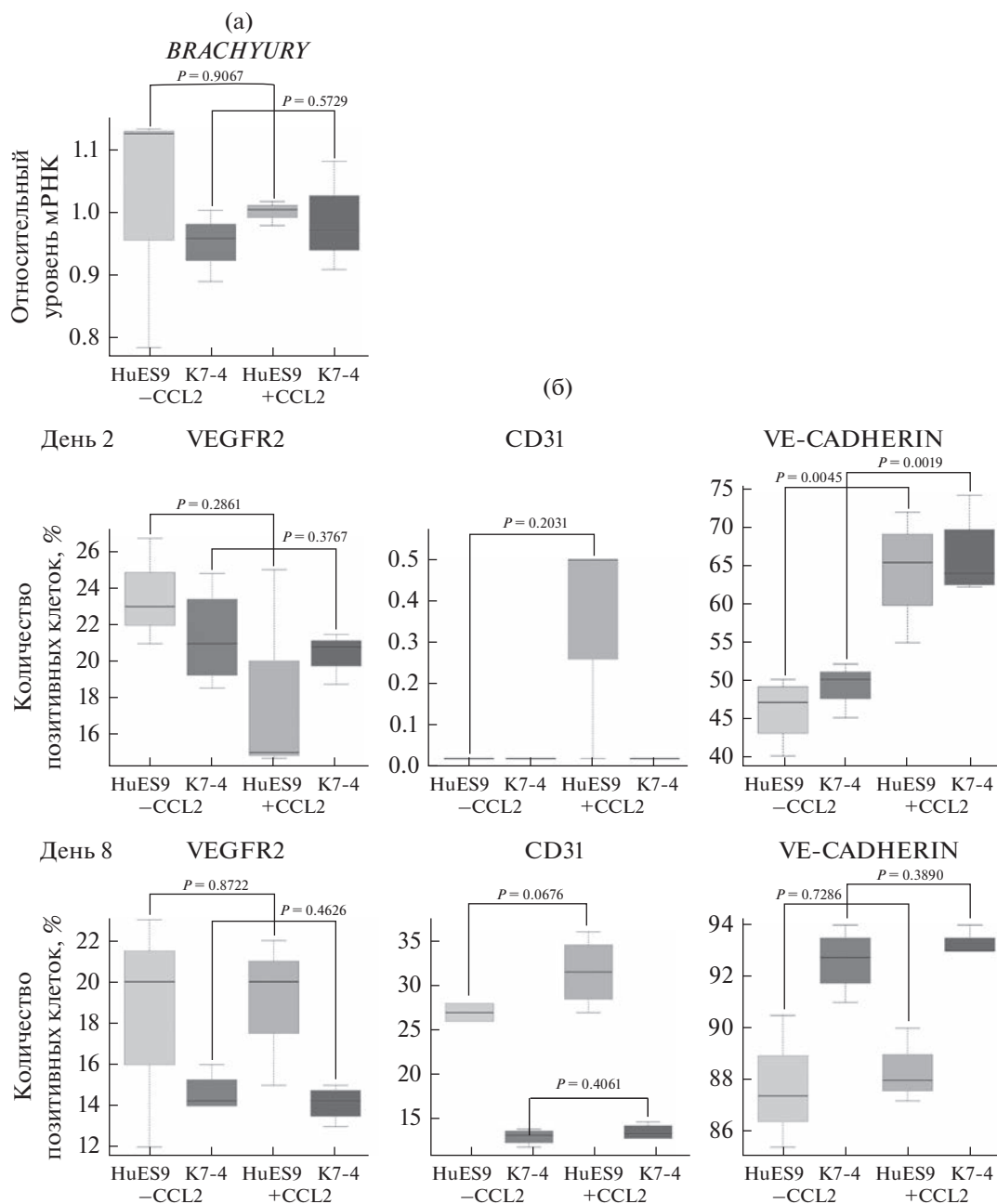


Рис. 6. Эффективность направленной мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток линий HuES9 и K7-4, культивируемых без добавления (–CCL2) и с добавлением хемокина CCL2 (+CCL2). (а) Относительный уровень экспрессии мРНК гена *BRACHYURY* – раннего маркера мезодермальной дифференцировки. (б) Количественная оценка маркеров эндотелиальной дифференцировки методом проточной цитометрии.

хотя и не способен поддерживать плюрипотентность клеток человека сам по себе, тем не менее способствует активации генов плюрипотентного состояния (Collier, Rugg-Gunn, 2018). Более того, в одном из протоколов фактор LIF совместно с добавлением ингибиторов киназ CHIR99021, PD0325901, Gö6983 позволяет обходиться при культивировании ПСК человека без фактора bFGF

и приближает ПСК по свойствам к бластомерам ранних (32–64 клетки) преимплантационных бластоцист (Guo et al., 2017). В этой работе мы исследовали возможности использования при культивировании и дифференцировке ПСК человека хемокина CCL2, который, как было показано ранее, обладает свойством активировать сигнальный путь JAK-STAT3 (Hasegawa et al., 2014), но до

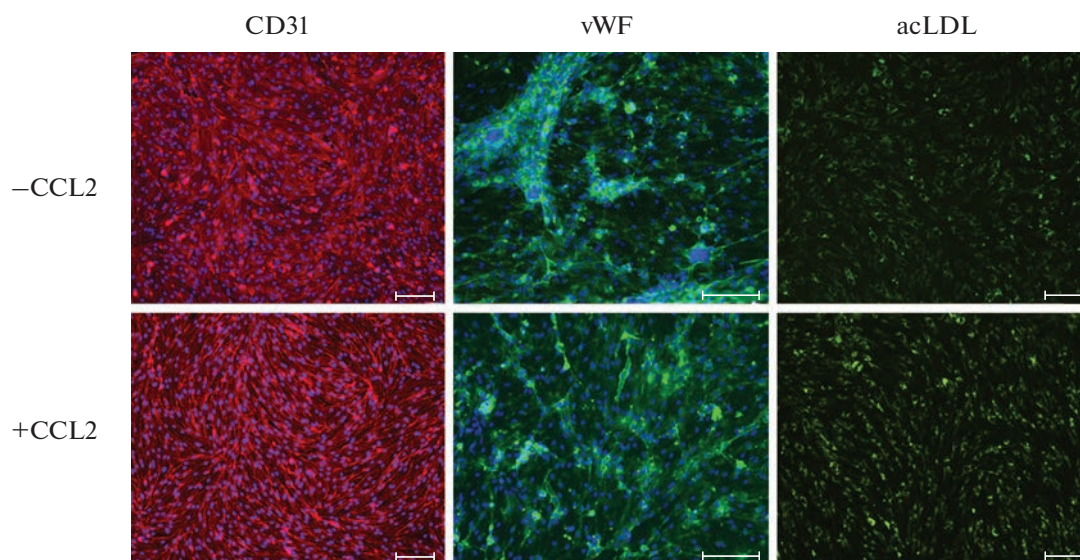


Рис. 7. Эндотелиальные производные ПСК, полученные в результате дифференцировки линии HuES9 без добавления (–CCL2) и с добавлением хемокина CCL2 (+CCL2), демонстрируют свойства, характерные эндотелиоцитам: имеют поверхностный антиген CD31, синтезируют фактор фон Виллебранда (vWF), метаболизируют ацетилированную форму липопротеина низкой плотности (acLDL). Ядра окрашены DAPI. Линейка – 100 мкм.

сих пор практически не применяется для работы с ПСК. В данном исследовании мы продемонстрировали, что применение CCL2 при культивировании ПСК человека статистически значимо повышает уровень белков ключевых транскрипционных факторов OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 и TFCEP2L1, а также фосфорилированной (активной) формы STAT3, что характерно для перехода ПСК к состоянию “наивной” плюрипотентности. Результаты нашего исследования согласуются с ранее полученными данными в работах на ИПСК человека (Hasegawa et al., 2014) и свидетельствуют, что CCL2 действительно способен активировать сигнальный каскад JAK-STAT3 и повышать уровень экспрессии белков, гены которых являются мишенями транскрипционного фактора STAT3. Таким образом, наши данные подтверждают ранее установленный факт, что CCL2 способен активировать тот же сигнальный каскад, что и LIF, а, следовательно, свидетельствуют в пользу сделанного ранее заключения о возможности рассматривать эти два фактора как альтернативу друг другу при культивировании ПСК.

При пониженной концентрации кислорода (менее 10%) ген белка CCL2 является мишенью и активируется гетеродимерным транскрипционным фактором HIF, в состав которого входит субъединица HIF1A (Mojsilovic-Petrovic et al., 2007; Ваау-Гузман et al., 2012). Также ранее было показано, что при атомосферной концентрации кислорода белок CCL2, связывающийся с рецептором на поверхности клетки, приводит к повышению уровня мРНК субъединицы HIF2A и ряда генов гипоксического ответа в ПСК человека (Hasegawa et al.,

2014). В данном исследовании мы установили, что в ПСК, культивируемых при атмосферной концентрации кислорода 21% в присутствии CCL2 значительно повышается уровень белка двух кислородзависимых субъединиц транскрипционного фактора HIF: HIF1A и HIF2A. Подобным свойством повышать уровень белка HIF при атмосферной концентрации кислорода обладают так называемые вещества-миметики гипоксии, такие как хлорид кобальта(II) (CoCl_2) и диметилноксалилглицин (DMOG) (Mojsilovic-Petrovic et al., 2007; Binó et al., 2016). Миметики гипоксии используют при работе с разными типами клеток, включая плюрипотентные, в частности, их применяют в протоколах направленной дифференцировки (Ng et al., 2011; Jeon et al., 2014; Zhdanov et al., 2015; Binó et al., 2016; Salikhova et al., 2020). Неудобство использования CoCl_2 и DMOG связано с тем, что они токсичны для клеток и снижают жизнеспособность (Isaja et al., 2020). Мы показали, что CCL2 обладает свойствами миметика гипоксии, при этом не является токсичным для плюрипотентных клеток, а, напротив, повышает их жизнеспособность. CoCl_2 и DMOG обычно используют для кратковременного культивирования с клетками в течение нескольких дней, CCL2 можно использовать при длительном культивировании, при необходимости — на протяжении десятков пассажей. Тем не менее, следует учитывать, что гипоксический ответ, вызываемый CCL2, отличается от ответа клеток при пониженной концентрации кислорода. В условиях 5% O_2 культуры ПСК человека в первые 48 часов во время адаптации к гипоксии активируется HIF1A, после чего ему на смену

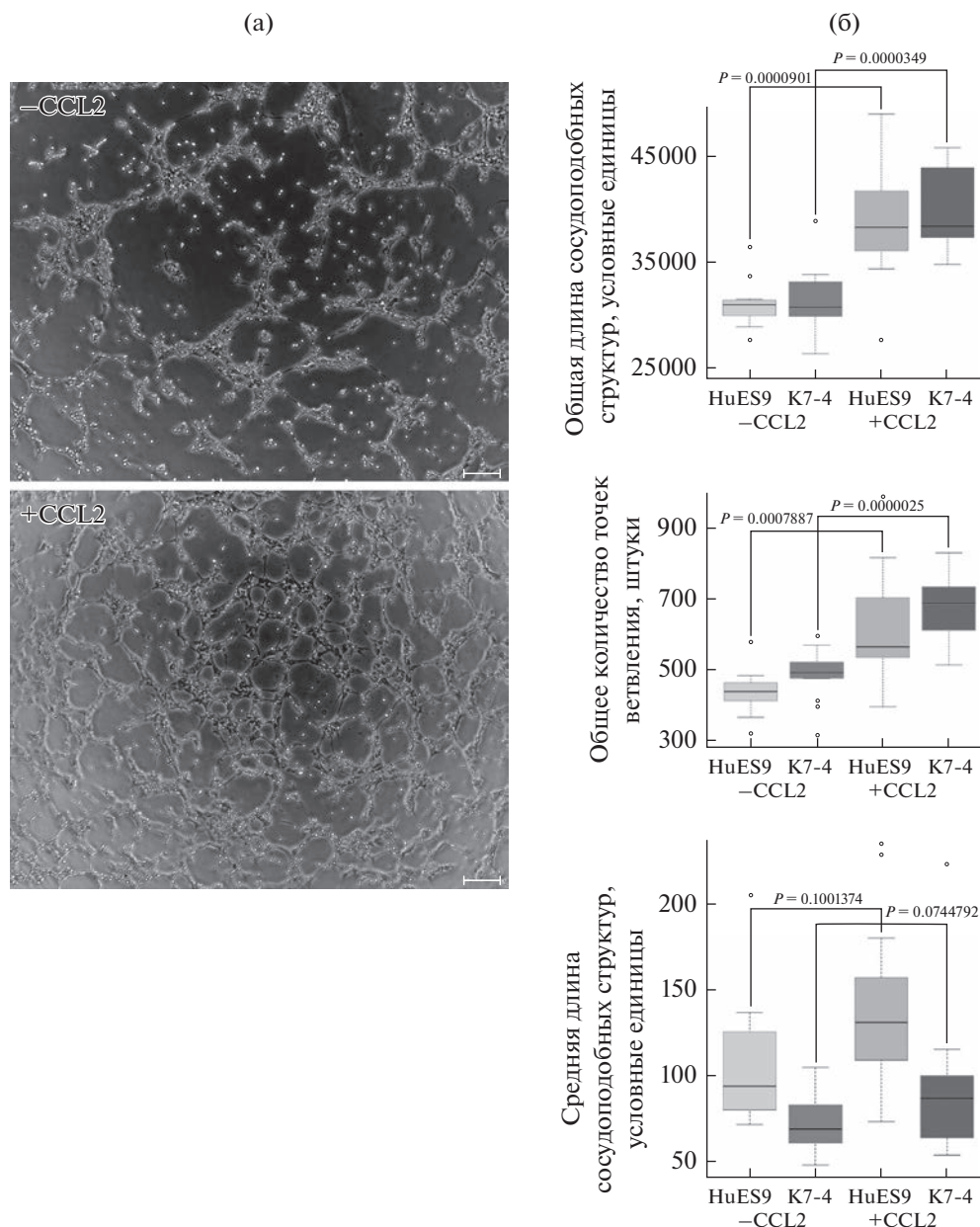


Рис. 8. Ангиогенный потенциал *in vitro* дифференцированных эндотелиальных производных ПСК человека линий HuES9 и K7-4, полученных без добавления (–CCL2) и с добавлением хемокина CCL2 (+CCL2). (а) Репрезентативное изображение сети сосудоподобных структур эндотелиальных производных HuES9 на слое матригеля. Линейка — 100 мкм. (б) Количественная оценка общей и средней длины сосудоподобных структур, общего количества точек ветвления.

приходит HIF2A, который поддерживает длительный гипоксический ответ плюрипотентных клеток (Närvä et al., 2013; Forristal et al., 2010). При использовании CCL2 мы одновременно детектировали высокий уровень белков HIF1A и HIF2A после четырех пассажей (около 20 дней).

Известно, что HIF является активатором генов плюрипотентности и способствует поддержанию плюрипотентного состояния (Forristal et al., 2010; Närvä et al., 2013; Sugimoto et al., 2018). Это позволяет предположить, что наблюдаемое повышение

уровня факторов плюрипотентности в ПСК человека, культивируемых с CCL2, может достигаться не только за счет запуска сигнального пути JAK-STAT3, но также регулируется и другими сигнальными каскадами, запускаемыми транскрипционным фактором HIF.

CCL2 хорошо зарекомендовал себя при использовании в протоколе эндотелиальной дифференцировки. Он не снижает эффективности дифференцировки в мезодермальном направлении, о чем свидетельствует отсутствие статистически значи-

мых отличий в уровне мРНК основного транскрипционного фактора мезодермы *BRACHYURY* между культурами, дифференцирующимися в присутствии CCL2 и без него. Кроме того, на второй день эндотелиальной дифференцировки у культур с CCL2 выявлялось значимо больше клеток, позитивных по VE-Cadherin. Таким образом, культуры с CCL2 быстрее проходят стадию эндотелиальных предшественников и переходят на следующие стадии эндотелиальной дифференцировки к созреванию клеток. Полученные в присутствии CCL2 эндотелиоциты по сравнению с контролем демонстрируют более высокий ангиогенный потенциал в тесте образования капилляроподобных структур в матрикеле. Повышение ангиогенного потенциала эндотелиальных клеток обычно связывают с изменениями в экспрессии генов, ответственных за миграцию и синтез внеклеточного матрикса. Известно, что подобные эффекты возникают в эндотелиальных клетках, находящихся в условиях кислородного голодания, а также при повышении уровней белков HIF1A и HIF2A при атмосферной концентрации кислорода (Sarkar et al., 2009; Skuli et al., 2009; Schödel et al., 2011; Hashimoto, Shibasaki, 2015; Hashimoto et al., 2016).

Таким образом, мы показали, что ПСК человека, обработанные CCL2, имеют высокий уровень субъединиц HIF1A и HIF2A, необходимых для запуска гипоксического ответа, активируют ключевые маркеры плюрипотентности OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 и TFCP2L1 на уровне белка, а также положительно влияют на направленную эндотелиальную дифференцировку клеток, усиливая ангиогенные свойства полученных дифференцированных производных. Мы надеемся, что обнаруженные нами эффекты фактора CCL2 будут способствовать его более широкому применению для получения и поддержания ПСК человека, а также использованию в протоколах направленной дифференцировки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования с использованием проточной цитометрии выполнены в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<https://skp.icgen.ru/skpmabo/>), поддержанном Бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН FWN-2022–0015.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-15-00065).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.И. Шевченко, С.М. Закиян разработали дизайн эксперимента. А.М. Арссан, А.И. Шевченко проводили культивирование ПСК. А.М. Арссан осуществил белковый иммуноблоттинг, ПЦР в режиме реального времени, спонтанную дифференцировку ПСК. И.С. Захарова, А.И. Шевченко провели направленную дифференцировку в эндотелиальные производные и характеристику эндотелиоцитов. А.М. Арссан, А.И. Шевченко, И.С. Захарова провели статистическую обработку полученных данных. А.И. Шевченко, И.С. Захарова написали статью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- An C., Feng G., Zhang J. et al. Overcoming autocrine FGF signaling-induced heterogeneity in naive human ESCs enables modeling of random X chromosome inactivation // *Cell Stem Cell*. 2020. V. 27. № 3. P. 482–497.e4.
- Baay-Guzman G.J., Bebenek I.G., Zeidler M. et al. HIF-1 expression is associated with CCL2 chemokine expression in airway inflammatory cells: implications in allergic airway inflammation // *Respir. Res.* 2012. V. 13. № 1. P. 60.
- Bi Y., Tu Z., Zhang Y. et al. Identification of ALPPL2 as a naïve pluripotent state-specific surface protein essential for human naïve pluripotency regulation // *Cell Rep.* 2020. V. 30. № 11. P. 3917–3931.e5.
- Bínó L., Kučera J., Štefková K. et al. The stabilization of hypoxia inducible factor modulates differentiation status and inhibits the proliferation of mouse embryonic stem cells // *Chem. Biol. Interact.* 2016. V. 244. P. 204–214.
- Chan Y.-S., Göke J., Ng J.-H. et al. Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast // *Cell Stem Cell*. 2013. V. 13. № 6. P. 663–675.
- Collier A.J., Rugg-Gunn P.J. Identifying human naïve pluripotent stem cells – evaluating state-specific reporter lines and cell-surface markers // *BioEssays*. 2018. V. 40. № 5. P. 1700239.
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J. et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 350. № 13. P. 1353–1356.
- Dahéron L., Opitz S.L., Zaehres H. et al. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2004. V. 22. № 5. P. 770–778.
- Dunwoodie S.L. The role of hypoxia in development of the mammalian embryo // *Dev. Cell*. 2009. V. 17. № 6. P. 755–773.
- Ezashi T., Das P., Roberts R.M. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 13. P. 4783–4788.
- Forristal C.E., Wright K.L., Hanley N.A. et al. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation

- in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions // *Reproduction*. 2009. V. 139. № 1. P. 85–97.
- Forsyth N.R., Musio A., Vezzoni P. et al. Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities // *Cloning Stem Cells*. 2006. V. 8. № 1. P. 16–23.
- Gafni O., Weinberger L., Mansour A.A. et al. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells // *Nature*. 2013. V. 504. № 7479. P. 282–286.
- Gu M. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial cells // *Curr. Protoc. Hum. Genet*. 2018. V. 98. № 1. P. e64.
- Guo G., von Meyenn F., Rostovskaya M. et al. Epigenetic resetting of human pluripotency // *Development*. 2017. V. 144. № 15. P. 2748–2763.
- Hanna J., Cheng A.W., Saha K. et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 20. P. 9222–9227.
- Hasegawa Y., Takahashi N., Forrest A.R.R. et al. CC chemokine ligand 2 and leukemia inhibitory factor cooperatively promote pluripotency in mouse induced pluripotent cells // *Stem Cells*. 2011. V. 29. № 8. P. 1196–1205.
- Hasegawa Y., Tang D., Takahashi N. et al. CCL2 enhances pluripotency of human induced pluripotent stem cells by activating hypoxia related genes // *Sci. Rep*. 2014. V. 4. P. 5228.
- Hashimoto T., Shibasaki F. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch // *Front. Pediatr*. 2015. V. 3. P. 33.
- Hellemans J., Mortier G., De Paepe A. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data // *Genome Biol*. 2008. V. 8. № 2. P. R19.
- Isaja L., Mucci S., Vera J. et al. Chemical hypoxia induces apoptosis of human pluripotent stem cells by a NOXA-mediated HIF-1 α and HIF-2 α independent mechanism // *Sci. Rep*. 2020. V. 10. P. 20653.
- Jeon E.S., Shin J.H., Hwang S.J. et al. Cobalt chloride induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells through upregulation of microRNA-124a // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2014. V. 444. № 4. P. 581–587.
- Lengner C.J., Gimelbrant A.A., Erwin J.A. et al. Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations // *Cell*. 2010. V. 141. № 5. P. 872–883.
- Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Pavlova S.V. et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population // *Stem Cell Res*. 2020. V. 48. 101952.
- Matsuda T., Nakamura T., Nakao K. et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells // *EMBO J*. 1999. V. 18. № 15. P. 4261–4269.
- Messmer T., von Meyenn F., Savino A. et al. Transcriptional heterogeneity in naïve and primed human pluripotent stem cells at single-cell resolution // *Cell Rep*. 2019. V. 26. № 4. P. 815.
- Mojsilovic-Petrovic J., Callaghan D., Cui H. et al. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes // *J. Neuroinflammation*. 2007. V. 4. P. 12.
- Nakamura T., Okamoto I., Sasaki K. et al. A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans // *Nat*. 2016. V. 537. № 7618. P. 57–62.
- Närvä E., Pursiheimo J.-P., Laiho A. et al. Continuous hypoxic culturing of human embryonic stem cells enhances SSEA-3 and MYC levels // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 11. P. e78847.
- Ng K.M., Chan Y.C., Lee Y.K. et al. Cobalt chloride pretreatment promotes cardiac differentiation of human embryonic stem cells under atmospheric oxygen level // <https://home.liebertpub.com/cell>. 2011. V. 13. № 6. P. 527–537.
- Podkalicka P., Stępniewski J., Mucha O. et al. Hypoxia as a driving force of pluripotent stem cell reprogramming and differentiation to endothelial cells // *Biomolecules*. 2020. V. 10. № 12. P. 1–30.
- Salikhova D.I., Leonov G.E., Bukharova T.B. et al. Comparative analysis of the paracrine action of neuronal and glial progenitor cells derived from induced human pluripotent stem cells // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2020. V. 169. № 1. P. 176–181.
- Schödel J., Oikonomopoulos S., Ragoussis J. et al. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq // *Blood*. 2011. V. 117. № 23. P. e207–e217.
- Skuli N., Liu L., Runge A. et al. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) alters vascular function and tumor angiogenesis // *Blood*. 2009. V. 114. № 2. P. 469.
- Sperber H., Mathieu J., Wang Y. et al. The metabolome regulates the epigenetic landscape during naïve-to-primed human embryonic stem cell transition // *Nat. Cell Biol*. 2015. V. 17. № 12. P. 1523–1535.
- Sugimoto K., Matsuura T., Nakazono A. et al. Effects of hypoxia inducible factors on pluripotency in human iPS cells // *Microsc. Res. Tech*. 2018. V. 81. № 7. P. 749–754.
- Takashima Y., Guo G., Loos R. et al. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human // *Cell*. 2014. V. 158. № 6. P. 1254–1269.
- Theunissen T.W., Powell B.E., Wang H. et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naïve human pluripotency // *Cell Stem Cell*. 2014. V. 15. № 4. P. 471–487.
- Vaskova E.A., Medvedev S.P., Sorokina A.E. et al. Transcriptome characteristics and X-chromosome inactivation status in cultured rat pluripotent stem cells // *Stem Cells Dev*. 2015. V. 24. № 24. P. 2912–2924.
- Ware C.B., Nelson A.M., Mechem B. et al. Derivation of naïve human embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 12. P. 4484–4489.
- Zakharova I.S., Zhiven' M.K., Saaya S.B. et al. Endothelial and smooth muscle cells derived from human cardiac

- explants demonstrate angiogenic potential and suitable for design of cell-containing vascular grafts // *J. Transl. Med.* 2017. V. 15. № 1. P. 54.
- Zakharova I.S., Saaya S.B., Shevchenko A.I. et al. Mitomycin-treated endothelial and smooth muscle cells suitable for safe tissue engineering approaches // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. V. 10. P. 772981.
- Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A. et al. Induced pluripotent stem cell line ICGi036-A generated by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia caused due to compound heterozygous p.Ser177Leu/p.Cys352Arg mutations in LDLR // *Stem Cell Res.* 2022. V. 59. 102653.
- Zhdanov A.V., Okkelman I.A., Collins FW.J. et al. A novel effect of DMOG on cell metabolism: direct inhibition of mitochondrial function precedes HIF target gene expression // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1847. № 10. P. 1254–1266.
- Zudaire E., Gambardella L., Kurcz C., Vermeren S. A computational tool for quantitative analysis of vascular networks // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 11. P. e27385.

Chemokine CCL2 Activates Hypoxia Response Factors Regulating Pluripotency and Directed Endothelial Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells

A. I. Shevchenko¹, A. M. Arssan¹, S. M. Zakian¹, and I. S. Zakharova^{1, *}

¹The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: zakharova@bionet.nsc.ru

Human pluripotent stem cell (PSC) research is currently focused on selecting conditions and growth factors that better mimic preimplantation development and germ cell differentiation, which is important for disease modeling using PSC. Previously, it was shown that in the presence of the chemokine CCL2, human PSCs acquire properties attributable for preimplantation blastomeres, namely, they activate the JAK-STAT3 signaling pathway and increase the mRNA level of the hypoxic response genes. However, CCL2 is practically not used in the human PSCs cultivation, and its effect is described in a single study. We continued to study the CCL2 effect on human PSC and showed that human embryonic and induced pluripotent stem cells cultured with CCL2 have an increased protein level of the oxygen-dependent subunits HIF1A and HIF2A, which are necessary to trigger the hypoxic response, as well as elevated protein levels of the key pluripotency transcription factors OCT4, NANOG, KLF4, SOX2, and TFCEP2L1. In addition, the presence of CCL2 had a positive effect on directed endothelial differentiation, accelerating the maturation of progenitors and enhancing the angiogenic potential of differentiated derivatives.

Keywords: pluripotent stem cells, CCL2 chemokine, hypoxic response, directed endothelial differentiation

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ОСВЕЩЕНИЯ И КОРМЛЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА У СЕГОЛЕТКОВ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ

© 2023 г. М. В. Кузнецова^а, *, М. А. Родин^а, Н. С. Шульгина^а, М. Ю. Крупнова^а,
А. Е. Курицын^а, С. А. Мурзина^а, Н. Н. Немова^а

^аИнститут биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”,
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

*e-mail: kuznetsovamvi@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.10.2022 г.

После доработки 03.04.2023 г.

Принята к публикации 04.04.2023 г.

Исследовали влияние постоянного и естественного режимов освещения в сочетании с разными режимами кормления на активность ферментов энергетического и углеводного обмена в мышцах и печени сеголетков лосося, искусственно выращиваемых в аквакультуре в условиях южного региона России. Выявленные межгрупповые различия в активности исследуемых ферментов у сеголетков указывают на отличия в уровне энергетического обмена и использования углеводов в процессах синтеза АТФ и других путях биосинтеза в мышцах и печени в зависимости от условий освещения, в том числе в сочетании с режимом кормления. Высокий уровень аэробного обмена в мышцах и усиление использования углеводов в гликолизе в печени рыб у сеголетков лосося, выращенных при постоянном освещении, соответствовали их наибольшему среднему приросту массы. У особей из всех экспериментальных групп установлены изменения в активности исследуемых ферментов в зависимости от времени после начала эксперимента, свидетельствующие об увеличении уровней аэробного и анаэробного обмена в мышцах и гликолиза в печени, необходимых для осуществления процессов биосинтеза.

Ключевые слова: фотопериод, атлантический лосось, активность ферментов энергетического обмена

DOI: 10.31857/S0475145023020039, **EDN:** XEWVOW

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что свет — жизненно важный абиотический фактор, который оказывает существенное воздействие на развитие и рост рыб на протяжении всего их жизненного цикла. Прямо или косвенно он влияет на пищевое поведение, плавательную активность, обучение, миграцию и размножение рыб, а у лососевых так же и на наступление периода смолтификации, посредством влияния на эндогенные ритмы и уровни циркулирующих гормонов роста (Boeuf, Le Bail, 1999; Bjornsson et al., 2000; Taylor et al., 2006; Sonmez et al., 2009; Migaud et al., 2010). В аквакультуре удлинение светового дня используется для увеличения скорости роста рыб, что, в свою очередь, обусловлено адаптивными изменениями биохимического метаболизма.

Важным параметром оценки состояния организма на разных этапах индивидуального развития является энергетический обмен. Так, например, вклад в суммарное потребление энергии таких

процессов, как рост, дифференцировка и формирование значительно меняется на разных стадиях развития (Озернюк, 1985). Для оценки уровня энергетического метаболизма исследуют активность основных ферментов дыхательной цепи и гликолиза. Активность цитохром с оксидазы (ЦО) дыхательной цепи митохондрий используется при оценке уровня аэробного обмена в тканях (Gauthier et al., 2008). Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) в белых мышечных волокнах катализирует конечную реакцию анаэробного гликолиза, в связи с чем активность этого фермента указывает на уровень анаэробного обмена (Somero, Childress, 1980). Значения активности ферментов путей окисления глюкозы могут рассматриваться при характеристике уровня использования углеводов в биосинтезе и энергетическом метаболизме. Пируваткиназа (ПК) является ключевым ферментом гликолиза, катализирует реакцию превращения фосфоенолпирувата в пируват, и уровень ее активности харак-

Таблица 1. Средняя масса рыб, используемых для анализа

Группа	6 сентября		6 октября		9 ноября	
	масса	длина	масса	длина	масса	длина
Контроль			5.59 ± 0.30	8.01 ± 0.43	11.87 ± 1.74	10.88 ± 0.53
Опыт 1	3.85 ± 0.45	7.42 ± 0.27	5.92 ± 0.58	8.12 ± 0.23	9.19 ± 1.37	9.189 ± 0.47
Опыт 2			6.11 ± 0.91	8.05 ± 0.40	11.93 ± 1.33	10.13 ± 0.39

теризует интенсивность этого процесса. Альдолаза (фермент гликолиза) — катализирует образование дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата, которые впоследствии участвуют в процессах гликолиза, глюконеогенеза и образования липидов (Llewellyn, 1998). Фермент 1-глицерофосфатдегидрогеназа (1-ГФДГ) катализирует реакцию образования 1-глицерофосфата, который является предшественником структурных и запасных липидов. Фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ) — ключевой фермент пентозофосфатного пути окисления глюкозы (ПФП).

Ранее в исследованиях влияния фотопериода на искусственное выращивание молоди лосося в условиях северных широт (регион Белого моря), естественных для данного холодолюбивого вида было показано, что непрерывный свет (режим 24 свет: 0 темнота) способствовал ускорению роста особей, что сопровождалось изменением аэробного и анаэробного обмена в мышцах (Chugova et al., 2020). Следует отметить, что экологические условия южных регионов отличаются от северных широт по ряду факторов: световым режимом без периода “белых ночей”, гидрохимическими параметрами воды в виде высокого pH, значительной минерализацией, высокой степенью насыщения кислородом, высокой концентрацией микроэлементов и ионов металлов. При этом появляется возможность выращивания молоди лосося при температуре воды в диапазоне 8–18°C, в отсутствие зимних периодов низких температур, что позволяет рыбе питаться и расти круглый год. Исходя из этого, был поставлен эксперимент по влиянию постоянного освещения на рост и развитие сеголетков лосося *Salmo salar* L. (0+) в условиях аквакультуры в южном регионе России (Республика Северная Осетия-Алания). Целью данной работы было изучение изменений в активности ферментов энергетического и углеводного обмена в мышцах и печени сеголетков атлантического лосося в процессе роста и развития, выращиваемых в условиях постоянной температуры воды при воздействии двух режимов фотопериода (постоянного и естественного) в сочетании с разным режимом кормления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Описание эксперимента

Исследование влияния разных режимов освещения на рост и развитие сеголетков лосося про-

водили на предприятии ООО “Остров аквакультура” (Республика Северная Осетия-Алания).

Мальки лосося 0+ (выклев 10–15 марта 2022 г., (производитель Benchmark Genetics, Исландия)) с августа до начала эксперимента (сентябрь) содержались в выростных лотках размером 4 × 1.2 м, объемом 2.5–2.7 м³, (изначально в количестве 4900 особей/лоток) в условиях непрерывного освещения (24 свет: 0 темнота, 24C). Кормление проводилось в круглосуточном режиме каждые два часа. С начала сентября сеголетков разделили на три экспериментальных группы по 2 лотка (при средней массе рыб 2.9 грамма в каждом лотке):

— группа № 1 (контроль, 24C КК) — режим освещения постоянный (24C:0T), кормление круглосуточное (КК);

— группа № 2 (опыт № 1, ЕстФ КД) — экспериментальный — естественный фотопериод (ЕстФ), кормление в светлое время суток (с 06:00 до 18:00 в сентябре, с 08:00 до 18:00 в октябре, с 08:00 до 17:00 в ноябре) через каждые два часа (КД);

— группа № 3 (опыт № 2) — экспериментальный (24C КД), режим освещения постоянный (24C), кормление проводилось только в светлое время суток как у рыб из группы № 2 (КД).

Лотки с постоянным освещением были оборудованы светодиодными LED лампами (36W, 6500K). Освещение над поверхностью воды при освещении лампами в темное время суток составило 450–650 lx (для контроля и опыта № 2). Использовали коммерческий корм; расчет объема корма проводили согласно нормам возрастной группы и с учетом биомассы. Вода в лотки поступала из скважины со скоростью 2.7–3 л/с на лоток. Температура воды была постоянной — 12.5°C.

Взвешивание рыб проводили каждый месяц на предприятии (по 2 раза в месяц при трех повторных взвешиваниях по 50–100 особей вместе). Отход за весь период исследования составил 24, 33 и 19% особей в контроле (24C КК), опыте № 1 (ЕстФ КД) и опыте № 2 (24C КД) соответственно.

Для исследования отбирали сеголетков лосося 6 сентября (до эксперимента), 6 октября и 9 ноября; из каждой группы было взято до 15 особей из лотка. Средние масса и длина особей, взятых для анализа, представлены в табл. 1.

Таблица 2. Коэффициент корреляции активности ферментов в мышцах с массой и длиной особей

Показатель	Контроль		Опыт 1		Опыт 2	
	масса	длина	масса	длина	масса	длина
ЦО	0.25	0.06	0.25	0.06	0.75*	0.70*
ЛДГ	0.83*	0.79*	0.83*	0.79*	0.81*	0.80*
Альдолаза	0.64*	0.52*	0.64*	0.52	0.64*	0.61

* — достоверные значения коэффициента корреляции при $p < 0.05$.

Определение активности ферментов

Активность ферментов определяли в мышцах и печени спектрофотометрически (CLARIOSTAR, BMG Labtech). Образцы тканей гомогенизировали в 0.05 М Tris-HCl буфере (pH 7.5) на гомогенизаторе Tissue Lyser (Qiagen, Германия).

Активность ферментов энергетического и углеводного обмена в мышцах (ЦО, ЛДГ, альдолаза) и печени (ЦО, ЛДГ, ПК, Г-6-ФДГ, 1-ГФДГ, альдолаза) определяли индивидуально для каждой особи. Активность цитохром с оксидазы (ЦО, КФ 1.9.3.1) определяли по методу Смита (Smith, 1955), измеряя увеличение количества окисленного цитохрома с. Общую активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ, КФ 1.1.1.49) и 1-глицерофосфатдегидрогеназы (1-ГФДГ, КФ 1.1.1.8) определяли по общепринятым методикам, измеряя количества восстановленных НАД и НАДФ (Кочетов, 1980). Активность пируваткиназы (ПК, КФ 2.7.1.40) определяли в системе, содержащей НАДН и лактатдегидрогеназу по количеству образовавшегося НАД (Bücher, 1955). Активность альдолазы (КФ 4.1.2.13) определяли по методике Векс в модификации Ананьева и Обуховой (Колб, Камышников, 1976). Активность ферментов выражали в мкмоль субстрата (продукта)/мин/мг белка. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд (Bradford, 1976).

Статистический анализ полученных результатов проводили общепринятыми методами вариационной статистики (Ивантер, Коросов, 2010). Данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро—Уилкса. Многофакторный дисперсионный анализ MANOVA был применен для оценки степени влияния факторов (режим освещения, принадлежность к группе (режимы освещения и кормления) и дата отбора проб) на активность исследуемых ферментов. Для сравнения выборок по исследуемым показателям использовали тест Краскела—Уоллиса с последующим сравнением выборок с использованием критерия Манна—Уитни. Для изучения взаимосвязи между значениями активности ферментов и массой особей использовался корреляционный анализ Пирсона. Все результаты считались значимыми при $p < 0.05$. Все данные представлены как $M \pm SE$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность ферментов в мышцах сеголетков лосося

Согласно дисперсионному анализу, уровень активности всех исследуемых ферментов в мышцах зависел от режимов освещения и кормления (принадлежности к экспериментальной группе) и времени отбора проб. Активность ЦО в мышцах через месяц от начала исследования (в октябре) была ниже у особей в группе ЕстФ КД по сравнению с группой 24С КД и контролем (24С КК) ($p < 0.05$, рис. 1а), и в ноябре наблюдалась тенденция к более низким значениям активности ЦО у сеголетков лосося в группе с естественным освещением. В октябре уровень активности ЦО в мышцах рыб в группах с постоянным освещением увеличился по сравнению с предыдущим месяцем, а в группе с естественным освещением эти изменения обнаруживались только в ноябре (рис. 1а). Активность ЦО в мышцах сеголетков лосося из всех исследуемых групп увеличивалась от сентября к ноябрю (рис. 1а).

Самые низкие значения активности ЛДГ в мышцах рыб в ноябре были характерны для группы ЕстФ КД по сравнению с группами с постоянным освещением, при этом достоверные различия установлены с группой 24С КД ($p < 0.05$, рис. 1б). Активность ЛДГ повышалась во всех исследуемых группах сеголетков с каждым последующим месяцем (рис. 1б).

По уровню активности альдолазы в мышцах особей различия между группами были установлены в ноябре ($p < 0.05$, рис. 1в). При этом значения активности этого фермента у рыб в группе ЕстФ КД были самыми высокими, а в группе 24С КК — самыми низкими ($p < 0.05$). Значения активности альдолазы в мышцах особей постепенно увеличивались с каждым последующим месяцем во всех исследуемых группах сеголетков (рис. 1б, 1в).

Наблюдалась положительная корреляция активности ЦО с массой и длиной рыб (с достоверным значением для группы 24С КД ($p < 0.05$, табл. 2)). Установлена положительная корреляция уровня активности ЛДГ и альдолазы в мышцах с массой лосося во всех группах ($p < 0.05$, табл. 2).

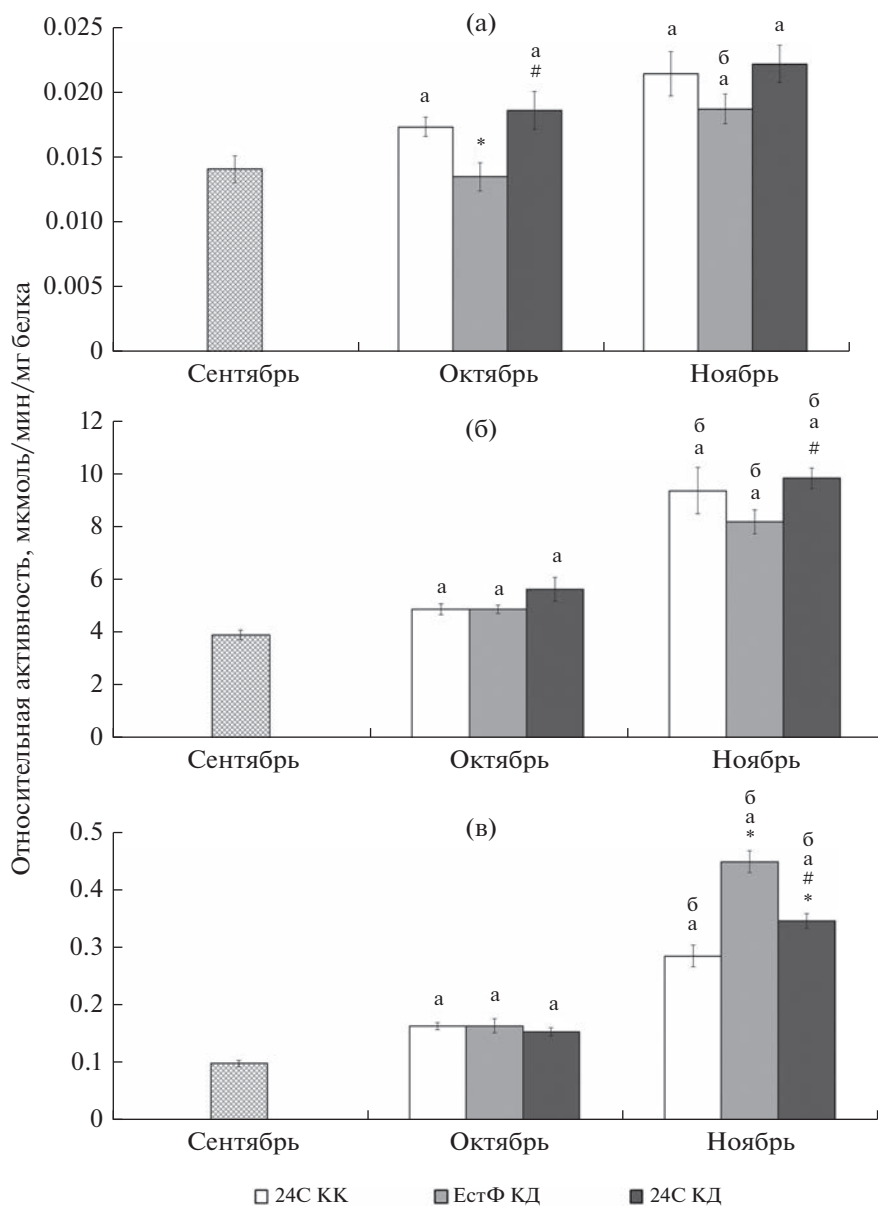


Рис. 1. Относительная активность ферментов в мышцах атлантического лосося *Salmo salar* в группах, выращиваемых с разными режимами освещения и кормления (24С КК – режим освещения постоянный, кормление круглосуточное; ЕстФ КД – естественный фотопериод, кормление в светлое время суток; 24С КД – режим освещения постоянный, кормление проводится только в светлое время суток): (а) цитохром с оксидаза, (б) лактатдегидрогеназа, (в) альдолаза. Различия достоверны при $p < 0.05$: * – по отношению к контролю, # – в сравнении с группой ЕстФ КД; а – по сравнению со значениями в сентябре, б – по сравнению со значениями в октябре в соответствующей группе.

Активность ферментов в печени сеголетков лосося

Активность всех исследуемых ферментов в печени рыб (кроме ЛДГ) зависела от месяца исследования. В ноябре активность ЦО в печени рыб в группе ЕстФ КД была выше, чем в группе 24С КД (рис. 2а). В октябре уровень активности ЦО в печени у рыб из групп ЕстФ КД и 24С КД снижался по сравнению с предыдущим месяцем (рис. 2а). У

рыб в группе с естественным освещением активность ЦО значительно повышалась в ноябре, тогда как в группе 24С КД оставалась на том же уровне (рис. 2а). Уровень активности ЦО в печени рыб в группе 24С КК не изменялся за период исследования.

На активность ПК оказывал влияние фактор принадлежности к исследуемой группе. Уже через месяц после начала эксперимента (в октябре)

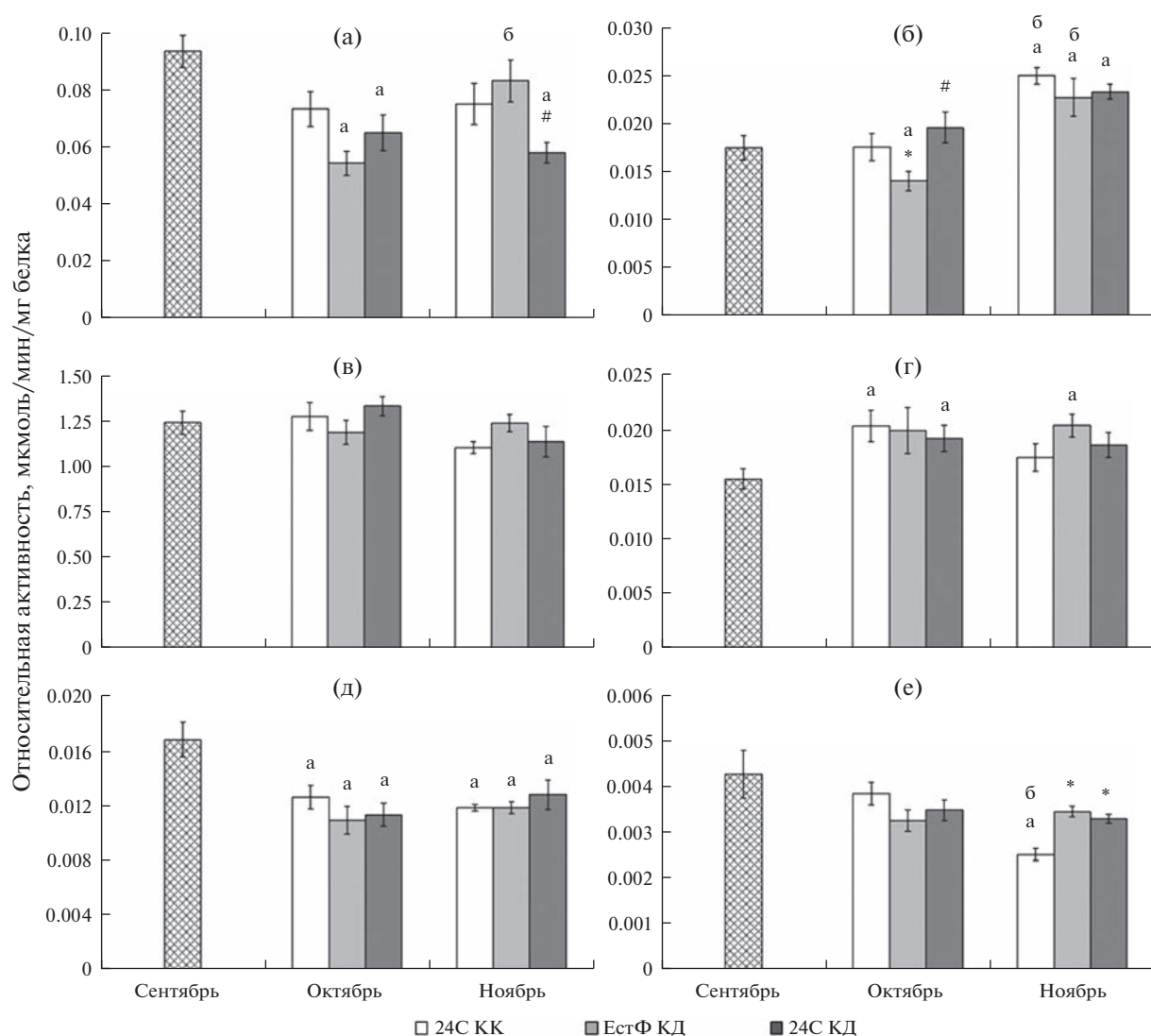


Рис. 2. Относительная активность ферментов в печени атлантического лосося *Salmo salar* в группах, выращиваемых с разными режимами освещения и кормления (24С КК – режим освещения постоянный, кормление круглосуточное; ЕстФ КД – естественный фотопериод, кормление в светлое время суток; 24С КД – режим освещения постоянный, кормление проводится только в светлое время суток): (а) цитохром с оксидаза, (б) пируваткиназа, (в) лактатдегидрогеназа, (г) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, (д) 1-глицерофосфатдегидрогеназа, (е) альдолаза. Различия достоверны при $p < 0.05$: * – по отношению к контролю, # – в сравнении с группой ЕстФ КД; а – по сравнению со значениями в сентябре, б – по сравнению со значениями в октябре в соответствующей группе.

активность ПК была ниже в печени сеголетков в группе ЕстФ КД по сравнению с рыбами из групп с постоянным освещением ($p < 0.05$, рис. 2б). В октябре уровень активности ПК у рыб в группе ЕстФ КД был ниже по сравнению с предыдущим месяцем. Уровень активности ПК в печени у сеголетков во всех группах увеличивался к ноябрю (рис. 2б).

Активность альдолазы была выше в печени молоди лосося в группах ЕстФ КД и 24С КД по сравнению с рыбами из группы 24С КК в ноябре ($p < 0.05$, рис. 2е). У особей, выращиваемых при постоянном режиме освещения и круглосуточном кормлении (24С КК), в ноябре уровень ак-

тивности альдолазы был ниже, чем в предыдущие месяцы ($p < 0.05$).

Межгрупповых различий по уровню активности ферментов 1-ГФДГ и Г-6-ФДГ в печени молоди рыб не обнаружено (рис. 2г, 2д), однако значения этих показателей у особей из всех исследуемых групп изменялись на протяжении эксперимента (сентябрь–ноябрь). Активность Г-6-ФДГ в печени повышалась в октябре и оставалась на тех же уровнях в ноябре ($p < 0.05$, рис. 2г). Уровень активности 1-ГФДГ в печени рыб во всех группах в октябре снижался по сравнению с таковым в сентябре и оставался на том же уровне в ноябре ($p < 0.05$, рис. 2д).

ОБСУЖДЕНИЕ

*Активность ферментов в мышцах
сеголетков лосося*

Согласно полученным данным, наибольший средний прирост массы на группу был установлен у сеголетков лосося, выращенных при постоянном освещении. За весь период исследования прирост составил 14.1 ± 0.1 , 12.2 ± 0.2 , 13.1 ± 0.2 г у рыб из групп 24С КК, ЕстФ КД и 24С КД соответственно. Ранее было высказано предположение (Wootton, 2011), что повышенные темпы роста рыб могут быть обусловлены рядом факторов: увеличением светлого периода времени, когда рыбы активно питаются, и изменениями в нейро-эндокринной регуляции процессов, стимулирующих аппетит и пищевое поведение особей, и влияющих на метаболизм таким образом, что энергетические ресурсы направляются преимущественно на прирост массы тела, а не на другие пути обмена (в частности, генеративного).

Показано, что уровень активности всех исследуемых ферментов в мышцах рыб изменялся в зависимости, как от используемых режимов освещения и кормления (принадлежность к экспериментальной группе), так и от времени отбора проб. Значения активности ЦО указывают на более высокий уровень аэробного обмена в мышцах особей из групп с постоянным освещением. Более того, уровень аэробного обмена в мышцах рыб в группах с постоянным освещением возрастал с каждым месяцем, а в группе с естественным освещением эти изменения обнаруживались только в ноябре. Имеются сведения о том, что свет может влиять на рост рыбы двумя способами: стимулируя кормовую активность и повышая эффективность конверсии поступающих питательных веществ (Boeuf, Le Bail, 1999; Biswas et al., 2005). Таким образом, возможно, что доступность корма и высокий уровень аэробного обмена позволяют рыбам, выращиваемым при постоянном освещении, использовать энергию не только для поддержания основного обмена веществ и физической активности, но и в процессах биосинтеза структурных и резервных соединений в мышцах, которые требуют большого количества АТФ. Эти результаты согласуются с данными, полученными для молоди лосося, выращиваемой в условиях постоянного освещения на Выгском рыбоводном заводе (район Белого моря) (Churova et al., 2020). Уровень аэробного обмена в мышцах сеголетков лосося из всех исследуемых групп был наиболее высоким в ноябре, и при этом наблюдалась положительная корреляция активности ЦО с массой и длиной рыб. Повышение активности ЦО также может быть связано с подготовкой молоди лосося к смолтификации (Churova et al., 2017). Так, определенные показатели липидного обмена, исследованные у сеголетков лосося в этом же эксперименте

(Мурзина и др., 2023), свидетельствовали об инициации процессов подготовки к смолтификации.

Низкий уровень анаэробного обмена, согласно данным по активности ЛДГ в мышцах рыб в ноябре, был характерен для группы ЕстФ КД. Ранее подобные результаты были получены для сеголетков лосося, выращиваемых в условиях Выгского рыбоводного завода (Churova et al., 2020), при этом масса рыб и уровень анаэробного обмена мышц были выше у рыб, взятых для биохимического анализа спустя месяц после включения постоянного освещения по сравнению с контрольной группой (без дополнительного освещения). Таким образом, высокий уровень анаэробного обмена мышц коррелировал с высокой скоростью роста рыб. Постоянное освещение могло косвенно повлиять на темпы прироста мышечной массы рыб посредством стимуляции их двигательной активности (Boeuf, Le Bail, 1999). Анаэробный гликолиз является основным механизмом, который обеспечивает энергией мышечные сокращения во время рывкового плавания. Повышение активности ЛДГ у мальков лосося связано с необходимостью обеспечения энергетических потребностей работающих мышц при движении рыбы против течения во время двигательной пищевой активности. Положительная корреляция между активностью изофермента ЛДГ-А4 в мышцах и увеличением мышечной массы (Ahmad, Hasnain, 2005), а также между общей активностью ЛДГ и скоростью плавания (Guderley, 2004) была показана для некоторых видов рыб.

Положительная корреляция уровня активности ЛДГ в мышцах с массой лосося во всех группах, вероятно, связана с возрастающей потребностью в энергетическом обеспечении процессов роста рыб по мере увеличения их массы и плавательной активности. Согласно результатам исследований, проведенных на пятнистой зубатке (Imslund et al., 2006), атлантической треске (Couture et al., 1998; Koedijk et al., 2010), молоди сайды (Mathers et al., 1992), радужной форели (Чурова и др., 2010) и личинках лосося (Чурова и др., 2015), активность ЛДГ в белых мышцах рыб положительно коррелирует с темпами их роста, а также с массой и длиной тела.

Альдолаза в мышцах характеризует уровень использования углеводов в гликолизе (Llewellyn et al., 1998) и в последующем аэробном и анаэробном синтезе АТФ. Значения активности этого фермента в ноябре у рыб в группе ЕстФ КД были самыми высокими, а в группе 24С КК — самыми низкими. Можно предположить, что у рыб из группы с естественным освещением в энергетическом обмене преимущественно используются углеводы, в то время как у рыб из группы 24С КК для этих целей могут расходоваться и другие субстраты. Так, согласно исследованию (Мурзина

и др., 2023) в рамках обсуждаемого эксперимента было установлено, что значение соотношения энергетических липидов к структурным – ТАГ/ФЛ достоверно ниже у сеголетков из “контроля” (24С КК), что указывает на усиление энергетического обмена и на участие именно запасных липидов в поддержании энергетических потребностей организма в этот период.

Динамика изменений активности ЛДГ и альдолазы за период исследования и положительная корреляция этих показателей с массой рыб может указывать на увеличение использования углеводов в анаэробном гликолизе по мере того, как рыба набирает вес, что достигается за счет повышения пищевой активности сеголетков, содержащихся при постоянном освещении (Boeuf, Le Bail, 1999).

В нашем раннем исследовании влияния световых режимов на рост сеголетков лосося в условиях естественного колебания температур в северном регионе (Chugova et al., 2020) активность альдолазы в мышцах была выше у особей в группе, содержащейся при постоянном освещении в период с сентября до конца октября. Вероятно, в условиях уменьшения светового дня осенью, дополнительное освещение позволяло рыбам лучше видеть корм и активнее питаться по сравнению с молодь, выращиваемой при других режимах освещения. Следует отметить, что по сравнению с данными настоящего исследования, активность альдолазы во всех группах молоди лосося, выращиваемой на Выгском рыбзаводе (регион Белого моря), снизилась к концу октября, что, очевидно, связано со снижением кормовой активности и уменьшением количества подаваемого корма при снижении температуры воды. Условия постоянных температур в южном регионе (Северная Осетия-Алания) позволяют сеголеткам продолжать активно питаться и расти в осенний период.

Активность ферментов в печени сеголетков лосося

Установлено, что активность всех исследуемых ферментов в печени рыб (кроме ЛДГ) изменялась в зависимости от месяца исследования, а на активность ПК оказывал влияние также и фактор принадлежности к исследуемой группе. Уже через месяц после начала эксперимента (в октябре) в печени сеголетков в группе ЕстФ КД активность ПК была самой низкой по значению, а также наблюдалась тенденция к сравнительно более низкому уровню ЦО, что также согласовывалось с низкой активностью этого фермента в мышцах. Можно сделать предположение, что у сеголетков при естественном освещении ниже интенсивность образования пирувата и использования его в аэробном синтезе АТФ. Такие различия в активности ПК наблюдались только в первый месяц исследования. Согласно данным Метон с коллегами (Meton et al.,

1999), уровень активности ПК в печени отражает условия кормления, в частности, он снижается во время голодания рыб. Возможно, что в результате введения новых условий выращивания, связанных с ограничением времени освещения и изменением режима кормления (только в светлое время), у сеголетков из группы ЕстФ КД в последующем произошла перестройка метаболизма, что могло привести к снижению интенсивности питания. Свет является для лосося обязательным условием для питания, он необходим для поиска пищи. Вероятно, что, когда количество естественного света уменьшается, молодь, выращиваемая при введении в технологический цикл дополнительного постоянного освещения, получает достаточное количество корма. Имеются сведения о том, что увеличение продолжительности светового дня вызывает повышение уровня гормона роста (соматотропина) у атлантического лосося (Bjornsson et al., 1989), что, в свою очередь, повышает плавательную активность и аппетит рыб и стимулирует их пищевую активность.

Уровень аэробного обмена в печени рыб в группе ЕстФ КД повышался к ноябрю и был выше, чем в группе 24С КД. Следует отметить, что уровень активности ПК в печени у сеголетков во всех группах увеличивался к ноябрю (рис. 26). При этом у особей в группе ЕстФ КД, активность ПК увеличивалась вместе с активностью ЦО, что говорит об усилении интенсивности аэробного пути гликолиза. У особей в группе 24С КК, так же, как и в группе 24С КД, уровень активности ПК к ноябрю повышался, а уровень активности ЦО не изменялся. Это позволяет предположить, что повышается интенсивность образования пирувата, который может использоваться как в аэробном синтезе АТФ, так и в качестве предшественника для синтеза жирных кислот (Meton et al., 1999). На это указывают и данные аналогичного эксперимента (Мурзина и др., 2023), показавшие увеличение у сеголетков к ноябрю содержания некоторых классов жирных кислот, в том числе свидетельствующих о начале подготовки лососей к смолтификации.

Особь, выращиваемые при постоянном режиме освещения и круглосуточном кормлении (24С КК), ко второму месяцу исследования отличались от таковых из других групп более низким уровнем альдолазы в печени, а также в мышцах, что, как известно (Llewellyn et al., 1998), указывает на снижение уровня использования углеводов в энергообеспечении мышц и интенсивности глюконеогенеза в печени.

Значения активности ферментов 1-ГФДГ и Г-6-ФДГ из всех исследуемых групп изменялись на протяжении эксперимента (сентябрь–ноябрь). Г-6-ФДГ является ключевым ферментом пентозофосфатного пути, в котором происходит

образование пентоз и генерируется восстановитель в форме НАДФН, использующийся в реакциях биосинтеза жирных кислот, холестерина (Tian et al., 1998). Повышение активности Г-6-ФДГ в печени лососей в октябре может свидетельствовать о том, что глюкоза используется в ПФП и дальнейших путях биосинтеза, в частности в процессах синтеза жирных кислот (Meton et al., 1998; Gauthier et al., 2008). Роль 1-ГФДГ в печени связана главным образом с процессом образования глицерофосфата из углеводов, который используется для синтеза структурных и запасных липидов (Hartman, Sheridan, 1992; Treberg et al., 2002). Уровень активности 1-ГФДГ в печени рыб во всех группах в ноябре и октябре был ниже, чем в сентябре. Поэтому можно предположить снижение уровня использования продуктов распада углеводов в липидном обмене у исследуемых особей на протяжении эксперимента по сравнению с первоначальными значениями в сентябре. Эти результаты согласуются со снижением содержания общих липидов и основных липидных классов у сеголетков лосося в аналогичном эксперименте (Мурзина и др., 2023).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования указывают на то, что постоянное освещение оказывало положительное влияние на прирост массы сеголетков лосося в процессе развития, что согласовывалось с повышением уровня аэробного обмена в мышцах и усилением использования углеводов в гликолизе в печени рыб. Порядок кормления, как самостоятельный фактор, не повлиял на активность ферментов. Однако сочетания различных режимов освещения и кормления оказали влияние на характер использования субстратов в энергетическом обмене в мышцах и печени. Установлена положительная динамика активности ЦО и ЛДГ в мышцах и ПК в печени сеголетков лососей из всех исследуемых групп в процессе роста и развития с сентября по октябрь, свидетельствующая об увеличении уровней аэробного и анаэробного обмена в мышцах и гликолиза в печени, необходимых для осуществления процессов биосинтеза, способствующих росту особей и, возможно, подготовке к смолтификации.

Представленные в настоящей работе результаты дополняют сведения о роли факторов среды в реализации биохимических адаптаций у молоди лососевых рыб в условиях аквакультуры с учетом климатических и экологических особенностей региона.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубочайшую благодарность главному рыбоводу предприятия М. Горбунову за курирование эксперимента, проведение необходимых

рыбохозяйственных мероприятий, сбор биоматериала, компетентные консультации и рекомендации в ходе реализации исследования. Исследование было выполнено на научном оборудовании ЦКП КарНЦ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа проведена при финансовой поддержке проекта Российского научного фонда № 19-14-00081-П “Влияние физических факторов на эффективность искусственного (заводского) воспроизводства молоди атлантического лосося *Salmo salar*: физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

М.В. Кузнецова — обсуждение результатов исследования, написание и подготовка публикации; М.А. Родин, сбор биологического материала в ходе экспедиции, пробоподготовка и проведение лабораторного анализа образцов, анализ и статистическая обработка полученных данных, подготовка публикации; М.Ю. Крупнова, пробоподготовка и проведение лабораторного анализа образцов; Н.С. Шульгина обсуждение результатов исследования; подготовка публикации; А.Е. Курицын — постановка и ведение эксперимента, обсуждение результатов исследования, подготовка публикации; С.А. Мурзина — обсуждение результатов исследования, подготовка публикации, Н.Н. Немова — руководитель проекта, обсуждение результатов исследования, подготовка публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ивантер Э.В., Коросов А.В. Элементарная биометрия. Петрозаводск, 2010. 104 с.
- Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.
- Мурзина С.А., Провоторов Д.С., Воронин В.П., Кузнецова М.В., Курицын А.Е., Немова Н.Н. Показатели липидного обмена у сеголетков атлантического лосося *Salmo salar*, выращиваемых в условиях аквакультуры в Южном Регионе РФ при дифференциальных режимах освещения и кормления // Известия РАН. Сер. Биол. 2023. № 2.
- Озернюк Н.Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. М.: Наука, 1985. 175 с.

- Чурова М.В., Мецзякова О.В., Немова Н.Н. Взаимосвязь линейно-весовых характеристик с активностью некоторых ферментов и молекулярно-генетическими показателями в белых мышцах сигов разных возрастных групп из озера Каменное (Республика Карелия) // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 2010. С. 304–311.
- Чурова М.В., Мецзякова О.В., Веселов А.Е., Немова Н.Н. Активность ферментов энергетического и углеводного обмена и уровень некоторых молекулярно-генетических показателей у молоди лосося (*Salmo salar* L.), различающейся возрастом и массой // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 5. С. 304–312.
- Ahmad R., Hasnain A.U. Ontogenetic changes and developmental adjustments in lactate dehydrogenase isozymes of an obligate air-breathing fish *Channa punctatus* during deprivation of air access // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2005. V. 140. № 2. P. 271–278.
- Biswas A.K., Seoka M., Inoue Y., Takii K., Kumai H. Photoperiod influences the growth, food intake, feed efficiency and digestibility of red sea bream (*Pagrus major*) // Aquaculture. 2005. V. 250. № 3–4. P. 666–673.
- Björnsson B.T. et al. Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels, growth, condition factor and hypothyroidism ability of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation // Aquaculture. 1989. V. 82. № 1–4. P. 77–91.
- Björnsson B.T., Hemre G.I., Bjørnevik M., Hansen T. Photoperiod regulation of plasma growth hormone levels during induced smoltification of underyearling Atlantic salmon // General and Comparative Endocrinology. 2000. V. 119. № 1. P. 17–25.
- Boeuf G., Le Bail P.Y. Does light have an influence on fish growth? // Aquaculture. 1999. V. 177. № 1–4. P. 129–152.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
- Bücher T., Pfeleiderer G. Pyruvate kinase from muscle // Methods in Enzymology. 1955. V. I. P. 345–440.
- Churova M.V., Meshcheryakova O.V., Veselov A.E., Efremov D.A., Nemova N.N. Activity of metabolic enzymes and muscle-specific gene expression in parr and smolts Atlantic salmon *Salmo salar* L. of different age groups // Fish Physiology and Biochemistry. 2017a. V. 43. № 4. P. 1117–1130.
- Churova M.V., Shulgina N., Kuritsyn A., Krupnova M.Y., Nemova N.N. Muscle-specific gene expression and metabolic enzyme activities in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fry reared under different photoperiod regimes // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2020. V. 239. P. 110330.
- Couture P., Dutil J.D., Guderley H. Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland // Canadian J. Fisheries and Aquatic Sciences. 1988. V. 55. № 7. P. 1591–1598.
- Gauthier C., Campbell P., Couture P. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*) // Comparative Biochemistry and Physiology: Part A. 2008. V. 151. P. 526–532.
- Guderley H. Locomotor performance and muscle metabolic capacities: impact of temperature and energetic status // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2004. V. 139. № 3. P. 371–382.
- Harmon J.S., Sheridan M.A. Glucose-stimulated lipolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver // J. Fish Physiol. and Biochem. 1992. V. 10. P. 189–199.
- Imsland A.K., Le Francois N.R., Lammare S.G., Ditlecadet D., Sigurosson S., Foss A. Myosin expression levels and enzyme activity in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor*) muscle: a method for monitoring growth rates // Can J. Fish Aquat. Sci. 2006. V. 63. P. 1959–1967.
- Koedijk R.M., Le François N.R., Blier P.U., Foss A., Folkvord A., Ditlecadet D., Lammare S.G., Stefánsson S.O., Imsland A.K. Ontogenetic effects of diet during early development on growth performance, myosin mRNA expression and metabolic enzyme activity in Atlantic cod juveniles reared at different salinities // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. 2010. V. 156. № 1. P. 102–109.
- Llewellyn L., Sweeney G.E., Ramsurn V.P., Rogers S.A., Wigham T. Cloning and unusual expression profile of the aldolase B gene from Atlantic salmon // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression. 1998. V. 1443(3). P. 375–380.
- Mathers E.M., Houlihan D.F., Cunningham M.J. Nucleic acid concentrations and enzyme activities as correlates of growth rate of the saithe *Pollachius virens*: growth-rate estimates of open-sea fish // Marine Biology. 1992. V. 112. P. 363–369.
- Metón I., Mediavilla D., Caseras A., Cantó E., Fernández F., Baanante I.V. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis–gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) // British J. Nutrition. 1999. V. 82. № 3. P. 223–232.
- Migaud H., Davie A., Taylor J.F. Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species // J. Fish Biol. 2010. V. 76. № 1. P. 27–68.
- Smith L. Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase // Methods in Biochem Analysis. 1995. V. 2. P. 427–434.
- Somero G.N., Childress J.J. A violation of the metabolism-size scaling paradigm: activities of glycolytic enzymes in muscle increase in larger size fish // Physiol. Zool. 1980. V. 53. № 3. P. 322–337.
- Sonmez A.Y., Hisar O., Hisar S.A., Alak G., Aras M.S., Yanik T. The effects of different photoperiod regimes on growth, feed conversion rate and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry // J. Anim. Vet. Adv. 2009. V. 8. P. 760–763.
- Taylor J.F., North B.P., Porter M.J.R., Bromage N.R., Migaud H. Photoperiod can be used to enhance growth and improve feeding efficiency in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // Aquaculture. 2006. V. 256. № 1–4. P. 216–234.
- Tian W.N., Braunstein L.D., Pang J., Stuhlmeier K.M., Xi Q.C., Tian X., Stanton R.C. Importance of glucose-6-phos-

- phate dehydrogenase activity for cell growth // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 10609–10617.
- Treberg J.R., Lewis J.M., Driedzic W.R. Comparison of liver enzymes in osmerid fishes: key differences between a glycerol accumulating species, rainbow smelt (*Osmerus mordax*), and a species that does not accumulate glycerol, capelin (*Mallotus villosus*) // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 2002. V. 132. P. 433–438.
- Wootton R.J. Growth: environmental effects // Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment / Ed. Farrell A.P. San Diego: Academic Press, 2011. V. 3. P. 1629–1632.

The Influence of Different Lighting and Feeding Regime on the Activity of Energy Metabolism Enzymes in Farmed Atlantic Salmon Fingerlings

M. V. Kuznetsova^{1, *}, M. A. Rodin¹, N. S. Shulgina¹, M. Yu. Krupnova¹,
A. E. Kuritsyn¹, S. A. Murzina¹, and N. N. Nemova¹

¹*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

**e-mail: kuznetsovamvi@yandex.ru*

The effect of constant and natural lighting modes in combination with different feeding regimes on the activity of energy and carbohydrate metabolism enzymes in the muscles and liver of salmon under-yearlings artificially grown in aquaculture in the southern region of Russia was investigated. The revealed differences in the activity of the studied enzymes in under-yearlings indicate changes in the level of energy metabolism and the use of carbohydrates in the processes of ATP synthesis and other biosynthesis pathways in muscles and liver, depending on lighting conditions and in combination with the feeding regime. The high level of aerobic metabolism in the muscles and the increased use of carbohydrates in glycolysis in the liver in salmon fingerlings raised under constant light corresponded to their highest average weight gain. In individuals from all experimental groups, changes in the activity of the studied enzymes were found in dependence on the time after the start of the experiment, that indicated an increase in the levels of aerobic and anaerobic metabolism in muscles and glycolysis in the liver, necessary for the biosynthesis processes during growth.

Keywords: photoperiod, Atlantic salmon, activity of enzymes of energy metabolism

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 577.16

Данные были представлены на Юбилейной научной конференции
“Николай Константинович Кольцов и биология XXI века”,
3–8 октября 2022 г., Москва, Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН

РАЗВИТИЕ ИДЕИ Н.К. КОЛЬЦОВА О ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МЕЖДИСКОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2023 г. И. Ф. Жимулев^{а,*}, Т. Ю. Ватолина^а, В. Г. Левицкий^б,
Т. Д. Колесникова^а, А. В. Цуканов^б

^аИнститут молекулярной и клеточной биологии СО РАН, просп. ак. Лаврентьева, 8/2, Новосибирск, 630090 Россия

^бИнститут цитологии и генетики СО РАН, просп. ак. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: zhimulev@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.12.2022 г.

После доработки 24.03.2023 г.

Принята к публикации 04.04.2023 г.

В работе впервые исследовали организацию промоторов генов развития и генов, необходимых для обще клеточных функций — “домашнего хозяйства” клетки в полном геноме *Drosophila melanogaster*. С помощью биоинформатических методов показано, что гены, промоторы которых расположены в междисках политенных хромосом, обогащены функциями, связанными с обще клеточными процессами, тогда как остальная часть генов (примерно половина генома *Drosophila*) связана с узкоспециализированными процессами, происходящими в ходе развития. В промоторной зоне генов “домашнего хозяйства” обнаружено четыре специфических мотива, которые могут присутствовать у разных генов индивидуально или в различных комбинациях. Существенная часть междисковых промоторов не содержит выявленных мотивов. Анализ, проведенный с помощью Gene Ontology, показал, что для отдельных групп междисковых генов, содержащих в промоторах один мотив или их комбинации, характерно выполнение определенных функций.

Ключевые слова: гены развития, гены “домашнего хозяйства”, промоторы генов, мотивы нуклеотидов в промоторах, междиски, диски, политенные хромосомы, *Drosophila melanogaster*

DOI: 10.31857/S0475145023020064, **EDN:** XFKXAP

ВВЕДЕНИЕ

Вскоре после открытия политенных хромосом в 1934 г. началась бурное обсуждение их структуры и генетической организации, и Н.К. Кольцов (Koltzoff, 1934) сделал ряд предположений, которые привлекли внимание исследователей. Он первым высказал гипотезу о том, что хромосомы этого типа состоят из многих нитей, т.е. они многонитчатые (или политенные), кроме того, он предположил, что гены находятся в междисках политенных хромосом. После этого проблемы генетической организации интерфазных хромосом оказались в центре внимания многих генетиков на долгие годы. Высказывали многочисленные гипотезы, из которых хотелось бы упомянуть три: (Crick, 1971; Paul, 1972; Zhimulev, Belyaeva, 1975). В первых двух авторы предположили, что каждый ген занимает диск и соседний с ним междиск, авторы третьей предположили, что гены домашнего

хозяйства и гены развития занимают соответственно междиски и разные типы дисков.

Ранее нами был предложен метод одновременной локализации дисков и междисков на физической карте ДНК и на цитологической карте, что позволило совместить расположение генов разных типов на хромосомах и карте ДНК. На следующем этапе, используя различия в спектрах белков и модификаций гистонов в участках локализации генов разных типов, разработали математическую модель организации хроматина (4НММ) (Zhimulev et al., 2014). С помощью этой модели весь хроматин в интерфазных ядрах клеток дрозофилы был разделен на четыре состояния (названы, как принято по названию оптического цвета — аквамарин, лазурит малахит, рубин). Каждый цвет соответствует степени деконденсации хроматина и открытости его для транскрипции. Самый деконденсированный — аквамарин, самый конденса-

рованный — рубин, соответствуют междискам и черным дискам соответственно, лазурит — это серые разрыхленные диски (Zykova et al., 2018). Благодаря этой модели все гены генома дрозофилы были распределены в две группы — 6562 гена домашнего хозяйства (в литературе также используется термин “гены с повсеместной активностью”), промоторы которых расположены в участках хроматина типа аквамарин (междиски политенных интерфазных хромосом), а тело гена (экзоны и интроны) — в хроматине лазурит (в серых дисках политенных хромосом). Оставшиеся 5664 гена развития расположены в остальной части генома.

В области исследований организации промоторов у генов высших Metazoa достигнуты огромные успехи. Сейчас хорошо известно, что в окрестностях точки инициации транскрипции — Inr, ниже и выше на 100–200 пар нуклеотидов, располагаются специфические мотивы (короткие специфические для различных функции последовательности нуклеотидов), совершенно необходимые для инициации и продолжения транскрипции (Lenhard et al., 2012; Danino et al., 2015; Anderson, Sandelin, 2020; Ramalingam et al., 2021). Тем не менее в понимании структуры промоторов все-таки довольно много неизученного. Во-первых, до сих пор нет исследований полногеномной организации промоторов у генов развития и “домашнего хозяйства”, поскольку до сих пор не было метода, позволяющего разделить эти группы генов, во-вторых, нет четкого полногеномного разделения на гены “домашнего хозяйства” и гены развития, несмотря на то, что сведения об этом уже накапливаются и показано, что промоторы этих групп генов могут различаться. В данной работе мы попытались найти наиболее важные закономерности в организации мотивов в промоторах генов “домашнего хозяйства” и генах развития в полном геноме дрозофилы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мы проанализировали 13 574 белок-кодирующих гена *Drosophila melanogaster* из базы данных FlyBase (R 5.57). В анализ были взяты 5'-области генов от –300 до +200 п.н. относительно сайтов начала транскрипции и полностью картированные в доменах состояний хроматина аквамарин, лазурит, малахит и рубин, как описано ранее (Levitsky et al., 2020). Из анализа были удалены все околомоторные участки, которые имели кодирующие последовательности в пределах анализируемой области. Таким образом, набор околомоторных участков соответствовал 6562, 874, 1628 и 3162 генам аквамарин, лазурит, малахит и рубин соответственно. Мы применили инструмент STREME для *de novo* поиска мотивов в околомоторных участках для каждого состояния хроматина в трех тестах, относительно либо других состояний хроматина, либо набора последовательностей,

содержащего случайные геномные локусы. Мы применили поправку Бонферрони к обогащенным мотивам: значение $p/N < 0.05$, где p означает статистическую значимость мотива, а N обозначает количество мотивов, найденных STREME (<https://meme-suite.org/meme/doc/streme.html>). Использовали инструмент TOMTOM (<https://meme-suite.org/meme/tools/tomtom>) для сравнения обогащенных мотивов с мотивами для известных факторов транскрипции из баз данных CISBP (<http://cisbp.ccb.utoronto.ca/>) и JASPAR (<https://jaspar.uio.no/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Воспользовавшись данными модели 4НММ, мы отобрали гены “домашнего хозяйства” и гены развития в полном геноме дрозофилы и затем обработали последовательности нуклеотидов в промоторах обеих групп генов с помощью инструмента STREME (Sensitive, Thorough, Rapid, Enriched Motif Elicitation). Эта программа позволяет выявлять *de novo* обогащение мотивами в определенных районах генома. Изучены околомоторные участки (от –300 до +200 п.н. вокруг точки инициации транскрипции) у 6562 генов из аквамарин хроматина при сравнении их с последовательностями генов контрастного состояния — рубин (3162 генов), а также против генов полного генома дрозофилы и против суммы генов в трех состояниях, исключая аквамарин (5664 гена). Наши результаты показали, что можно выделить достаточно много мотивов, по которым различаются промоторы генов, локализованных в разных состояниях хроматина. Поэтому для ужесточения степени достоверности оценок из этих значений отобрали только те, которые удовлетворяют следующим дополнительным критериям: максимально низкое значение *E-value*, максимальное обогащение по сравнению с фоном, наличие сведений в других базах данных, а также воспроизводимость в разных вариантах сравнений. Оказалось, что этим критериям удовлетворяют только четыре мотива: M1BP (fd19B), BEAF-32 (pnr, DREF), scr (sna, sage, grh), kni (CG7928, slbo) (рис. 1а). Локализация этих мотивов в остальных хроматинах, помимо аквамарина, показана на уровне оси абсцисс (рис. 1а).

Аналогичная работа была проведена для сравнений генов в максимально контрастном состоянии рубин (данные не приводятся). Выявлен один наиболее устойчивый мотив — ТАТА-бокс.

Оказалось, что среди промоторов генов домашнего хозяйства у дрозофилы возможны разнообразные комбинации мотивов. Кроме того, 33% генов этого типа вообще не имеют ни одного из этих мотивов (рис. 1б). Аналогичная работа была проведена для анализа промоторов генов развития, имеющих только очень специфический

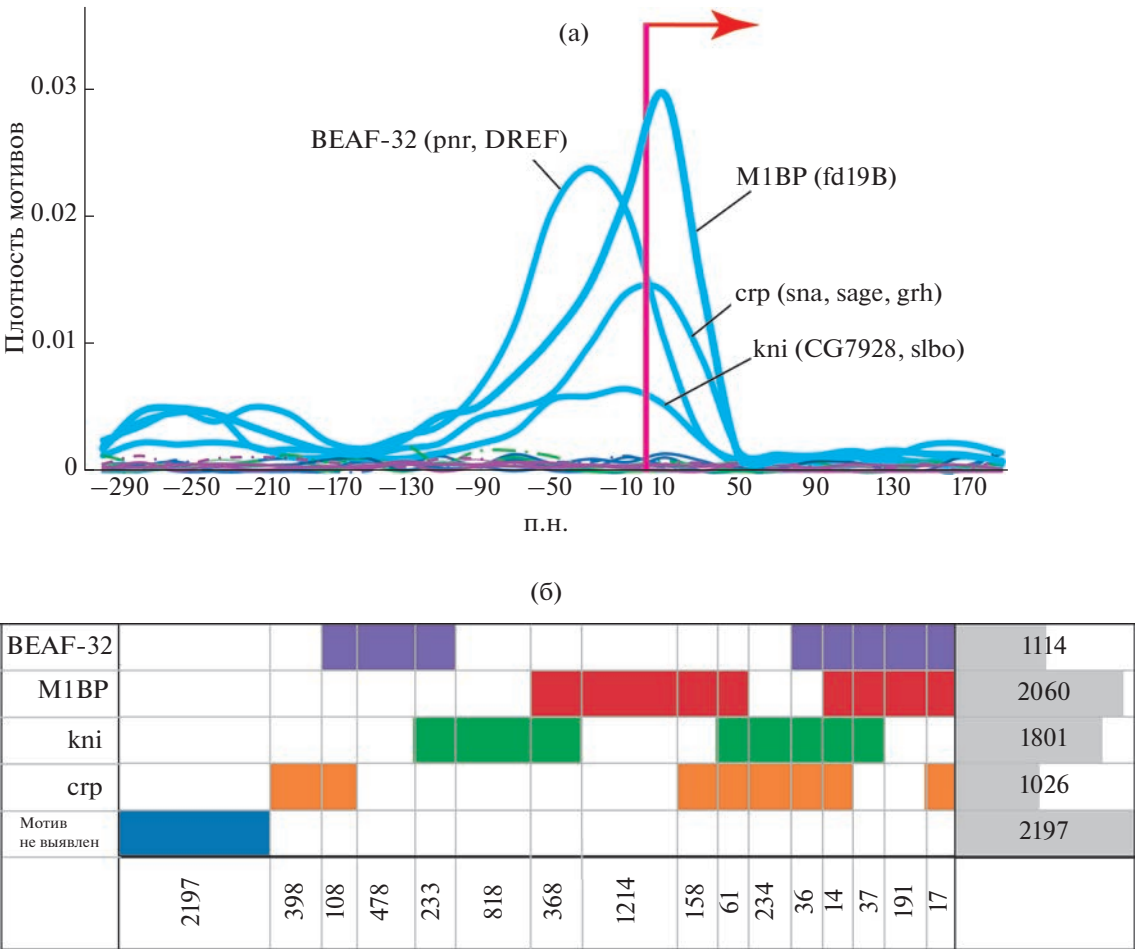


Рис. 1. Характеристики промоторных участков 6562 генов домашнего хозяйства дрозофилы. (а) Суммарная локализация мотивов относительно точки инициации транскрипции (красная стрелка). По оси абсцисс показано расстояние до точки инициации транскрипции, по оси ординат частота локализации мотива в данной координате околопромоторного участка. Приведены наиболее употребительные названия мотива, а в скобках указаны названия, которые встречаются в других статьях/базах данных. Изученные мотивы присутствуют только в промоторных участках хроматина аквамарин (голубая линия), все остальные промоторные области не содержат этих мотивов (зеленая, синяя, фиолетовая линии на уровне нулевого значения по оси абсцисс). (б) Числа генов домашнего хозяйства, имеющих только один мотив (вертикальная колонка цифр справа) или комбинации мотивов (горизонтальная последовательность цифр внизу). Прямоугольниками разных цветов обозначено наличие изучаемого мотива (отсутствие цвета в клетке обозначает отсутствие мотива в данном наборе генов) генов).

мотив – ТАТА-бокс (данные не приводятся). Мотивы Mes2, GAGA, ttk обладают меньшей специфичностью. Также обнаружено, что около 50% генов развития не имеют ни ТАТА, ни каких-либо других из найденных мотивов. В аналогичном сравнении локализации мотивов у генов развития максимальная специфика обнаружена только для ТАТА-бокса в положении от –75 до –25 п.н. от точки инициации транскрипции. Анализ, проведенный с помощью Gene Ontology, показал, что для отдельных групп междисковых генов, содержащих в промоторах один мотив или их комбинации, характерно выполнение определенных функций.

Таким образом впервые описаны специфические мотивы в промоторах генов двух разных типов на уровне всего генома и показано, что наборы мо-

тивов у генов “домашнего хозяйства” и генов развития совершенно разные, а наиболее известные мотивы не являются универсальными.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования “Молекулярная и клеточная биология” при ИМКБ СО РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке раздела Государственного задания ИМКБ РАН № FWGZ-2021-0014 (полногеномный анализ, Gene Ontology анализ) и грантов РНФ № 19-14-00051-П

(обработка данных по локализации мотивов) и РНФ № 21-14-00240 (поиск мотивов).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования манипуляции с экспериментальными животными не проводились.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

И.Ф. Жимулев выполнял основную работу, инициировал проведение исследований, участвовал в написании статьи, В.Г. Левицкий, А.В. Цуканов планировал и выполняли компьютерные операции, анализировали результаты и участвовали в написании текста статьи, Т.Ю. Ватолина обрабатывала результаты компьютерных операций, участвовала в планировании исследования, обсуждении результатов и написании статьи, Т.Д. Колесникова участвовала в написании текста статьи и обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Andersson R., Sandelin A. Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements // *Nat. Rev. Genet.* 2020. V. 21. P. 71–87.
Crick F. General model for the chromosomes of higher organisms // *Nature.* 1971. V. 234. P. 25–27.

Danino Y.M., Even D., Ideses D. et al. The core promoter: At the heart of gene expression // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1849(8). P. 1116–1131.

Koltzoff N.K. The structure of the chromosomes in the salivary glands of *Drosophila* // *Science.* 1934. V. 60. P. 312–313.

Lenhard B., Sandelin A., Carninci P. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13(4). P. 233–245.

Levitsky V.G., Zykova T.Yu., Moshkin Y.M., Zhimulev I.F. Nucleosome positioning around transcription start site correlates with gene expression only for active chromatin state in *Drosophila* interphase chromosomes // *International J. Molecular Sciences.* 2020. V. 21(23). P. 9282.

Paul J. General theory of chromosomes structures and gene activation in eukaryotes // *Nature.* 1972. V. 238. P. 444–446.

Ramalingam V., Natarajan M., Johnston J. et al. TATA and paused promoters active in differentiated tissues have distinct expression characteristics // *Mol. Syst. Biol.* 2021. V. 17. P. e9866.

Zhimulev I.F., Belyaeva E.S. Proposals to the problem of structural and functional organization of polytene chromosomes // *Theor. Appl. Genet.* 1975. V. 45(8). P. 335–340.

Zhimulev I.F., Zykova T.Yu., Goncharov F.P. et al. Genetic organization of polytene chromosome bands and interbands in *Drosophila melanogaster* // *PLoS One.* 2014. V. 9(7). P. e101631.

Zykova T.Yu., Levitsky V.G., Belyaeva E.S. et al. Polytene chromosomes – a portrait of functional organization of the *Drosophila* genome // *Curr. Genomics.* 2018. V. 19(3). P. 179–191.

Development of N.K. Koltsov Idea about Genetic Organization of Interbands in *Drosophila melanogaster* Polytene Chromosomes

I. F. Zhimulev^{1,*}, T. Yu. Vatoлина¹, V. G. Levitsky², T. D. Kolesnikova¹, and A. V. Tsukanov²

¹Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, prosp. ak. Lavrentieva 8/2, Novosibirsk, 630090 Russia

²Institute of Cytology and Genetics SB RAS, prosp. ak. Lavrentieva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: zhimulev@mcb.nsc.ru

Here for the first time, the organization of promoters of developmental gene promoters and promoter of genes necessary for general cellular functions—the “housekeeping” of the cell in the complete genome of *Drosophila melanogaster* were studied. Using bioinformatic methods, it has been shown that the genes whose promoters are located in the interbands of polytene chromosomes are enriched in functions associated with general cellular processes, while the rest of the genes (about half of the *Drosophila* genome) are associated with highly specialized processes occurring during development. In the promoter zone of the housekeeping genes, four specific motifs were found that can be present in different genes individually or in various combinations. A significant part of interband promoters do not contain identified motifs. The analysis carried out using Gene Ontology showed that certain groups of interband genes containing one motif in promoters or their combinations are characterized by the performance of certain functions.

Keywords: developmental genes, housekeeping genes, gene promoters, nucleotide motifs in promoters, interbands, bands, polytene chromosomes, *Drosophila melanogaster*

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 576,591.3

Данные были представлены на Юбилейной научной конференции
“Николай Константинович Кольцов и биология XXI века”,
3–8 октября 2022 г., Москва, Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН

КОНСЕРВАТИВНЫЙ БЕЛОК RCC1 – НОВЫЙ КОМПОНЕНТ ЧЕРНЫХ ДИСКОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2023 г. Т. Ю. Зыкова^а, *, М. В. Мальцева^а, С. А. Демаков^а, Г. В. Похолкова^а,
Ю. А. Веряскина^а, О. И. Лаврик^б, Т. Д. Колесникова^а, И. Ф. Жимулев^а

^аИнститут молекулярной и клеточной биологии СО РАН, просп. ак. Лаврентьева, 8/2, Новосибирск, 630090 Россия

^бИнститут химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
просп. ак. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: vatolina@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 13.01.2023 г.

После доработки 17.02.2023 г.

Принята к публикации 02.03.2023 г.

Ранее был охарактеризован ген *RCC1* (*Regulator of Chromosome Condensation 1*), который считается регулятором конденсации хромосом в клеточном цикле. Этот ген кодирует ядерный белок, последовательность аминокислот которого высоко консервативна среди всех эукариот и состоит из семи бета-спиралей, также известных как семь повторяющихся единиц. Мы показали, что все наиболее заметные черные диски политенных хромосом (260 дисков) и хромоцентр связывают антитела на этот белок. Мы обнаружили, что антитела на белок RCC1 ксенопуса специфически связываются с белком RCC1 дрозофилы и человека, при этом в линиях дрозофилы с подавлением недорепликации происходит увеличение относительного количества белка RCC1 по сравнению с диким типом.

Ключевые слова: гены “домашнего хозяйства”, гены развития, диски, междиски, белок RCC1, политенные хромосомы, *Drosophila melanogaster*

DOI: 10.31857/S0475145023020076, EDN: XFQNTF

ВВЕДЕНИЕ

В политенных хромосомах *Drosophila*, как было показано на картах Н.К. Кольцова (1934) и Бриджеса (1938), выделяются такие структуры, как междиски, серые и черные диски. Известно, что у *Drosophila melanogaster* геном разделяется на две группы: гены “домашнего хозяйства” и гены развития (тканеспецифические гены). Оказалось, что первые занимают две структуры — междиск и серый диск, а вторые расположены в черных дисках. Ранее мы опубликовали модель 4-х состояний хроматина, которая позволяет характеризовать два типа дисков: черные и серые по белковому и генетическому составу (Zhimulev et al., 2014). Одним из перспективных биомаркеров канцерогенеза является ген *RCC1* (*Regulator of Chromosome Condensation 1*). Он кодирует ядерный белок, последовательность аминокислот которого высоко консервативна

среди всех эукариот. Белок RCC1 является фактором нуклеотидного обмена для ядерного белка Ras-related nuclear protein (Ran), который представляет собой ГТФазу. RCC1 также играет важную роль в сборке веретен деления во время митоза, предотвращении множественной репликации S-фазы ДНК, транспортировке ядерного материала и реконструкции ядерной мембраны (Makde et al., 2010). Из литературных данных остается не до конца понятным в каких структурах политенных хромосом локализуется этот белок (Frasch, 1991). Кроме того, как оказалось ген *RCC1* является онкогеном, от изменений активности которого зависит формирование опухолей. Недавно была изучена потенциальная роль *RCC1* в 33 опухолевых образованиях на основе баз данных Cancer Genome Atlas, Genotype-Tissue Expression и Gene Expression Omnibus. Результаты показали, что ген *RCC1* очень высоко экспрессируется

Таблица 1. Локализация антител на белок RCC1 в политенных хромосомах *D. melanogaster*

Хромосома	chr 4	chr X	chr 2L	chr 2R	chr 3L	chr 3R	Всего
Районы связывания белка RCC1 (черные диски)	2	53	51	43	48	63	260
Сайты поздней репликации	100%	83%	75%	88%	88%	92%	Среднее значение 88%

в большинстве злокачественных новообразований человека в отличие от здоровых тканей (Wu et al., 2021).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

В качестве объекта исследования мы использовали плодую мушку дрозофилу (*Drosophila melanogaster*). Мух выращивали на стандартной среде из кукурузной муки, дрожжей, агара и паточки при 18, 22 или 25°C. Линия *Oregon R* использовалась в качестве дикого типа. Линия *Rif^I* была любезно предоставлена Джаредом Нордманом, отдел биологических наук Вандерbiltского университета, США. Линии *w*; *ru h SuUR^{ES}*, *X⁺YX⁺Y.X⁺Yuw*; *SuUR^{ES}*, *Su(var)3-9⁰⁶* и *X⁺YX⁺Y.X⁺Yuw*; *Rif^I*; *SuUR^{ES}*, *Su(var)3-9⁰⁶* были получены ранее в нашей лаборатории.

Иммуноокрашивание политенных хромосом

Для иммуноокрашивания препараты споласкивали в растворе PBST. Не допуская пересыхания препарата, наносили первичные антитела в блокирующем буфере (2% бычий сывороточный альбумин в PBST) и инкубировали во влажной камере в течение 2 ч при комнатной температуре. Далее препараты отмывали в растворе PBST и наносили раствор вторичных антител, конъюгированных с флуорохромом, в блокирующем буфере. Инкубировали в течение 1.5 ч, затем стекла вновь отмывали в растворе PBST (3 смены по 5 мин). Далее на подсушенные препараты капали по 8 мкл раствора (смесь DABCO и DAPI, Abscam) и накрывали покровным стеклом. Цитологический анализ и фотографирование проводили при помощи микроскопа Olimpus BX-50F. Каждый эксперимент повторялся не менее пяти раз, при этом во всех случаях характер окраски воспроизводился (Vatolina et al., 2011).

Вестерн-блот гибридизация

Для вестерн-блот гибридизации использовали слюнные железы дрозофилы (20 пар на одну дорожку) и культуру клеток человека НЕК (около 10⁵ клеток на одну дорожку). Все образцы были лизированы в буфере (50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM PMSF) и

экстракт тотальных белков был нанесен на полиакриламидный гель. Электрофоретическое разделение белков в исследуемых образцах проводили в камере BioRad по стандартному протоколу в 10% SDS-полиакриламидном геле. После разделения на гель с образцом накладывали мембрану и проводили электроперенос в охлажденном буфере (0.2 M глицин, 0.025 M Трис и 20% метанол) в течение 1 ч при постоянном токе. Первичные антитела разводили в блокирующем растворе (поликлональные антитела кролика к белку RCC1 ксенонупса (Invitrogen) — 1 : 1000; моноклональные антитела мыши к гистону H3 (Novus Biological) — 1 : 10 000. Мембрану помещали в разведенные первичные тела и инкубировали 1 ч при комнатной температуре на шейкере при 45–50 об./мин. Затем промывали в 1× PBST. Иммунодетекцию производили с помощью набора Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen). Анализ результатов проводился при помощи топографа Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences) и программы ImageJ (Thacker et al., 2021).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что диски в политенных хромосоме представляют только поперечные полосы, разные типы серых и черных дисков отличаются по генетическому составу, морфологии, репликационной активности, белковому составу и нуклеосомным модификациям (Zhimulev et al., 2014). В ходе нашей работы мы обнаружили, что антитела на белок RCC1 ксенонупса специфически связываются с белком RCC1 дрозофилы и человека (рис. 1). Мы максимально точно прокартировали локализацию RCC1 в структурах хромосомы. В политенных хромосомах антитела к белку RCC1 связываются исключительно с высоко компактизованными черными дисками, в которых расположены гены развития. Для контраста локализации одновременно картировали белок CHRIZ, который связывается с районами богатыми серыми дисками и междисками. В результате в хромосоме становились заметными протяженные участки междисков и тонких серых дисков без локализации белка RCC1, а вся метка на белок RCC1 приходилась на черные диски и прицентромержный гетерохроматин (рис. 1a). Мы обнаружили 260 районов связывания белка RCC1 в интерфазных политенных хромосомах дрозофилы (табл. 1). Во всех случаях это были черные диски и 75–

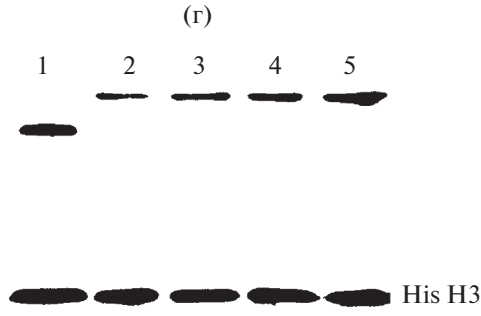
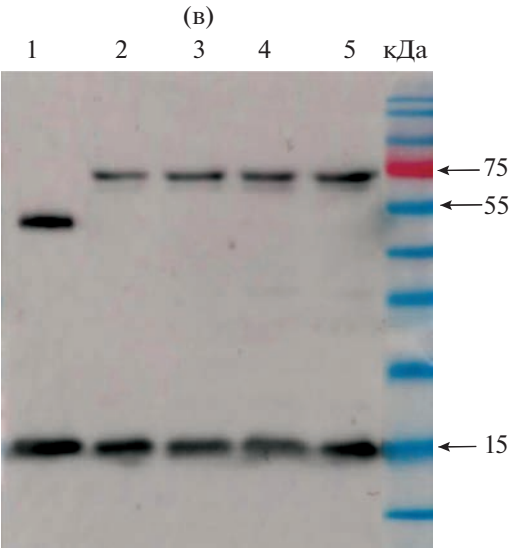
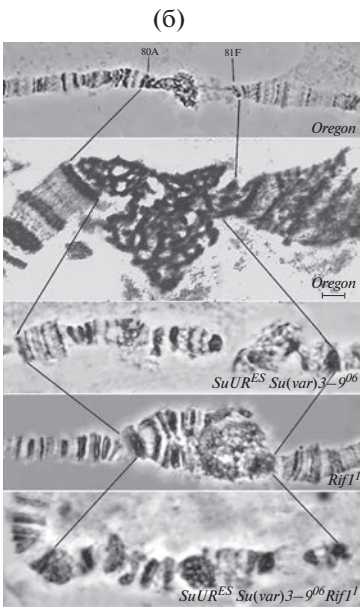
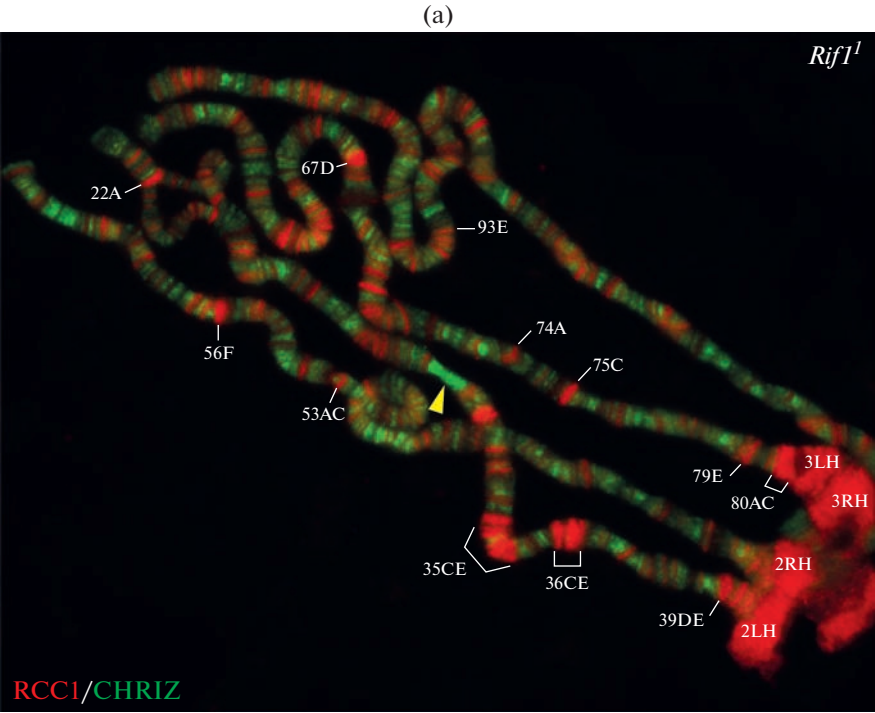


Рис. 1. Характеристика белка RCC1 дрозофилы при помощи иммуноокрашивания и вестерн-блот гибридации. (а) Иммуноокрашивание политенных хромосом на белки RCC1 и CHRIZ. Желтой стрелкой обозначен район 31A-F, содержащий около 36 серых дисков. (б) Морфология прицентромерного гетерохроматина дрозофилы между участками 80A-C и 81F третьей политенной хромосомы дикого типа и линий с мутациями, приводящими к политенизации данного участка: хромосомы линии *Oregon* (любезно предоставлено Т.Д. Колесниковой); хромосомы линии *Oregon* под электронным микроскопом (Semeshin et al., 2001); хромосомы линии с мутацией *SuUR^{ES}* (Semeshin et al., 2001); хромосомы линии с мутацией *SuUR^{ES}* и *Su(var)3-9⁰⁶* (Andreyeva et al., 2007); хромосомы линии с мутацией *Rif1¹*; хромосомы линии с мутацией *SuUR^{ES}* *Su(var)3-9⁰⁶* *Rif1¹* (любезно предоставлено Т.Д. Колесниковой). (в) Полуколичественная характеристика и определение размеров белка RCC1 дрозофилы и человека с помощью вестерн-блоттинга: 1 — культура клеток почек эмбриона человека (НЕК 293); 2 — слюнные железы дрозофилы линии *Oregon*; 3 — слюнные железы дрозофилы линии *SuUR^{ES}* *Su(var)3-9⁰⁶*; 4 — слюнные железы дрозофилы линии *Rif1¹*; 5 — слюнные железы дрозофилы линии *SuUR^{ES}* *Su(var)3-9⁰⁶* *Rif1¹*. (г) Анализ результатов вестерн-блот при помощи программы ImageJ, содержание дорожек 1–5 аналогично (в).

100% из них демонстрировали наличие позднего завершения репликации. Таким образом, у нас появился хороший маркер как на гены развития, локализованные в черных дисках, так и на модель онкогенеза на дрозофиле.

В работе М. Фраша было отмечено, что белок RCC1 локализуется во всех без исключения дисках политенных хромосом (Frasch, 1991). Но как следует из описанных выше результатов картирования белка RCC1, он характерен только для черных конденсированных дисков и прицентромерного гетерохроматина, из-за чего на хромосоме обозначены протяженные участки серых дисков без локализации белка RCC1 (желтая стрелка на рис. 1а). Подобные различия в связывании одного и того же белка могут говорить о разных механизмах активирования генов развития и генов “домашнего хозяйства”.

Известно, что черные диски часто испытывают неполную политенизацию (недорепликацию) в результате чего материал черных дисков в хромосомах нормальных линий недопредставлен (Zhimulev et al., 1982). Мы использовали Вестерн-блот гибридацию для определения молекулярного веса и полуколичественного анализа белка RCC1 в линии *Oregon* и в линиях с разными дозами мутантных генов, приводящих к восстановлению недореплицированных районов хромосом дрозофилы (рис. 1б, 1в). С помощью программы ImageJ было показано, что в линиях с мутациями *SuUR^{ES}* *Su(var)3-9⁰⁶*, *Rif1¹* и *SuUR^{ES}* *Su(var)3-9⁰⁶* *Rif1¹* относительное количество белка RCC1 в клетках слюнных желез увеличивается в сравнении с диким типом более чем в три раза (рис. 1б, 1в, 1г). Интересно то, что после подавления недорепликации в прицентромерном гетерохроматине можно наблюдать характерную для плеч хромосом картину: белок RCC1 связывается с темными участками, а CHRIZ со светлыми участками хромосомы.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе были использованы ресурсы Центра коллективного пользования “Молекулярная и клеточная биология” при ИМКБ СО РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ 19-14-00051-П.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Т.Ю. Зыкова выполняла основную экспериментальную работу, участвовала в обсуждении результатов и написании статьи. М.В. Мальцева выполняла цитологические эксперименты, делала Вестерн-блот из материала линий с разными дозами мутантных генов. Г.В. Похолокова создала линию, содержащую мутантные аллели трех генов. С.А. Демаков, Ю.А. Веряскина планировали эксперименты и анализировали результаты Вестерн-блот. О.И. Лаврик участвовала в обсуждении результатов и редактировала текст. Т.Д. Колесникова участвовала в получении линии *SuUR^{ES}* *Su(var)3-9⁰⁶* *Rif1¹* и предоставила фотографии цитологических препаратов линий *Oregon* и *SuUR^{ES}* *Su(var)3-9⁰⁶* *Rif1¹*. И.Ф. Жимулев инициировал написание статьи, планировал эксперименты, анализировал результаты и участвовал в написании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Andreyeva E.N., Kolesnikova T.D., Demakova O.V. et al. High-resolution analysis of *Drosophila* heterochromatin organization using *SuUR* *Su(var)3-9* double mutants //

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 12819–12824.
- Bridges C.B. A revised map of the salivary gland X-chromosome of *Drosophila melanogaster* // J. Hered. 1938. V. 29. P. 11–13.
- Frasch M. The maternally expressed *Drosophila* gene encoding the chromatin-binding protein BJI is a homolog of the vertebrate gene *Regulator of Chromatin Condensation, RCC1* // EMBO J. 1991. V. 10. P. 1225–1236.
- Koltzoff N.K. The structure of the chromosomes in the salivary glands of *Drosophila* // Science. 1934. V. 60. P. 312–313.
- Makde R.D., England J.R., Yennawar H.P. et al. Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle // Nature. 2010. V. 467. P. 562–566.
- Semeshin V.F., Belyaeva E.S., Zhimulev I.F. Electron microscope mapping of the pericentric and intercalary heterochromatic regions of the polytene chromosomes of the mutant Suppressor of underreplication in *Drosophila melanogaster* // Chromosoma. 2001. V. 110. P. 487–500.
- Thacker J.S., Andersen D., Liang S. et al. Unlocking the brain: A new method for Western blot protein detection from fixed brain tissue // J. Neuroscience Methods. 2021. V. 348. P. 108995.
- Vatolina T.Y., Boldyreva L.V., Demakova O.V et al. Identical functional organization of nonpolytene and polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster* // PLoS One. 2011b. V. 6. P. e25960.
- Wu C., Duan Y., Gong S. et al. Integrative and Comprehensive Pancancer Analysis of Regulator of Chromatin Condensation 1 (RCC1) // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 7374.
- Zhimulev I.F., Semeshin V.F., Kulichkov V.A. Intercalary heterochromatin in *Drosophila* // Chromosoma. 1982. V. 87. P. 197–228.
- Zhimulev I.F., Zyкова T.Yu., Goncharov F.P. et al. Genetic organization of polytene chromosome bands and interbands in *Drosophila melanogaster* // PLoS One. 2014. V. 9(7). P. e101631.

Conservative Protein RCC1 Is a New Component of Black Bands of *Drosophila melanogaster* Polytene Chromosomes

T. Yu. Zyкова¹*, M. V. Maltseva¹, S. A. Demakov¹, G. V. Pokholkova¹, Yu. A. Veryaskina¹,
O. I. Lavrik², T. D. Kolesnikova¹, and I. F. Zhimulev¹

¹*Institute of Molecular and Cellular Biology, prosp. ak. Lavrentieva 8/2, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, prosp. ak. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: vatolina@mcb.nsc.ru

Previously, the *RCC1* gene (Regulator of Chromosome Condensation 1) was characterized, which is considered a regulator of chromosome condensation in the cell cycle. This gene encodes a nuclear protein whose amino acid sequence is highly conserved among all eukaryotes and consists of seven repeating units. We have shown that all the most prominent black bands of polytene chromosomes (about 250) and the chromocenter bind antibodies to this protein. We found that antibodies to the xenopus RCC1 protein specifically bind to the *Drosophila* and human RCC1 protein, while in *Drosophila* lines with under replication suppression, the relative amount of the RCC1 protein increases compared to the wild type.

Keywords: housekeeping genes, developmental genes, bands, interbands, RCC1 protein, polytene chromosomes, *Drosophila melanogaster*