

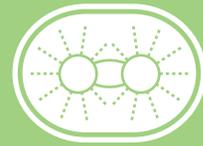
ISSN 0475-1450

Том 54, Номер 4

Июль - Август 2023



# ОНТОГЕНЕЗ



[www.sciencejournals.ru](http://www.sciencejournals.ru)



# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 54, номер 4, 2023

---

---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка экспериментального подхода к репрограммированию праймированных плюрипотентных стволовых клеток человека в наивное состояние

*В. К. Абдыев, А. Л. Риппа, Н. А. Аракелян, Е. А. Воротеяк, А. В. Васильев*

241

Температурная компенсация энергетического метаболизма у головастика озерной лягушки из разных популяций полуострова Камчатка (*Pelophylax ridibundus* Pallas 1771, Anura: Amphibia)

*С. Ю. Клейменов, С. М. Ляпков, Н. Д. Озернюк*

258

---

## ИСТОРИЯ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

Рождение морфомеханики

*А. С. Ермаков*

266

---

---

# Contents

---

---

Vol. 54, No. 4, 2023

---

---

## RESEARCH PAPERS

- Reprogramming of Primed Human Pluripotent Stem Cells into a Naive State  
*V. K. Abdyev, A. L. Rippa, N. A. Arakelyan, E. A. Vorotelyak, and A. V. Vasiliev* 241
- Temperature Compensation of Energy Metabolism in Tadpoles of the Marsh Frog  
from Different Populations of the Kamchatka Peninsula (*Pelophylax ridibundus* Pallas 1771,  
Anura: Amphibia)  
*S. Yu. Kleymenov, S. M. Lyapkov, and N. D. Ozernyuk* 258
- 

## MILESTONES

- The Birth of Morphomechanics  
*A. S. Ermakov* 266
- 
-

## РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПОДХОДА К РЕПРОГРАММИРОВАНИЮ ПРАЙМИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В НАИВНОЕ СОСТОЯНИЕ

© 2023 г. В. К. Абдыев<sup>а</sup>\*, А. Л. Риппа<sup>а</sup>, Н. А. Аракелян<sup>а</sup>, Е. А. Воротеяк<sup>а</sup>, А. В. Васильев<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

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

Поступила в редакцию 03.11.2022 г.

После доработки 23.06.2023 г.

Принята к публикации 16.07.2023 г.

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека в условиях *in vitro* находятся в наивном или праймированном состоянии плюрипотентности. Находясь в том или ином состоянии, ПСК имеют различные потенциалы дифференцировки во внезародышевые и зародышевые клетки эмбриона. Наивные ПСК по профилю экспрессии и эпигенетическому паттерну генома сравнимы с клетками внутренней клеточной массы бластоцисты. В то же время, праймированные ПСК по своим характеристикам схожи с клетками постимплантационного эпибласта. Репрограммирование праймированных ПСК в наивное состояние и поддержание этого состояния при культивировании является инструментом для изучения эпигенетических процессов преимплантационного развития эмбриона человека, а также механизмов дифференцировки ПСК в производные зародышевых листков и внезародышевых тканей эмбриона. Целью нашего исследования было репрограммирование праймированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека в наивное состояние плюрипотентности, а в дальнейшем получение культуры ИПСК, гомогенной по состоянию плюрипотентности. Благодаря разработанному нами протоколу, удалось получить ИПСК, близкие к наивному состоянию. Протокол включает применение ростовых факторов FGF2, TGFβ1 и ингибирования GSK3β и сигнального пути MEK/ERK (2iF среда). При этом обязательна предварительная обработка праймированных ИПСК ингибиторами деацетилазы гистонов (HDACi), которая приводит к изменению морфологии клеток и профилю экспрессии генов ПСК в сторону более раннего состояния плюрипотентности. При обработке праймированных ИПСК HDACi и последующим их культивировании в 2iF среде получили ИПСК, сопоставимые по морфологии колоний и профилю экспрессии генов-маркеров наивного состояния с контрольными наивными ИПСК, полученными в среде RSeT.

**Ключевые слова:** ПСК, ИПСК, наивные ИПСК, праймированные ИПСК, репрограммирование, HDACi, 2iF среда, RSeT среда

**DOI:** 10.31857/S047514502304002X, **EDN:** NRZKVC

### ВВЕДЕНИЕ

Эмбриогенез – это комплексный процесс поэтапного усложнения эмбриона, который начинается с одноклеточной стадии – зиготы, последующего дробления и, в результате точно скоординированных клеточных и морфогенетических процессов (Molè et al., 2021; Weatherbee et al., 2021), приводит к формированию функционально сбалансированного, сложного организма (Shahbazi, 2020). Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) – это уникальный тип клеток, способный дифференцироваться во все типы клеток зародыша. В преимплантационном и постимплантационном раннем развитии у мыши и человека были опре-

делены различные состояния плюрипотентности (Novo, 2021; Sim et al., 2017; Ying et al., 2008). В преимплантационный период ПСК находятся в состоянии наивности, а в постимплантационный период у мыши и человека различают розеточное, формативное и праймированное состояния плюрипотентности (Gordeev et al., 2021). Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши выделяются из преимплантационного эпибласта и находятся в наивном состоянии *in vitro* (Evans, Kaufman, 1981; Lagarkova et al., 2010; Nichols, Smith, 2009). Однако ЭСК человека удается поддерживать в культуре только в праймированном состоянии несмотря на то, что культура ЭСК выделяется из наивных клеток внутренней клеточной массы преимплан-

тационной бластоцисты (Rossant, Tam, 2017). Причина различного состояния ЭСК мыши и человека *in vitro* в том, что в условиях культивирования для поддержания ЭСК мыши в наивном состоянии необходим LIF, тогда как праймированное состояние ЭСК человека определяется наличием ростовых факторов FGF2 и TGF $\beta$  (Ávila-González et al., 2021). При определенных условиях культивирования, таких как культивирование с использованием сред NHSM, RSeT, 5iLAF и 2iLG $\delta$ Y, можно репрограммировать праймированные ЭСК человека в наивное состояние (Liu et al., 2017). ЭСК мыши и человека также различаются потенциальными к дифференцировке в трофэктодерму (Guo et al., 2021). Известно, что наивные ЭСК мыши *in vitro* и *in vivo* не способны давать трофэктодерму при подсадке в бластоцисту (Posfai et al., 2021), тогда как наивные ЭСК человека способны дифференцироваться в трофэктодерму и развиваться в цитотрофобласт *in vitro* (Guo et al., 2021). Культивируемые праймированные ПСК человека являющиеся гетерогенной популяцией клеток, коммитированных к формированию трех зародышевых листков (Lau et al., 2020). Строгим критерием идентификации линии ЭСК мыши и крысы считается интеграция этих клеток в химерную структуру зародыша после подсадки в бластоцисту или морулу (Nichols, Smith, 2009; Smith, 2003). Праймированные ПСК не способны образовывать химеру при имплантации в бластоцисту животного-хозяина (Leitch et al., 2013). Попытки создания межвидовых химерных животных с подсадкой праймированных ПСК человека не удавались (T. Liu et al., 2021). Изучение пре- и постимплантационного развития человека ограничено. Репрограммирование праймированных ПСК человека в наивное состояние открывает возможности ответа на фундаментальные вопросы поддержания плюрипотентности и передачи эпигенетического паттерна в раннем развитии человека. Разработка эффективного протокола репрограммирования гетерогенной популяции праймированных ИПСК человека в наивное состояние плюрипотентности *in vitro* необходима для дальнейшего проведения эффективной дифференцировки в целевые клетки.

Наше исследование было посвящено репрограммированию праймированных ИПСК в наивное состояние плюрипотентности и последующему получению популяции ИПСК, гомогенной по состоянию плюрипотентности. Мы разработали протокол и среды, позволяющие получать ИПСК, схожие по морфологии и профилю экспрессии генов с ПСК в более раннем состоянии плюрипотентности. Такой результат достигается при следующих условиях культивирования: применение ростовых факторов FGF2, TGF $\beta$ 1; ингибирование GSK3 $\beta$  и сигнального пути MEK/ERK (2iF среда); предварительная обработка праймированных ИПСК ингибиторами деацетилазы гисто-

нов (HDACi). Полученные в данных условиях ИПСК, близкие к наивному состоянию, были сопоставимы с охарактеризованными нами контрольными наивными ИПСК в среде RseT.

Таким образом, разработанный нами протокол дает возможность получить ИПСК, близкие к наивному состоянию. Однако для подтверждения истинного наивного состояния плюрипотентности ИПСК, полученных нами в новых условиях культивирования, нужно в дальнейшем провести секвенирование транскриптома единичных клеток.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Культивирование линии ИПСК*

Клеточные линии культивировали в чашках Петри (Thermo Fisher Scientific, США) и планшетах (Corning, США) в мультигазовом инкубаторе при температуре 37°C и составе газов 5% CO $_2$  и 5% O $_2$ .

В работе использовалась линия ИПСК человека (hiPSC-KYOU-DXR0109B [201B7] (ANCC ACS-1023)), которая была приобретена в коллекции типовых культур (ATCC, США).

Праймированные ИПСК поддерживали в среде mTESR1 (STEMCELL Technologies, Канада) в соответствии с инструкциями производителя в культуральном пластике, предварительно покрытом матригелем (STEMCELL Technologies, США). Матригель наносили на поверхность культуральной посуды и инкубировали 15 мин в мультигазовом инкубаторе при 37°C. Далее оставшийся раствор матригеля, которой не подвергся сборции удаляли. Клетки культивировали в среде mTESR1 с добавлением 5 мкМ ROCK-ингибитора (Y-27632) (Stemgent, США). По достижении 60–80% конfluenceности, клетки пересевали с помощью добавления 1 мг/мл аккутазы (STEMCELL Technologies, Канада) каждые 5 дней, предварительно промывая раствором DPBS (ПанЭко, Россия).

### *Культуральные среды для получения наивных ИПСК*

Для получения наивных ИПСК человека в качестве положительного контроля стандартная среда mTeSR1 была заменена на RSeT (STEMCELL Technologies, США). В первые сутки посева ИПСК в среду RSeT также добавляли ROCK-ингибитор (ROCKi) – клеточные линии культивировались на матригеле в среде RSeT в течение 3 пассажей (13–16 дней), пересев культуры осуществляли каждые 3–5 дней.

Для получения наивных ИПСК человека стандартная среда mTeSR1 была заменена на среду HDACi. При пассировании ИПСК добавляли ROCKi и на следующие сутки ROCKi отменялся.

**Таблица 1.** Состав среды для репрограммирования праймированных ипск в наивное состояние

|   |             |                               |           |
|---|-------------|-------------------------------|-----------|
| 1 | Среда HDACi | HDACi – VPA (Valproic acid)   | 50 нмоль  |
|   |             | HDACi – NaB (Sodium Butyrate) | 0.1 ммоль |
|   |             | N2B27                         | 50%       |
|   |             | mTeSR (FGF2, TGFb)            | 50%       |
| 2 | Среда 2iF   | MEKi – PD0325901              | 1 мкмоль  |
|   |             | GSK3β – CHIR99021             | 3 мкмоль  |
|   |             | mTeSR (FGF2, TGFb)            | 50%       |
|   |             | N2B27                         | 50%       |

Состав базовой среды N2B27\*

| Компоненты   | Производитель | Концентрация |
|--|---------------|--------------|
| Нейробазальная среда (Neurobasal™ medium)  | Gibco         | 1×           |
| DMEM/F-12 (модифицированная по способу Дульбекко среда Eagle/питательная смесь F-12) без глутамина | Gibco         | 1×           |
| Бессывороточная добавка N-2  | Gibco         | 1.0%         |
| Бессывороточная добавка B-27   | Gibco         | 2%           |
| L-глутамин   | Gibco         | 2 ммоль      |
| β-меркаптоэтанол (β -mEtOH)  | Sigma         | 0.1 ммоль    |
| Антибиотики (пенициллин и стрептомицин)  | Gibco         | 1.0%         |
| Незаменимые аминокислоты (NEAA (MEM Non-Essential Amino Acids Solution)**                          | Gibco         | 1%           |
| Бычий сывороточный альбумин (BSA)**  | Sigma         | 50 мкг/мл    |

На следующие сутки среду HDACi заменяли на среду 2iF (табл. 1).

*Иммуноцитохимическое маркирование*

Перед фиксацией культуру клеток трижды промывали раствором PBS, далее клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma-Aldrich, США) в течение 60 мин при +4°C. После фиксации клетки трижды промывали раствором PBS по 3–5 мин. Далее производили пермеабиллизацию 0.2% Triton-X-100 в PBS в течение 15 мин. Затем клетки дважды промывали PBS в течение 10–15 мин. Для блокировки неспецифической сорбции антител клетки предварительно инкубировали в блокирующем растворе (5% FBS; 0.3% Triton; 0.01% Tween) при 37°C на 60 мин. Далее удаляли блокирующий раствор и наносили первичные антитела в блокирующем растворе, содержащем PBS и 2% бычьего сывороточного альбумина. Первичные антитела наносили в разведениях согласно протоколу производителя, инкубацию в них производили при +4°C в течение ночи. После инкубации клетки трижды промывали раствором PBS. Вторичные антитела наносили в разведении 1 : 1000. Далее инкубировали 90 мин при 37°C. Далее клетки трижды отмывали раствором PBS. Ядра кле-

ток окрашивали DAPI в конечной концентрации 0.1 мкг/мл в течение 5 мин. Клетки визуализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе EVOS FL AUTO (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения обрабатывали в программе ImageJ (<https://imagej.net/>). Список первичных и вторичных антител представлен в табл. 2.

*Выделение тотальной РНК и синтез кДНК*

Выделения РНК из клеточных культур осуществляли с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. ExtractRNA монофазный водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата, предназначенный для быстрого выделения суммарной РНК. Реагент добавляли в суспензию клеток в объеме 1 мл из расчета  $1 \times 10^6 - 10^7$  клеток и оставляли при комнатной температуре 10–15 мин для полной диссоциации нуклеотидных комплексов. Далее центрифугировали 10 мин при 12000 g для удаления нерастворимых фрагментов, а супернатант переливали в новую пробирку. Для разделения фаз в пробирку с супернатантом добавляли 0.2 мл хлороформа и встряхивали ее в течение 15 с. Далее образец инкубировали 3–5 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая. Образец

**Таблица 2.** Список первичных и вторичных антител

| Антитела                                | Описание  | Тип                        | Источник   | Каталожный номер | Рабочее разведение |
|---|---|----------------------------|------------|------------------|--------------------|
| OCT4                                    | Маркер плюрипотентности   | IgG кролика поликлональные | Abcam      | ab181557         | 1 : 250            |
| KLF17                                   | Маркер наивной плюрипотентности                                       | IgG мыши моноклональные    | Santa Cruz | sc-398132        | 1 : 200            |
| Alexa Flour 568 anti mouse IgG (H + L)  | Гибридируются с IgG и IgM мыши, выявляются в виде красного сигнала    | IgG козы                   | Invitrogen | A-21201          | 1 : 1000           |
| Alexa Flour 488 anti rabbit IgG (H + L) | Гибридируются с IgG и IgM кролика, выявляются в виде зеленого сигнала | IgG козы                   | Invitrogen | A-21441          | 1 : 1000           |

центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 4°C. В ходе центрифугирования происходило разделение смеси на три фазы: нижнюю – органическую фенол-хлороформную фазу, интерфазу и верхнюю водную фазу, содержащую РНК. Держа пробирку под углом 45°, отбирали водную фазу и перемешали в новую пробирку. Далее в водную фазу добавляли 0.5 мл 100% изопропанола и инкубировали смесь при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем образец центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Отбирали супернатант, оставив осадок РНК на дне пробирки, и по стенке добавляли 2 мл 75% этанола. Далее центрифугировали на 15000 g в течение 5 мин при комнатной температуре, удаляли этанол, высушивали осадок на воздухе в пробирке с открытой крышкой в течение 5–7 мин. Осадок растворяли в 20 мкл воде, свободной от РНКаз, прогревая образцы 3–5 мин при 55–60°C. Концентрацию выделенной РНК определяли на приборе BioPhotometer plus (Eppendorf, США).

Для реакции обратной транскрипции брали 1 мкг РНК. Реакцию проводили с использованием MMLV RT kit (Евроген, Россия), согласно протоколу производителя. Для осуществления реакции готовили две смеси. Первая смесь в объеме 9 мкл содержала 1 мкг РНК-матрицы, 20 мкМ праймеров, 1 мкл ингибитора РНКаз и деионизированную, свободную от нуклеаз воду. Смесь перемешивали пипетированием и прогревали 2 мин при 70°C для денатурации вторичных структур РНК и перенесли образцы в лед. Состав второй смеси в объеме 11 мкл включал: деионизированную воду, свободную от нуклеаз; 4 мкл 5X буфера для синтеза первой цепи, 2 мкл смеси dNTP (10 mM каждого), 2 мкл DTT (20 mM), 1 мкл MMLV ревертазы. Обе смеси смешивали и инкубировали 60 мин при 42°C. Для остановки реакции итоговую смесь прогревали при 70°C в течение 10 мин. Образцы хранили при

–20°C, заранее разделив на аликвоты. Перед применением аликвоту прогревали 2 мин при 65°C для дезагрегации молекул кДНК. После обратной транскрипции для проведения реакции ПЦР-РВ кДНК разводили в 10 раз.

#### *Подбор праймеров*

Праймеры были подобраны с помощью онлайн ресурса Primer-BLAST, интегрированного в базу данных NCBI (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Дополнительную проверку праймеров проводили в программах Primer Select и Oligo Analyzer. Температуру отжига праймеров определяли с помощью программы Oligo или опытным путем. Нуклеиновые последовательности праймеров к соответствующим генам указаны в табл. 3.

#### *ПЦР, ПЦР-РВ*

Качественную и количественную оценки экспрессии исследуемых генов проводили с помощью ПЦР и ПЦР-РВ. ПЦР проводили на матрице, ранее синтезированной кДНК с помощью набора Screen-mix (Евроген, Россия) для амплификации в соответствии с инструкцией производителя на амплификаторе T1000 Touch Thermal cycler (Bio-Rad, США).

Для проверки контаминации реакционной смеси и эффективности ПЦР в каждый эксперимент включали отрицательный (вода, свободная от ДНК и РНК) и положительный контроли (известная ДНК, дающая ампликон определенного размера). Для ПЦР в реальном времени в качестве матрицы использовали кДНК (синтезированная из 1 мкг тотальной РНК) и готовую смесь для ПЦР qPCR mix-HS SYBR + LowROX (Евроген, Россия). Относительный уровень экспрессии генов

**Таблица 3.** Праймеры\*, использованные при проведении ПЦР-РВ

| Праймер                | Последовательность (5'–3') |
|------------------------|----------------------------|
| DAZL – forward         | ATGTTGTACCTCCGGCTTATTCA    |
| DAZL – reverse         | CCATTTCCAGAGGGTGGAGTA      |
| GAPDH – forward        | CACCCACTCCTCCACCTTGAC      |
| GAPDH – reverse        | TCCACCACCCTGTTGCTGTAG      |
| KLF2 – forward         | CAAGAGTTCGCATCTGAAGGC      |
| KLF2 – reverse         | AGAAGGCACGATCGCACAG        |
| KLF4 – forward         | ACCAGGCACTACCGTAAACACA     |
| KLF4 – reverse         | GGTCCGACCTGGAAAATGCT       |
| KLF17 – forward        | TAGACCCACCCAGTCTTCAT       |
| KLF17 – reverse        | CGCTGAGTTCTCGTTATCCTGGG    |
| NANOG – forward        | CAATGGTGTGACGCAGGGAT       |
| NANOG – reverse        | TGCACCAGGTCTGAGTGTTT       |
| OCT4/Pou5f1 – forward  | ACCCACACTGCAGCAGATCA       |
| OCT4/Pou5f1 – reverse  | CACACTCGGACCACATCCTTCT     |
| PRDM14 – forward       | AAGCAACTGGATGCGCTATGT      |
| PRDM14 – reverse       | GGGATGGGCTTAATGGTGTAGAA    |
| REX1 – forward         | GCCTTATGTGATGGCTATGTGT     |
| REX1 – reverse         | ACCCCTTATGACGCATTCTATGT    |
| SOX2 – forward         | TGCGAGCGCTGCACAT           |
| SOX2 – reverse         | GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA   |
| STAT3 – forward        | CGGAGAAACAGGATGGCCC        |
| STAT3 – reverse        | GCGGCTATACTGCTGGTCAA       |
| STELLA/DPPA3 – forward | AGAGAAGGGTCCGCACTTTG       |
| STELLA DPPA3 – reverse | TTCCCGATTTTCGCAATTCTC      |
| TFE3 – forward         | AGCCATCACTGTCAGCAACT       |
| TFE3 – reverse         | TGTCTTTCTTCTGCCGTTCTT      |
| YAP – forward          | TCCCAGATGAACGTACACAGC      |
| YAP – reverse          | GAAGAGGACTGAAGCCGAG        |
| DNMT3B – forward       | TGGAGCCACGACGTAACAAA       |
| DNMT3B – reverse       | GCATCCGTCATCTTTCAGCCTA     |

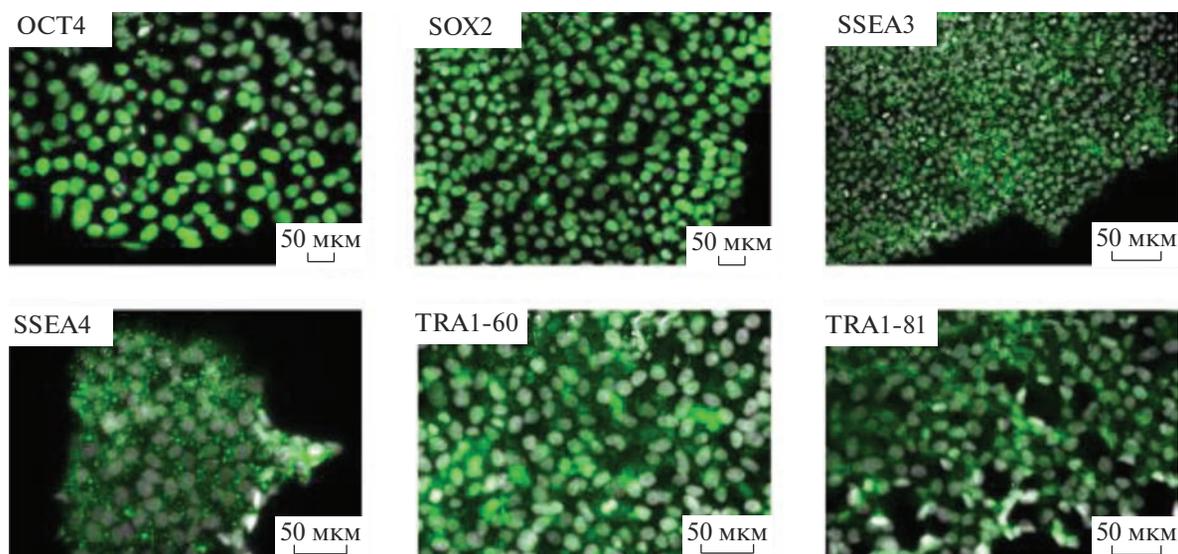
\* Производитель всех праймеров – Евроген, Россия.

интересов определяли с помощью калибровочной кривой и нормализовали на экспрессию гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Исследование проводилось в трех технических и трех независимых экспериментальных повторах. Реакции проводились на приборе LightCycler 96 System (Roche, Швейцария). Для сравнения экспрессии генов в различных условиях использовался сравнительный СТ-метод для относительного количественного анализа. По полученным значениям СТ рассчитывался  $\Delta\Delta CT$  для оценки различий в экспрессии генов. Специфичность реакции оценивалась по кривым плавления и с помощью электрофореза в агарозном геле.

Данные экспрессии генов-маркеров представлены в виде средних значений с разбросом в виде ошибки среднего.

#### Гель-электрофорез

Для подтверждения качества РНК, наличия продукта ПЦР и специфичности этого продукта был использован метод гель-электрофореза. Результаты регистрировали после электрофоретического разделения в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Размер продукта ПЦР измеряли, используя маркеры молекулярного веса 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия).



**Рис. 1.** Иммуноцитохимический анализ праймированных ИПСК. OCT4, SOX2, SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 показаны зеленым цветом. Ядра докрашены Dapi (показано серым цветом). Масштабный отрезок 50 мкм.

Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете ( $\lambda = 310$  нм) и фотографировали.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Характеристика праймированных ИПСК*

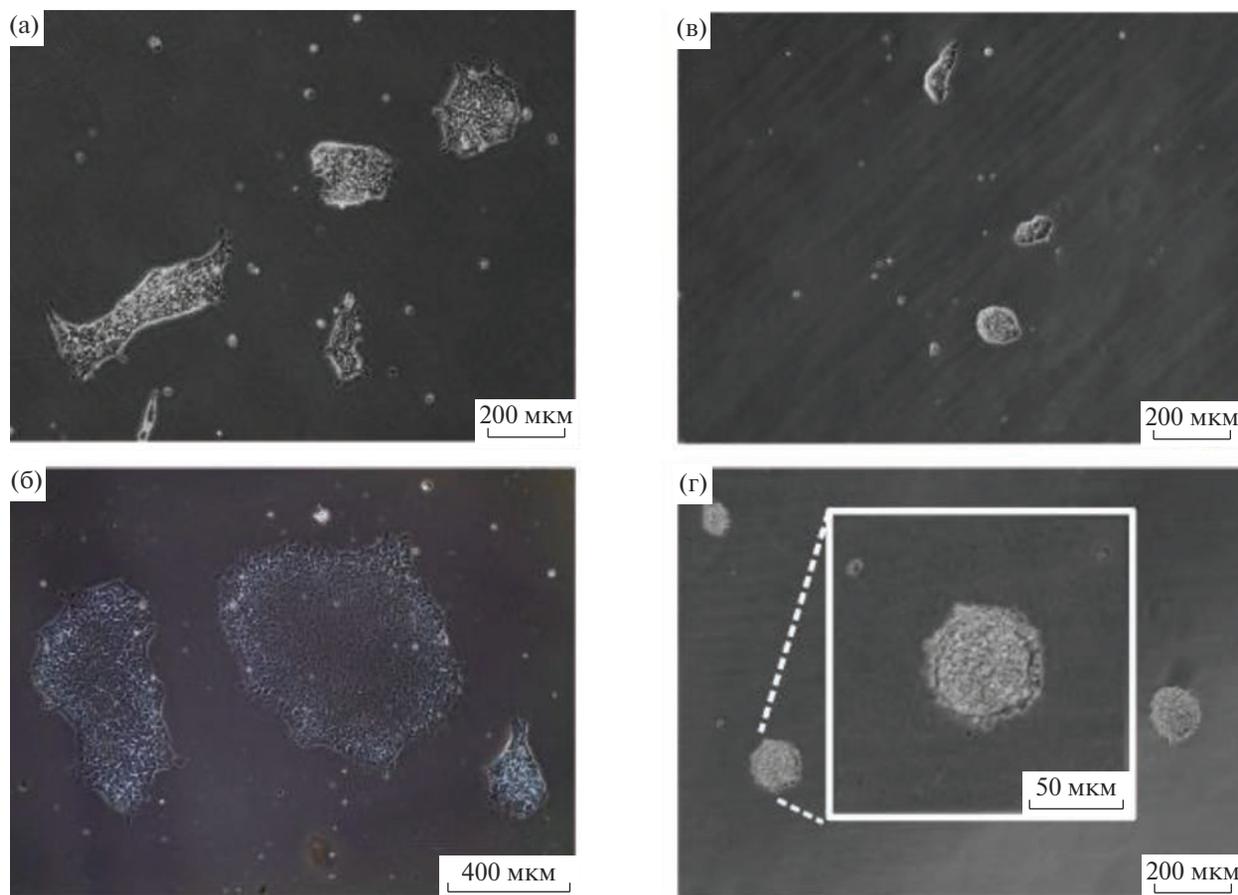
В данной работе использовали линию ИПСК-KYOU, которую поддерживали в культуральной среде для ПСК человека mTeSR1. Для поддержания самообновления и плюрипотентного состояния ПСК использовали полную среду mTeSR1 с включением факторов роста FGF2 и TGFb1 (Levenstein et al., 2006). FGF2 обеспечивает чувствительность ИПСК по отношению к сигналам дифференцировки в производные трех зародышевых листков. Поэтому считается, что при культивировании в полной культуральной среде mTeSR1, ИПСК находятся и поддерживаются в праймированном состоянии и компетентны к дифференцировке. Исходя из этого, в нашей работе ИПСК, культивируемые в полной среде mTeSR1, считались праймированными. Кроме того, ИПСК были охарактеризованы как праймированные по наличию экспрессии специфических маркеров – ядерных OCT4, SOX2 (рис. 1а, 1б) и поверхностных SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 (рис. 1в–1е), характерных для культуры ИПСК.

### *Репрограммирование праймированных ИПСК в наивное состояние с помощью культуральной среды RSeT*

Культуральная среда RSeT является общепринятой средой для получения наивных ИПСК (X. Liu et al., 2017), которая была разработана по резуль-

татам экспериментальной работы Гафни и соавторов (Gafni et al., 2013). Из состава данной среды исключены ростовые факторы FGF2 и TGFb1, что позволяет репрограммировать клетки в состояние наивной плюрипотентности (Collier et al., 2017; Kilens et al., 2018; X. Liu et al., 2017; Mazid et al., 2022; Weatherbee et al., 2021). Репрограммирование на среде RSeT праймированных ПСК в наивное состояние удается за счет фактора LIF и ингибиторов ERK1/2 (PD0325901), GSK3 $\beta$  (CHIR99021), JNK (SP600125), p38 (SB204590), PKC (Go6985) (Gafni et al., 2013; Weatherbee et al., 2021). В нашей работе мы применили коммерческую среду RSeT для получения наивных ИПСК и использовали их в качестве положительного контроля для разработки протокола получения наивных ИПСК. На 3 и 5 сут культивирования в среде RSeT колонии ИПСК приобретают компактную, округлую и выпуклую форму, что морфологически отличает их от колоний праймированных ИПСК (рис. 2).

Иммуноцитохимический анализ наивных ИПСК показал, что основные маркеры плюрипотентности, а именно ядерные транскрипционные факторы OCT4 и SOX2 и мембранные маркеры TRA1-60, TRA1-81, экспрессируются в округлых и компактных колониях клеток (рис. 3а). Экспрессия маркера наивных ПСК STELLA была выявлена в цитоплазме и в перинуклеарной области клеток (рис. 3а). Мы использовали KLF17 как дополнительный маркер наивности, так как ранее было показано, что экспрессия *KLF17* увеличивается именно в наивных ПСК (Kilens et al., 2018; Yamauchi et al., 2020). Экспрессия KLF17 детектируется в цитоплазме и ядре наивных ИПСК (рис. 3а). Мы обнаружили колокализацию KLF17 с основным



**Рис. 2.** Морфология колоний ИПСК. Фазово-контрастная микроскопия. (а) Праймированные ИПСК в среде mTeSR1 на 3 сут культивирования. (б) Праймированные ИПСК в среде mTeSR1 на 5 сут культивирования. (в) Наивные ИПСК в среде RSeT на 3 сут культивирования. (г) Наивные ИПСК в среде RSeT на 5 сут культивирования. Масштабный отрезок 200 мкм.

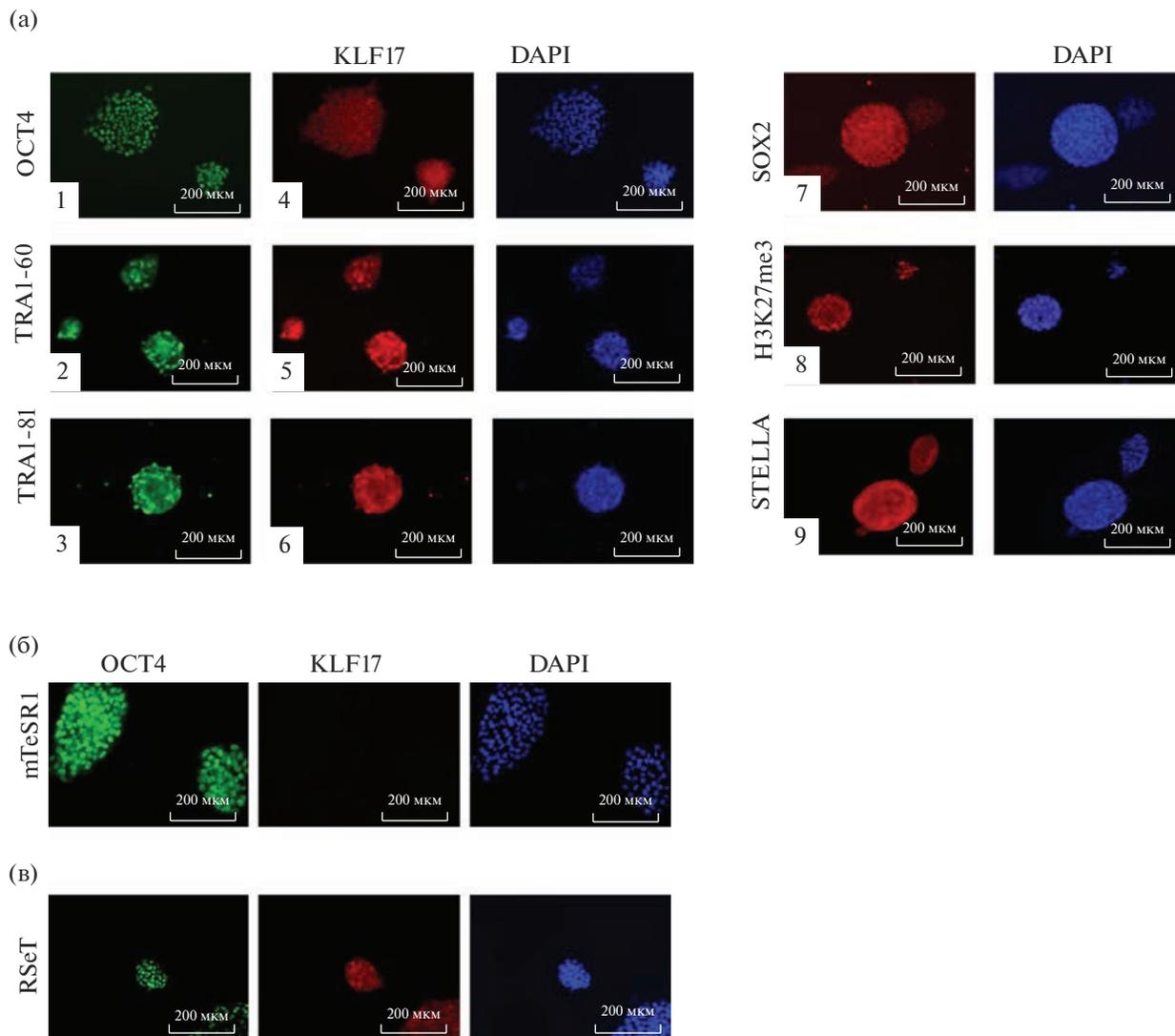
маркером плюрипотентности OCT4 в наивных ИПСК, культивируемых на среде RSeT (рис. 3а). При этом экспрессия KLF17 отсутствовала в праймированных ИПСК (рис. 3б). Ранее было показано, что *STELLA* экспрессируется в наивных ПСК человека (Ávila-González et al., 2021) и при подавлении его экспрессии предотвращается репрограммирование праймированных ПСК в наивное состояние (Mazid et al., 2022). Таким образом, изменение морфологии колоний и наличие маркеров наивного состояния ИПСК *STELLA* и *KLF17* подтверждает репрограммирование праймированных ИПСК в наивное состояние культуральной средой RSeT.

*2iF культуральная среда обладает свойством репрограммировать праймированные ИПСК в состояние, близкое к наивным*

Отличительной чертой ПСК человека, в отличие от ПСК мыши, является то, что ПСК человека постоянно нуждаются в ростовых факторах

FGF2 (Levenstein et al., 2006) и TGFb1 (Vallier et al., 2009) для самообновления в условиях *in vitro*. В отличие от них, ЭСК мыши сохраняют плюрипотентный потенциал и самообновляются в культуре только при наличии фактора LIF посредством активации сигнального каскада STAT3 (Dahéron et al., 2004; Ying et al., 2008). Для репрограммирования праймированных ИПСК человека в наивное состояние мы включили в состав базальной среды два ингибитора (2i), а именно ингибитор GSK3β (CHIR99021) и ингибитор сигнального пути MEK/ERK (PD0325901), а концентрации ростовых факторов FGF2 и TGFb1 снизили в два раза (2iF). Предварительно, то есть до начала культивирования в среде 2iF, праймированные ИПСК были обрабатывались ингибитором деацетилазы гистонов (HDACi) (рис. 4а).

Регуляция экспрессии гена зависит от локального ремоделирования хроматина и динамических изменений нуклеосомной упаковки ДНК (Wolffe, 1997). В результате перестройки хроматина регулируется экспрессия генов, ответственных за самооб-

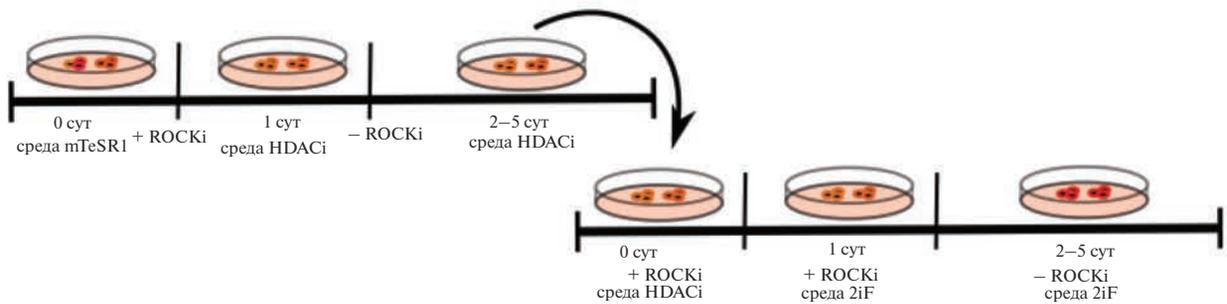
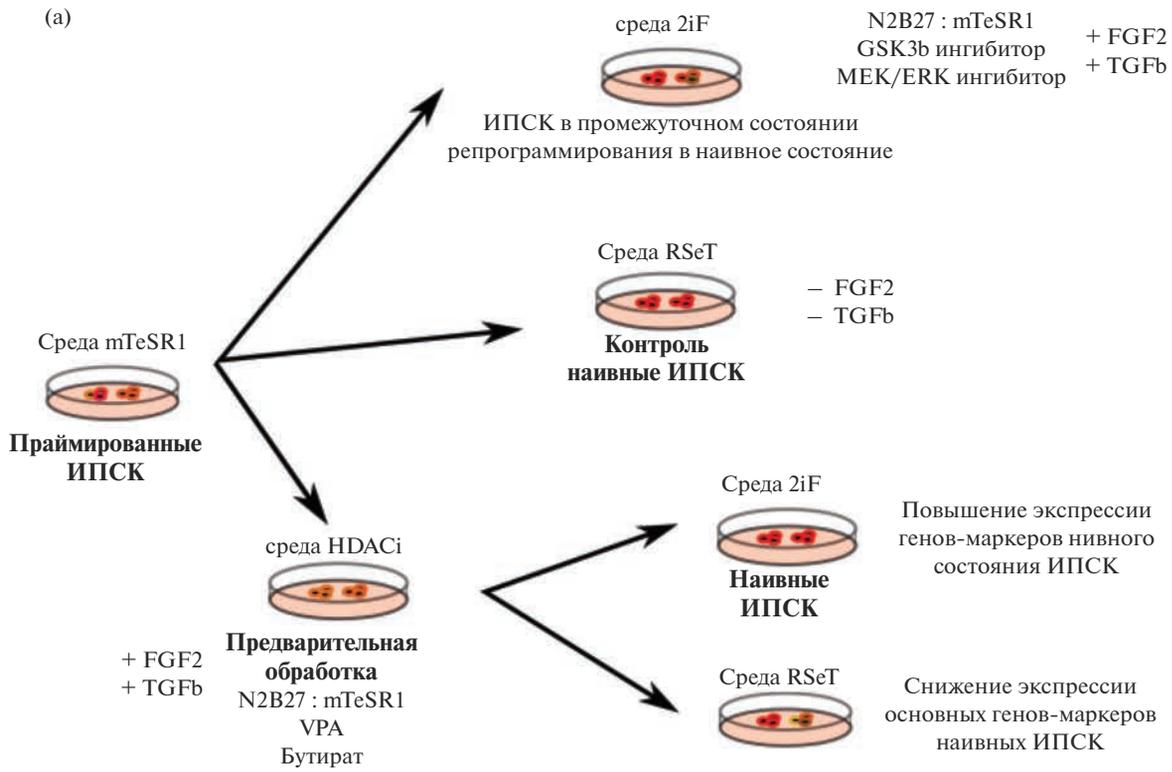


**Рис. 3.** Иммуноцитохимический анализ наивных ИПСК. (а) Экспрессия маркеров плюрипотентности в наивных ИПСК в среде RSeT, А1) OCT4, А2)TRAI-60, А3)TRAI-81 (зеленый), А4-А6) KLF17 (красный), А7) SOX2, А8) H3K27me3, А9) STELLA (красный). (б) Экспрессия маркеров плюрипотентности в праймированных ИПСК в среде mTeSR1. Б1) OCT4 (зеленый), Б2) KLF17 (красный). Флуоресцентная микроскопия. 5-е сут культивирования. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 200 мкм.

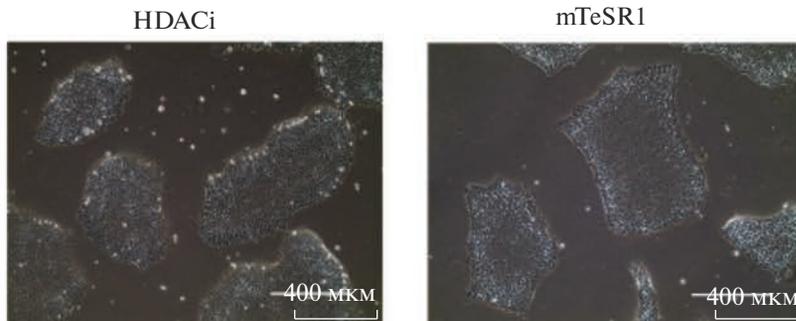
новление стволовых клеток и их дифференцировку (Т. Liu et al., 2021). Ацетилирование N-конца гистона является одним из механизмов ремоделирования хроматина (Strahl, Allis, 2000), которое осуществляется ацетилтрансферазой гистонов (НАТ). Ацетилирование способствует распаковке ДНК (Ito, Adcock, 2002): с его помощью открываются участки промоторов генов для взаимодействия с транскрипционными факторами и РНК полимера-

зой II (Ito, Adcock, 2002), что приводит к активации экспрессии генов в участке ацетилированного гистона (Saraiva et al., 2010). Было показано, что при репрограммировании фибробластов мыши в ИПСК в промотерных областях генов *Oct3/4* и *Nanog* увеличивался уровень ацетилирования H3 гистонов относительно исходной линии клеток (Takahashi, Yamanaka, 2006). Уровень ацетилирования H3 гистонов в ЭСК мыши также оказался

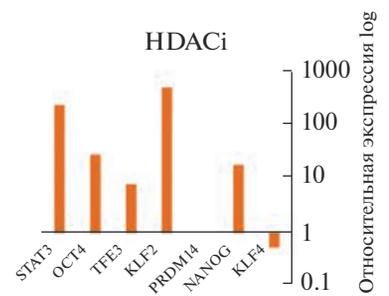
**Рис. 4.** Предварительная обработка ИПСК в среде HDACi. (а) Схема эксперимента. (б) Морфология колоний ИПСК в среде HDACi (слева). Морфология колоний ИПСК в среде mTeSR1 (справа). Фазово-контрастная микроскопия, 5 сут культивирования. Масштабный отрезок 400 мкм. (в) Профиль экспрессии генов-маркеров плюрипотентности в ИПСК в среде HDACi относительно контрольных праймированных ИПСК в среде mTeSR1.



(б)



(в)



высоким (Takahashi, Yamanaka, 2006). Деацетилаза гистонов (HDAC) удаляет ацетильные группы с гистонов и способствует компактизации хроматина (Johnstone, 2002; Saraiva et al., 2010), при этом изменяется доступность промотерных регионов генов для транскрипционных факторов в деацетилированном участке гистонов, что приводит к подавлению экспрессии генов (Seto, Yoshida, 2014). Ингибирование HDAC приводит к гиперацетилированию гистонов (Seto, Yoshida, 2014) и повышению доступности ДНК в данном участке генома. Например, воздействие трихостатина А, одного из ингибиторов HDAC (HDACi), в малых дозах на ЭСК мыши вызывает замедление их пролиферации, увеличение дифференцировки и рост апоптотических клеток (Saraiva et al., 2010). Известны и другие HDACi, такие как вальпроевая кислота (VPA) и субероиланилид гидроксамовой кислоты (SANA). Ингибирование HDAC с помощью VPA в гемопоэтических клетках-предшественниках при остром миелоидном лейкозе способствует дифференцировке данных опухолевых клеток и снижению метастазирования (Göttlicher et al., 2001; Seto, Yoshida, 2014). Бутират Na (бутират) также ингибирует HDAC, применение бутирата при культивировании ЭСК человека способствует поддержанию клеток в состоянии плюрипотентности (Ware et al., 2009). Бутират в отсутствие FGF2 способствует самообновлению ЭСК и их репрограммированию в более раннее состояние плюрипотентности (Ware et al., 2009). Ранее предварительная обработка культур ПСК HDACi использовалась в протоколах перепрограммирования клеток из праймированного состояния в наивное (Ware et al., 2014; Guo et al., 2018), которая была названа “эпигенетической перезагрузкой” (epigenetic resetting) (Guo et al., 2018). Ингибирование HDAC также использовалось для устранения “эпигенетической памяти” ИПСК и выравнивания клеток культуры по паттерну экспрессии генов (Huangfu et al., 2008). Соответственно, в данной работе мы применили бутират и VPA (HDACi) для предварительной обработки ИПСК перед репрограммированием в наивное состояние.

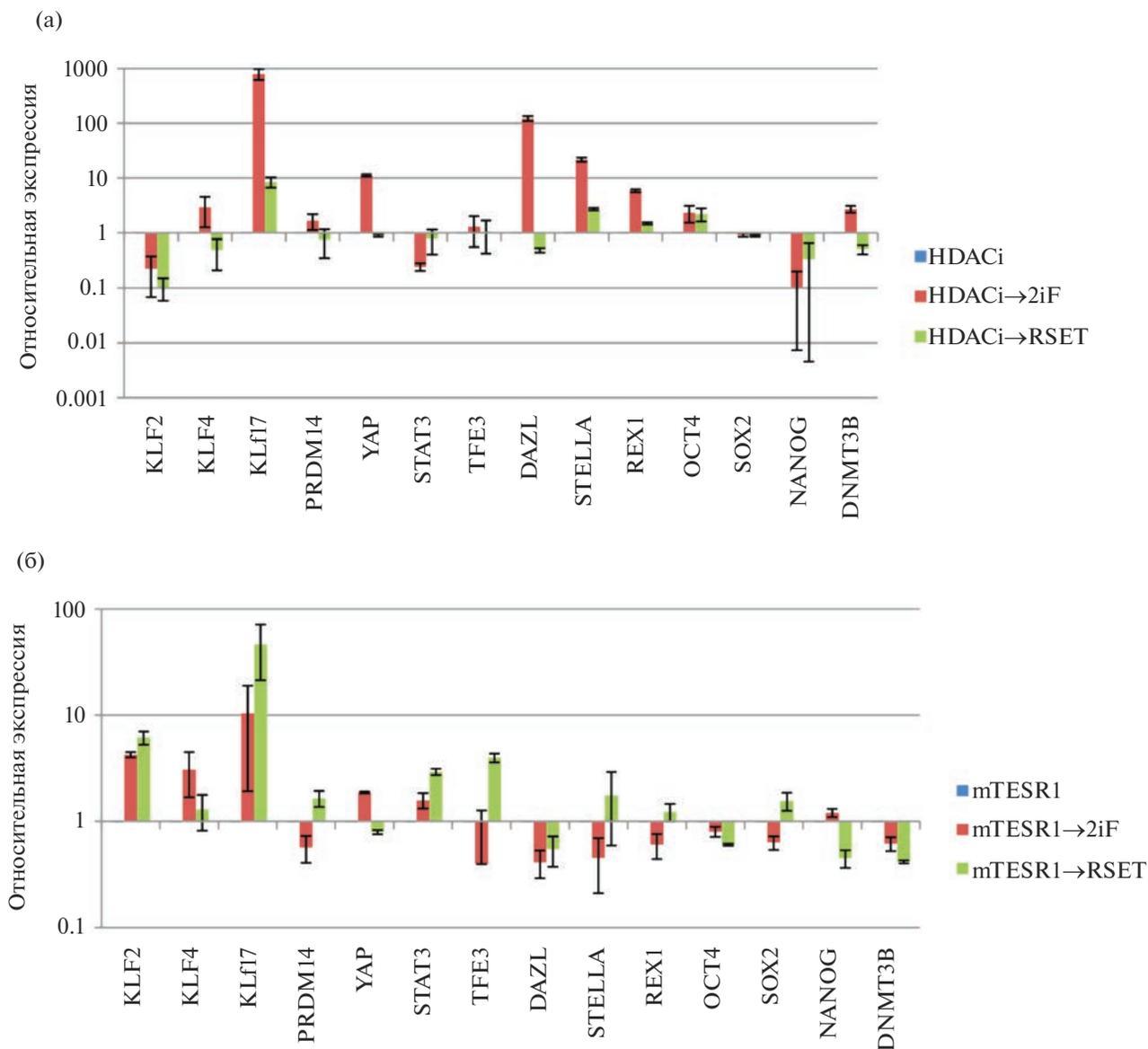
Для предварительной обработки праймированных ИПСК мы разработали состав базальной среды, которая включала среду N2B27 (на основе DMEM/F12 и Neurobasal) и среду mTeSR1 в соотношении 1 : 1. К базальной среде добавили VPA и бутират (HDACi). Эту среду мы далее будем называть HDACi среда. Предварительная обработка праймированных ИПСК проводилась в базальной среде с концентрацией FGF2 и TGFb1, сниженной в два раза по сравнению с mTeSR1 (рис. 4а). В результате в среде HDACi мы наблюдали морфологию клеток и колоний ИПСК, сопоставимую с данными в среде mTeSR1 (рис. 4б). В HDACi среде концентрация факторов роста FGF2 и TGFb1 снижена в 2 раза по сравнению со средой

mTeSR1. Следует отметить, что снижение концентрации данных факторов роста приводит к спонтанной дифференцировке праймированных ИПСК человека (данные не предоставлены), но наличие HDACi препятствует этому процессу (рис. 4б).

Уровень экспрессии генов *STAT3*, *OCT4*, *TFE3*, *KLF2*, *NANOG* увеличивался в ИПСК в HDACi среде относительно ИПСК, культивируемых в среде mTeSR1 (рис. 4в). Следует отметить, что в среде HDACi экспрессия *PRDM14* не изменялась, в то время как экспрессия *KLF4* снижется относительно контроля праймированных ИПСК. Мы наблюдали повышение экспрессии генов-маркеров наивных ПСК в среде HDACi, однако морфология клеток и клеточных колоний была подобна праймированным ИПСК. Это свидетельствует о сохранении плюрипотентного состояния ИПСК в среде HDACi одновременно с их сдвигом в наивное состояние, о чем можно судить по данным, полученным с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

На следующем этапе исследования мы репрограммировали ИПСК, культивируемые в среде HDACi, в наивное состояние с помощью применения среды RSeT и 2iF.

Анализ ПЦР-РВ ИПСК человека, культивируемых в среде 2iF с предварительной обработкой HDACi, показал достоверное повышение экспрессии генов-маркеров наивного состояния *KLF4*, *KLF17*, *PRDM14*, *YAP*, *DAZL*, *STELLA*, *REX1* и понижение экспрессии *KLF2*, *STAT3* по сравнению с праймированными клетками. В то же время, у ИПСК в среде RSeT, также предварительно обработанных HDACi, наблюдали повышенный уровень экспрессии *KLF17*, *STELLA*, *REX1* и пониженный уровень экспрессии *KLF2*, *KLF4*, *PRDM14*, *STAT3*, и *DAZL* (рис. 5а). Экспрессия *OCT4* повышалась в обеих культурах, в то время как экспрессия *SOX2* не менялась. Уровень экспрессии *NANOG* снижался в обеих культурах. К нашему удивлению, в культуре 2iF с предварительной обработкой HDACi повышалась экспрессия гена ДНК метилтрансферазы 3В (*DNMT3B*), а в среде RSeT она понижалась относительно контроля (праймированных ИПСК на среде mTeSR1) (рис. 5а). *DNMT3B* ответственна за *de novo* полногеномное метилирование ДНК в ходе развития эмбриона мыши (Т. Chen et al., 2002). Ранее было показано, что при культивировании ПСК в условиях 2i происходит гипометилирование за счет подавления *DNMT3B* (Sim et al., 2017). А подавление экспрессии *DNMT3B* в наивных ПСК опосредуется активацией экспрессии *PRDM14* (Okashita et al., 2014). В свою очередь *PRDM14*, является сайт специфическим транскрипционным активатором и репрессором во время репрограммирования ПСК из праймированного состояния плюрипотентности в наивное



**Рис. 5.** Экспрессия генов-маркеров плюрипотентности в ИПСК при различных условиях репрограммирования в наивное состояние. (а) Сравнение профиля экспрессии маркерных генов в ИПСК в среде 2iF и RSeT с предварительной обработкой праймированных ИПСК в среде HDACi. (б) Сравнение профиля экспрессии маркерных генов в ИПСК в среде 2iF и RSeT без предварительной обработки праймированных ИПСК в среде HDACi. Представлены средние значения и разброс в виде ошибки среднего.

(Yamamoto et al., 2020). PRDM14 транзичтно экспрессируется в клетках внутренней клеточной массы бластоцисты мыши и его уровень экспрессии снижается в пост-имплантационном эпибласте (Seki, 2018). Мы обнаружили, что экспрессия PRDM14 повышается в ИПСК, предварительно обработанных HDACi в среде 2iF. В связи с этим ожидалось снижение экспрессии DNMT3B в ИПСК предварительно обработанных HDACi в среде 2iF. Но в нашем эксперименте экспрессия DNMT3B в условиях предварительной обработки ИПСК HDACi в среде 2iF повышается. Предварительная

обработка HDACi перед культивированием в коммерческой среде RSeT приводит к снижению экспрессии основных маркеров наивных ИПСК человека, в то время как при культивировании ИПСК, предварительно обработанных HDACi, в среде 2iF уровень экспрессии “генов наивности” повышается (рис. 5а).

Полученные данные по экспрессии генов-маркеров наивных ИПСК в средах 2iF и RSeT с предварительной обработкой клеток HDACi подтверждают результаты иммуноцитохимического анализа. По его результатам OCT4 и KLF17-пози-

тивные клетки обнаруживаются в культуре наивных ИПСК на среде RSeT (рис. 3).

В нашем исследовании мы также проанализировали наивные ИПСК в условиях среды RSeT и среды 2iF без предварительной обработки HDACi.

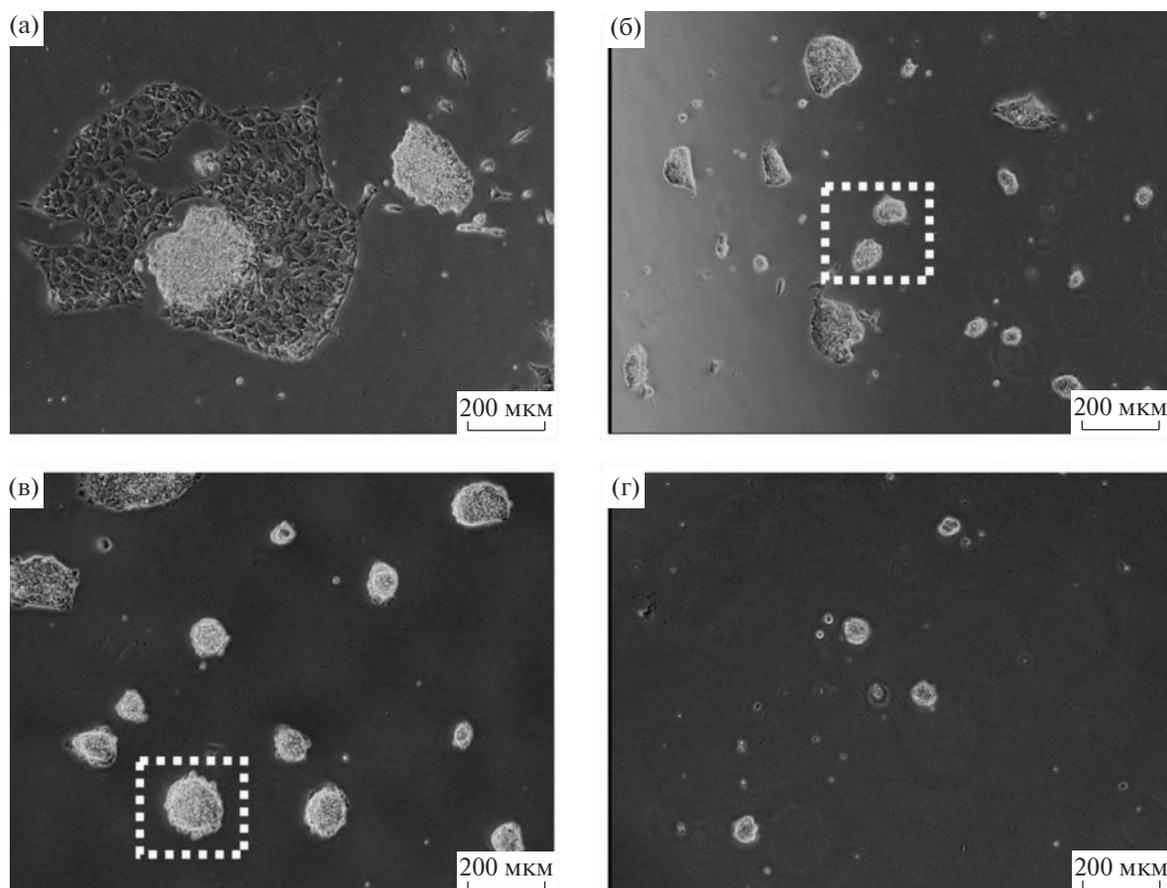
Исследование экспрессии генов, специфичных для наивных ИПСК, необработанных HDACi и культивируемых в среде RSeT, показало, что они характеризуются повышенной экспрессией транскрипционных факторов: *KLF2*, *KLF17*, *PRDM14*, *STAT3*, *TFE-3* и *REX1* (рис. 5б). При этом уровень экспрессии *KLF4* и *YAP* не изменялся, либо снижался. Также было отмечено подавление экспрессии *DAZL* и повышение экспрессии *STELLA* в ИПСК в среде RSeT. При этом экспрессия основных маркеров плюрипотентности ИПСК *OCT4*, *NANOG* в среде RSeT снижалась, а уровень экспрессии *SOX2* увеличивалась. При культивировании ИПСК человека в среде 2iF без предварительной обработки HDACi наблюдался высокий уровень экспрессии ряда исследуемых генов: *KLF2*, *KLF4*, *KLF17*, *STAT3*, и *YAP*. В то же время уровень экспрессии *PRDM14*, *TFE3*, *DAZL*, *STELLA*, и *REX1* достоверно снижался по сравнению с их экспрессией в праймированных клетках (рис. 5б). В условиях культивирования в среде 2iF без предварительной обработки HDACi экспрессия основных генов-маркеров плюрипотентности, *OCT4* и *SOX2*, снижалась, а *NANOG* — повышалась. В условиях обеих сред, 2iF и RSeT, наблюдалось подавление экспрессии *DNMT3B*, маркера метилирования ДНК *de novo*, относительно праймированных ИПСК в среде mTeSR1 (рис. 5б). ПЦР-РВ анализ экспрессии генов-маркеров наивных ПСК показал, что в среде RSeT ИПСК стабильно репрограммируются в наивное состояние без необходимости предварительной обработки HDACi. При этом репрограммирование ИПСК в среде 2iF и без обработки HDACi происходит с низкой эффективностью. Результаты ПЦР-РВ анализа также показывают, что репрограммирование праймированных ИПСК человека в наивное состояние плюрипотентности в разработанной нами среде 2iF с предварительной обработкой клеток HDACi соотносится с данными, полученными для наивных ИПСК, культивируемых в среде RSeT без предварительной обработки HDACi (контрольные наивные ИПСК).

Следует отметить, что предварительная обработка ИПСК HDACi изменяет траекторию репрограммирования клеток. Без обработки HDACi в среде 2iF ИПСК частично репрограммируются, но при этом сохраняют повышенную экспрессию *KLF2* (рис. 5). В то же время, при предварительной обработке HDACi в той же среде ИПСК снижают экспрессию *KLF2*. Таким образом, можно предположить, что доступность хроматина опре-

деляет механизм репрограммирования праймированных ИПСК в наивное состояние.

FGF2-зависимые ИПСК человека находятся в праймированном состоянии *in vitro*, и по профилю экспрессии и эпигенетическому статусу эквивалентны клеткам постимплантационного эпибласта человека. Кроме того, праймированные ИПСК теряют способность дифференцироваться в трофэктодерму, а вместо нее образуют клетки амниона. Учитывая гетерогенность клеточной популяции ИПСК и предрасположенность этих клеток к дифференцировке в клетки трех зародышевых листков, эффективность направленной дифференцировки праймированных ИПСК будет низкой. Среда mTeSR1 обеспечивает культивирование ИПСК в праймированном состоянии. В нашем эксперименте мы снизили влияние среды mTeSR1 на праймированность за счет снижения концентрации FGF2 и TGFb в два раза. Помимо этого, для получения наивных ИПСК мы ингибировали MEK сигнальный путь и активировали WNT сигнальный каскад путем ингибирования GSK3b. Стоит отметить, что FGF2 активирует как каскад сигнального пути MEK, так и ERK 1/2.

Ранее было показано, что нокаутирование ERK2 в праймированных ЭСК человека приводит к потере ими плюрипотентности. С другой стороны, ингибирование MEK применяется при репрограммировании праймированных ИПСК в наивное состояние. Соответственно, в нашем эксперименте мы ингибировали MEK и сохраняли активность сигнального каскада FGF путем добавления FGF2 в культуральную среду. Наше решение добавить FGF2 и TGFb в разработанную нами среду 2iF для получения наивных ИПСК было подкреплено экспериментальными работами. В этих работах было показано, что FGF2 долгосрочно ингибирует ERK в ЭСК мыши за счет работы FGF2-индуцированной некогерентной петли прямой связи. Тем не менее, добавление в среду FGF2 повышало уровень экспрессии канонических генов-маркеров наивных ЭСК мыши *Klf4*, *Klf5*, *Tfcp2l1*, *Nrobl* и *Essrb* (Gharibi et al., 2020). Кроме того, известно, что ингибирование TGFb сигнального пути в преимплантационном эмбрионе человека приводит к снижению экспрессии *NANOG* и *SOX17*, а также к и полному подавлению экспрессии этих генов в клетках внутренней клеточной массы бластоцисты человека. Именно это приводит к тому, что у эмбриона человека на стадии E6-E7 (в отличие от мышиноного эмбриона) отсутствуют *NANOG*-положительные плюрипотентные клетки (Blakeley et al., 2015). Следовательно, TGFb сигнальный путь играет важную роль в сохранении клетками плюрипотентности. Помимо этого, можно предположить, что предварительная обработка ИПСК в среде HDACi переводит клетки в более раннее состояние, а 2iF сре-



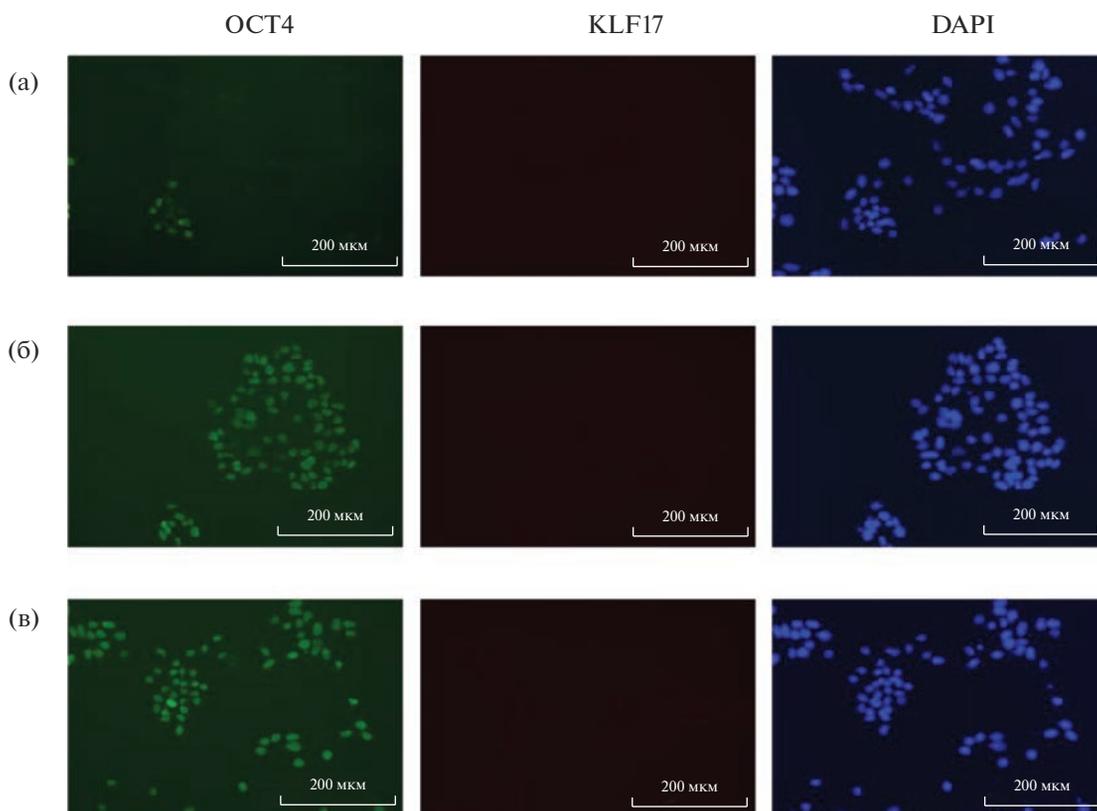
**Рис. 6.** Морфология ИПСК, репрограммированных в наивное состояние. (а) ИПСК в среде 2iF без предварительной обработки в среде HDACi. (б) ИПСК в среде 2iF с предварительной обработкой в среде HDACi. (в) ИПСК в среде RSeT без предварительной обработки в среде HDACi. (г) ИПСК в среде RSeT с предварительной обработкой в среде HDACi. Пунктиром отмечены колонии клеток с морфологией, типичной для наивных ИПСК. Фазово-контрастная микроскопия, 5-е сут культивирования. Масштабный отрезок 200 мкм.

да успешно репрограммирует ИПСК в наивное состояние (рис. 6).

Проведенные нами эксперименты на ИПСК человека с использованием 2iL (LIF + CHIR + PD) показали, что клетки в таких условиях дифференцируются (рис. 7), что согласуется с данными литературы (Hanna et al., 2010; Ware et al., 2014). Далее было проанализировано влияние на клетки 2iL в присутствии VPA, натрий бутирата и XAV939 (ингибитор WNT сигнального пути). Анализ результатов этих экспериментов подтвердил, что ИПСК дифференцируются и замедляют рост. Основываясь на том, что LIF не способен поддерживать плюрипотентность праймированных ЭСК (Dahéron et al., 2004) и ИПСК человека (данные полученные нами), мы перестали использовать фактор LIF при переводе праймированных ИПСК в наивное состояние. Однако известно, что в результате гиперэкспрессии STAT3 активность LIF/JAK переводит праймированные ЭСК человека в наивное состояние в условиях 2iL (H. Chen et al., 2015). Поэтому мы обратили внимание на экс-

прессию *STAT3* в ИПСК, обработанных HDACi, в сравнении с праймированными ИПСК и определили, что под действием HDACi в отсутствие фактора LIF у ИПСК увеличивается экспрессия *STAT3* (рис. 4б). Убедившись в повышении экспрессии *KLF2*, *TFE3*, *NANOG* (рис. 4б), мы продолжили разработку протокола. Оказалось, что при данных условиях повышается экспрессия *STAT3* и, возможно, LIF/JAK сигнальный путь активируется в отсутствие LIF, но при участии FGF2 и TGFb1. Полученные нами данные не противоречат данным, имеющимся в литературе. Возможно, состояние плюрипотентности ИПСК стабилизируют за счет компенсаторных сигнальных механизмов (так называемые “crosstalk mechanisms”).

Было показано, что глобальная гиперактивация суперэнхансеров приводит к репрограммированию праймированных ПСК в наивное состояние плюрипотентности путем модуляции медиаторов на энхансерах (Lynch et al., 2020). В результате этого, РНК полимеразы II привлекаются на промоторы, и



**Рис. 7.** Иммуноцитохимический анализ ИПСК. Экспрессия маркеров плюрипотентности на OCT4 и KLF17 в ИПСК, культивируемых в условиях: (а) 2iL; (б) 2iL + HDACi; (в) 2iL + HDACi + XAV. Флуоресцентная микроскопия. 5-е сут культивирования. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 200 мкм.

активируется экспрессия генов-маркеров *NANOG*, *KLF4*, *OCT4* (Lynch et al., 2020). ПСК с характеристиками, свойственным состоянию наивной плюрипотентности, были стабилизированы путем глобальной гиперактивации суперэнхансеров за счет применения полной среды mTeSR1 с добавлением ингибиторов циклин-зависимых киназ 8 и 19 (далее CDK8/19) (Lynch et al., 2020). Данные киназы, репрессируют активность комплекса медиаторов на энхансерах, предотвращая связывание РНК полимеразы II с промоторами (Jeronimo, Robert, 2017). В наивных ПСК, полученных путем ингибирования CDK8/19, не наблюдалось глобального удаления меток ДНК метилирования. Регуляция репрограммирования праймированных ПСК в наивное состояние плюрипотентности с ингибированной CDK8/19 происходила на уровне транскриптома. Она осуществлялась за счет увеличения экспрессии “наивных маркеров плюрипотентности” и подавления экспрессии генов, вовлеченных в дифференцировку клеток. В работе Линч с соавторами (2020) сигнальные пути FGF и TGFβ1 остаются активными, и ингибирование CDK8/19 достаточно для репрограммирования праймированных ПСК в наивное состояние. В нашей работе для репрограммиро-

вания клеток в наивное состояние плюрипотентности мы использовали ингибирование HDAC. Данный подход приводит к де-компактизации хроматина и повышению доступности промоторов и энхансеров. Благодаря его применению мы наблюдали у репрограммируемых клеток экспрессию KLF17 и генов *KLF4*, *YAP*, *DAZL*, *STELLA* (рис. 5).

У эмбрионов человека и мыши различные состояния плюрипотентности ПСК (наивное и праймированное), а также утрата ПСК способности образовывать внезародышевые клетки (троф-эктодерму и клетки амниона) с развитием в постимплантационный эпибласт регулируются за счет эпигенетического воздействия, модулирующего активность генома. В настоящее время исследования раннего эмбриогенеза человека сфокусированы на выявлении фундаментальных закономерностей и динамики эпигенетической регуляции генома. Эти эпигенетические регуляции тонко определяют состояние плюрипотентности ПСК *in vivo* и *in vitro*. Разработанный нами протокол получения наивных ИПСК *in vitro* позволит продвинуться в изучении данных процессов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате применения разработанных нами протокола и культуральных сред мы получили ИПСК с более ранним состоянием плюрипотентности, которые повышают экспрессию генов-маркеров наивных ИПСК, таких как *KLF17*, *KLF4*, *STELLA*, *REX1*, *YAP*. Мы показали, что репрограммирование праймированных ИПСК в состояние плюрипотентности *in vitro* осуществимо при их предварительной обработке HDACi и последующим культивированием в разработанной нами среде 2iL. Полученные в данных условиях ИПСК по морфологии и профилю экспрессии маркерных генов ПСК были сопоставимы с охарактеризованными в нашей работе контрольными наивными ИПСК в среде RSeT. Однако следует отметить, что для подтверждения эффективности репрограммирования ИПСК в наивное состояние необходимо проделать дополнительные эксперименты, такие как РНК секвенирование единичных клеток. Кроме того, функциональным подтверждением наивности ИПСК может быть их успешная дифференцировка в трофэктодерму и клетки плаценты.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-30015).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

## ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.К. Абдыев планировал экспериментальную работу, выполнил эксперименты, анализировал результаты и написал текст статьи, А.Л. Риппа написала и редактировала текст статьи, Н.А. Аракелян выполнила часть экспериментов, Е.А. Воротеяк отредактировала текст и участвовала в разработке концепции исследования, А.В. Васильев редактировал текст статьи и участвовал в разработке концепции исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ávila-González D., Portillo W., García-López G. et al. Unraveling the spatiotemporal human pluripotency in embryonic development // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.676998/BIBTEX>

Blakeley P., Fogarty N.M.E., Del Valle I. et al. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq // *Development*. 2015. V. 142. № 18. P. 3151–3165.

<https://doi.org/10.1242/dev.123547>

Chen H., Aksoy I., Gonnot F. et al. Reinforcement of STAT3 activity reprogrammes human embryonic stem cells to naive-like pluripotency // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. № 1.

<https://doi.org/10.1038/ncomms8095>

Chen T., Ueda Y., Xie S., Li E. A Novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active co-methylation // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 41. P. 38746–38754.

<https://doi.org/10.1074/JBC.M205312200>

Collier A.J., Panula S.P., Schell J.P. et al. Comprehensive cell surface protein profiling identifies specific markers of human naive and primed pluripotent states // *Cell Stem Cell*. 2017. V. 20. № 6. P. 874–890.e7.

<https://doi.org/10.1016/J.STEM.2017.02.014>

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.

<https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-770>

Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature*. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.

<https://doi.org/10.1038/292154a0>

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.

<https://doi.org/10.1038/nature12745>

Gharibi B., Gonçalves E., Nashun B. et al. A FGF2-mediated incoherent feedforward loop induces Erk inhibition and promotes naive pluripotency // *BioRxiv*. 2020.

<https://doi.org/10.1101/2020.11.11.378869>

Gordeev M.N., Bakhmet E.I., Tomilin A.N. Pluripotency dynamics during embryogenesis and in cell culture // *Russ. J. Dev. Biol.* 2021. V. 52 № 6. P. 379–389.

<https://doi.org/10.1134/S1062360421060059>

Göttlicher M., Minucci S., Zhu P. et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 24. P. 6969–6978.

<https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969>

Guo G., Meyenn F. Von, Rostovskaya M. et al. Epigenetic resetting of human pluripotency // *Development*. 2018. V. 145. № 8.

<https://doi.org/10.1242/dev.166397>

Guo G., Stirparo G.G., Strawbridge S.E. et al. Human naive epiblast cells possess unrestricted lineage potential // *Cell Stem Cell*. 2021. V. 28. № 6. P. 1040–1056.e6.

<https://doi.org/10.1016/J.STEM.2021.02.025>

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.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1004584107>

Huangfu D., Maehr R., Guo W. et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds // *Nat. Biotechnol.* 2008.

- V. 26. № 7. P. 795–797.  
<https://doi.org/10.1038/nbt1418>
- Ito K., Adcock I.M.* Histone acetylation and histone deacetylation // *Mol. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 1. P. 99–106.  
<https://doi.org/10.1385/MB:20:1:099>
- Jeronimo C., Robert F.* The mediator complex: at the nexus of RNA polymerase II transcription // *Trends Cell Biol.* 2017. V. 27. № 10. P. 765–783.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.07.001>
- Johnstone R.W.* Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002. V. 1. № 4. P. 287–299.  
<https://doi.org/10.1038/nrd772>
- Kilens S., Meistermann Di., Moreno Di. et al.* Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 1–13.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02107-w>
- Lagarkova M.A., Ereemeev A.V., Svetlakov A.V.* Human embryonic stem cell lines isolation, cultivation, and characterization // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 2010. V. 46. № 3–4. P. 284–293.  
<https://doi.org/10.1007/s11626-010-9282-6>
- Lau K.X., Mason E.A., Kie J. et al.* Unique properties of a subset of human pluripotent stem cells with high capacity for self-renewal // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 1–18.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16214-8>
- Leitch H.G., McEwen K.R., Turp A. et al.* Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. № 3. P. 311–316.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2510>
- Levenstein M.E., Ludwig T.E., Xu R.-H. et al.* Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal // *Stem Cells.* 2006. V. 24. № 3. P. 568–574.  
<https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2005-0247>
- Liu T., Li J., Yu L. et al.* Cross-species single-cell transcriptomic analysis reveals pre-gastrulation developmental differences among pigs, monkeys, and humans // *Cell Discov.* 2021. V. 7. № 1. P. 1–17.  
<https://doi.org/10.1038/s41421-020-00238-x>
- Liu X., Nefzger C.M., Rossello F.J. et al.* Comprehensive characterization of distinct states of human naive pluripotency generated by reprogramming // *Nat. Methods.* 2017. V. 4. № 11. P. 1055–1062.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4436>
- Lynch C.J., Bernad R., Martínez-Val A. et al.* Global hyperactivation of enhancers stabilizes human and mouse naive pluripotency through inhibition of CDK8/19 Mediator kinases // *Nat. Cell Biol.* 2020. V. 22. № 10. P. 1223–1238.  
<https://doi.org/10.1038/s41556-020-0573-1>
- Mazid M.A., Ward C., Luo Z. et al.* Rolling back human pluripotent stem cells to an eight-cell embryo-like stage // *Nature.* 2022. V. 605. № 7909. P. 315–324.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04625-0>
- Molè M.A., Coorens T.H.H., Shahbazi M.N. et al.* A single cell characterisation of human embryogenesis identifies pluripotency transitions and putative anterior hypoblast centre // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 1–12.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-23758-w>
- Nichols J., Smith A.* Naive and primed pluripotent states // *Cell Stem Cell.* V. 4. № 6. P. 487–492.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.015>
- Novo C.L.A.* Tale of two states: pluripotency regulation of telomeres // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9.  
<https://doi.org/10.3389/FCCELL.2021.703466>
- Okashita N., Kumaki Y., Ebi K. et al.* PRDM14 promotes active DNA demethylation through the Teneleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells // *Development.* 2014. V. 141. № 2. P. 269–280.  
<https://doi.org/10.1242/dev.099622>
- Posfai E., Schell J.P., Janiszewski A. et al.* Evaluating totipotency using criteria of increasing stringency // *Nat. Cell Biol.* 2021. V. 23. № 1. P. 49–60.  
<https://doi.org/10.1038/s41556-020-00609-2>
- Rossant J., Tam P.P.L.* New insights into early human development: lessons for stem cell derivation and differentiation // *Cell Stem Cell.* 2017. V. 20. № 1. P. 18–28.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.004>
- Saraiva N.Z., Oliveira C.S., Garcia J.M.* Histone acetylation and its role in embryonic stem cell differentiation // *World J. Stem Cells.* 2010. V. 2. № 6. P. 121.  
<https://doi.org/10.4252/WJSC.V2.I6.121>
- Seki Y.* PRDM14 is a unique epigenetic regulator stabilizing transcriptional networks for pluripotency // *Front. Cell Dev. Biol.* 2018. V. 6. № 12.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00012>
- Seto E., Yoshida M.* Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes // *Cold Spring Harb. perspect. biol.* 2014. V. 6. № 4. P. a018713.  
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018713>
- Shahbazi M.N.* Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back // *Development.* 2020. V. 147. № 14.  
<https://doi.org/10.1242/dev.190629>
- Sim Y.-J., Kim M.-S., Nayfeh A., Yun Y.-J. et al.* 2i Maintains a naive ground state in ESCs through two distinct epigenetic mechanisms // *Stem Cell Reports.* 2017. V. 8. № 5. P. 1312–1328.  
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.001>
- Smith A.G.* Embryo-derived stem cells: of mice and men // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003. V. 17. № 1. P. 435–462.  
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELL-BIO.17.1.435>
- Strahl B.D., Allis C.D.* The language of covalent histone modifications // *Nature.* 2000. V. 403. № 6765. P. 41–45.  
<https://doi.org/10.1038/47412>
- Takahashi K., Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell.* V. 126. № 4. P. 663–676.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Vallier L., Mendjan S., Brown S. et al.* Activin/Nodal signaling maintains pluripotency by controlling Nanog expression // *Development.* 2009. V. 136. № 8. P. 1339–1349.  
<https://doi.org/10.1242/dev.033951>

- Ware C.B., Nelson A.M., Mechem B. et al. Derivation of naive human embryonic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 12. P. 4484–4489. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319738111>
- Ware C.B., Wang L., Mechem B.H. et al. Histone deacetylase inhibition elicits an evolutionarily conserved self-renewal program in embryonic stem cells // Cell Stem Cell. 2009. V. 4. № 4. P. 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.03.001>
- Weatherbee B.A.T., Cui T., Zernicka-Goetz M. Modeling human embryo development with embryonic and extra-embryonic stem cells // Dev. Biol. 2021. V. 474. P. 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.12.010>
- Wolffe A.P. Sinful repression // Nature. 1997. V. 387. № 6628. P. 16–17. <https://doi.org/10.1038/387016a0>
- Yamamoto M., Suwa Y., Sugiyama K. et al. PRDM14-CtBP1/2-PRC2 complex regulates transcriptional repression during transition from primed to naïve pluripotency // J. Cell Sci. 2020. <https://doi.org/10.1242/jcs.240176>
- Yamauchi K., Ikeda T., Hosokawa M. et al. Overexpression of nuclear receptor 5A1 induces and maintains an intermediate state of conversion between primed and naïve pluripotency // Stem Cell Rep. 2020. V. 14. № 3. P. 506–519. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.01.012>
- Ying Q.-L., Wray J., Nichols J. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal // Nature. 2008. V. 453. № 7194. P. 519–523. <https://doi.org/10.1038/nature06968>

## Reprogramming of Primed Human Pluripotent Stem Cells into a Naive State

V. K. Abdyev<sup>1,\*</sup>, A. L. Rippa<sup>1</sup>, N. A. Arakelyan<sup>1</sup>, E. A. Vorotelyak<sup>1</sup>, and A. V. Vasiliev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

\*e-mail: [mailtovepa@gmail.com](mailto:mailtovepa@gmail.com)

Human pluripotent stem cells (PSCs) can be maintained in a naïve or primed state of pluripotency *in vitro*. Being in one state or another, PSCs have different potentials of differentiation into extra-embryonic and germinal derived cells of the embryo. In terms of the expression profile and epigenetic pattern of the genome, naïve PSCs are comparable to the cells of the inner cell mass of the blastocyst, while primed PSCs are similar in their characteristics to the cells of the postimplantation epiblast. Reprogramming of primed PSCs into the naïve state and maintenance of naïve PSCs in culture is a crucial issue in studying the epigenetic processes of preimplantation development of the human embryo and methods for efficient differentiation of PSCs into derivatives of embryonic and extra-embryonic cells. The aim of this work is to reprogram primed induced pluripotent stem cells (iPSCs) into a naïve pluripotent state to obtain a homogeneous population of iPSCs according to the state of pluripotency in culture. The task of this work is to develop a protocol and conditions for reprogramming primed iPSCs into a naïve state of pluripotency. In this work, naïve iPSCs were obtained under conditions of application of growth factors FGF2, TGFβ1 and inhibition of GSK3β and the MEK/ERK signaling pathway (2iF medium). Pretreatment of primed iPSCs with histone deacetylase inhibitors (HDACi) changes the cell morphology and gene expression profile of PSCs towards an earlier state of pluripotency. Using pretreatment of HDACi primed iPSCs followed by maintaining in 2iF medium, we obtained naïve iPSCs comparable in colony morphology and expression profile of naïve state marker genes with control naïve iPSCs obtained in RSeT medium. In order to confirm the naïve state of pluripotency of iPSCs obtained 2iF conditions, it is necessary to carry out single cell RNA sequencing.

**Keywords:** PSCs, iPSCs, naïve iPSCs, primed iPSCs, reprogramming, HDACi, 2iF medium, RSeT

**ТЕМПЕРАТУРНАЯ КОМПЕНСАЦИЯ  
ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА У ГОЛОВАСТИКОВ  
ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ ИЗ РАЗНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ  
ПОЛУОСТРОВА КАМЧАТКА (*Pelophylax ridibundus* Pallas 1771,  
ANURA: AMPHIBIA)**

© 2023 г. С. Ю. Клейменов<sup>а</sup>, \*, С. М. Ляпков<sup>б</sup>, Н. Д. Озернюк<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

<sup>б</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

\*e-mail: s.yu.kleymenov@gmail.com

Поступила в редакцию 18.01.2023 г.

После доработки 29.06.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Изучение особенностей энергетического метаболизма головастиков в популяциях озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* из нескольких водоемов полуострова Камчатка с разным температурным режимом выявило наличие температурной компенсации этого показателя. Показана линейная зависимость интенсивности их метаболизма от среднегодовой температуры места обитания популяции. Установлено, что наследуемые различия интенсивности потребления кислорода сформировались за 30–20 лет с момента первой интродукции вида в водоемы Камчатки. Высказано предположение о пределе адаптивных возможностей вида для стадии развития 39–40 головастиков озерной лягушки.

*Ключевые слова:* головастики, озерная лягушка, популяции Камчатки, интенсивность метаболизма, температурная компенсация

DOI: 10.31857/S0475145023040043, EDN: NSYMSV

## ВВЕДЕНИЕ

Темп развития и энергетический метаболизм пойкилотермных животных снижаются при понижении температуры среды. Однако у животных из зон с холодным климатом снижение метаболизма наблюдается в меньшей степени, чем у представителей родственных видов, обитающих в более теплых климатических зонах. В этом заключается один из основных механизмов адаптации к пониженной температуре у пойкилотермных животных, который компенсирует снижение энергетического метаболизма при пониженной температуре и дает возможность сохранять обеспечение организма энергией на уровне, достаточном для нормально-го протекания процессов жизнедеятельности.

Предположение о наличии компенсаторного механизма стандартного энергетического метаболизма у пойкилотермных обитателей полярных и субполярных широт было высказано известным датским физиологом Августом Крогом еще в 1916 г. (Krogh, 1916). Закономерности температурной компенсации были установлены на основе экспе-

риментальных данных об интенсивности потребления кислорода пойкилотермными животными, обитающими в разных широтах: от полярных до субтропических и тропических. Сравнение интенсивности метаболизма животных, адаптированных к разной температуре, производится путем ее экстраполяции к стандартной температуре 0 или 20°C с использованием так называемой стандартной кривой Крога (Krogh, 1914). На обширном экспериментальном материале было показано, что приведенная к стандартной температуре интенсивность энергетического метаболизма у обитателей северных широт выше, чем у близких видов, обитающих в более теплом климате (Schölander et al., 1953; Brett, 1972; Хочачка, Сомеро, 1977, 1988; Озернюк, 1992, 2000, 2006; Озернюк и др., 1993; Зотин, Зотин, 1999). Эта закономерность справедлива также и для амфибий из разных широт (Владимирова, Зотин, 1994; Lyarkov, Kleymenov, 2021). Температурная компенсация интенсивности потребления кислорода была показана также и в экспериментах по акклимации пойкилотерм-

ных животных к разным температурам (Campbell, Davis, 1978; Зотин, Зотин, 1999).

Температурные компенсации энергетического метаболизма проявляются на разных уровнях организации животных: организменном, тканевом, клеточном и молекулярном. Однако основным фактором регуляции в данном случае являются активность митохондрий и ферментов энергетического метаболизма. Прежде всего были выявлены различия в концентрации митохондрий у рыб, обитающих в разных широтах. Площадь митохондрий на электронно-микроскопических срезах красных и белых скелетных мышц у антарктических рыб была выше, чем у рыб из умеренных широт (Dunn, 1988).

Особенности температурной компенсации энергетического метаболизма у пойкилотермных исследованы в основном на взрослых животных. Данных по энергетическому метаболизму предметаморфозных стадий развития амфибий сравнительно мало и они противоречивы. Температурная компенсация была выявлена у головастиков *Limnodystes peronii* (Niehaus et al., 2011; Seebacher et al., 2014), но не обнаружена у головастиков *Lithobates sphenoccephalus*, *Lithobates catesbeianus*, *Scaphiopus holbrookii* и *Hyla chrysoscelis* (Rowe, Crandall, 2018). Температурной компенсации не наблюдалось после инкубации при различной температуре у головастиков *Pseudacris hypochondriaca* (Mueller et al., 2019). Известно также, что головастики шпорцевой лягушки – потомки особей из горной популяции имеют более высокую интенсивность метаболизма, чем потомки особей из равнинной популяции, при выращивании в одинаковых условиях (Wagener et al., 2021). Головастики остромордой лягушки из различных популяций демонстрируют первоначальное увеличение и последующее снижение интенсивности метаболизма по мере сокращения длительности сезона активности (Lindgren, Laurila, 2009). Однако при изучении акклимации важное значение имеет ее продолжительность от начала до момента измерения, поскольку ответ энергетического метаболизма часто развивается с перерегулированием (овершут), величина которого зависит от разности между начальной и конечной температурой в эксперименте.

Целью нашей работы был анализ данного явления у амфибий на относительно ранних стадиях предметаморфозного развития, а также выяснение темпов наследственного закрепления этого компенсаторного механизма. Местом обитания взрослых амфибий и головастиков были расположенные на полуострове Камчатка водоемы с разным гидротермальным режимом. Отдельный интерес представляет то, что современные популяции

озерной лягушки Камчатки основаны переселенными на полуостров взрослыми особями и, возможно, головастиками около 30 лет назад из популяций европейской части ареала вида с точно не установленной локализацией (Ляпков и др., 2017).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на головастиках озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*), выращенных из икры, которая была собрана в водоемах полуострова Камчатка, отличающихся температурным режимом. Эти водоемы находятся в местах обитания четырех популяций озерной лягушки, пространственно изолированных друг от друга. Икру собирали в водоемах Мутновской геотермальной электростанции (ГеоТЭС) (N 52.533273, E 158.197235), в водоемах у поселков Анавгай (N 56.052404, E 158.977499) и Термальный (N 52.929515, E 158.222408), а также в прудах и канале системы сброса воды ТЭЦ-2 города Петропавловск-Камчатский (N 53.022531, E 158.736552 и N 53.012398, E 158.745997). Популяции обитающей в этих местах озерной лягушки по многолетним наблюдениям численности, возрастного состава и соотношения полов характеризуются как устойчивые (Ляпков, 2016).

Температуру водоемов, в которых производили сбор икры, измеряли 2–3 раза в месяц в период активности и 1–2 раза в месяц в зимнее время на глубине 10–15 см. В работе использованы результаты измерений за 2 года.

Собранную в водоеме икру хранили в холодильнике до 10 сут при температуре 5°C, после чего доставили в лабораторию самолетом за 20 ч при температуре 18–20°C. По прибытию в лабораторию основная масса зародышей находилась на стадии поздней гастролы. Отход зародышей за время инкубации составил от 11 до 17%.

Инкубация икры, а также выращивание головастиков проводили в лабораторных условиях при одинаковой для всех выборок температуре 18°C в течение 20 сут.

Измерение интенсивности потребления кислорода проводилось на головастиках стадий 39–40 (начало активного питания). Стадии развития озерной лягушки и травяной лягушки (*Rana temporaria*) близки. Поскольку для травяной лягушки ранее были определены стадии эмбрионального и постэмбрионального развития (Дабагян, Слепцова, 1975), мы использовали эти данные в нашей работе для определения стадии развития озерной лягушки.

Концентрацию кислорода измеряли оксиметром Orion Star A323 RDO/DO meter (Thermo Fisher Scientific Inc.). Измерение скорости потребления

**Таблица 1.** Характеристика условий обитания популяций озерной лягушки в некоторых водоемах полуострова Камчатка

| Популяция |                   | Средняя температура воды, °С |         | Продолжительность, мес. |                   | Заселение водоема |
|-----------|-------------------|------------------------------|---------|-------------------------|-------------------|-------------------|
|           |                   | сезона активности            | годовая | зимовки                 | сезона активности |                   |
| 1         | Мутновская ГеоТЭС | 15                           | 7.5     | 9                       | 3                 | 2010              |
| 2         | пос. Анавгай      | 16                           | 10.5    | 6                       | 6                 | 2013              |
| 3         | пос. Термальный   | 20                           | 16.3    | 3                       | 9                 | 1995              |
| 4а        | ТЭЦ-2(а)          | 23                           | 20.8    | 2                       | 10                | 1989              |
| 4б        | ТЭЦ-2(б)          | 23                           | 20.8    | 2                       | 10                | 1989              |

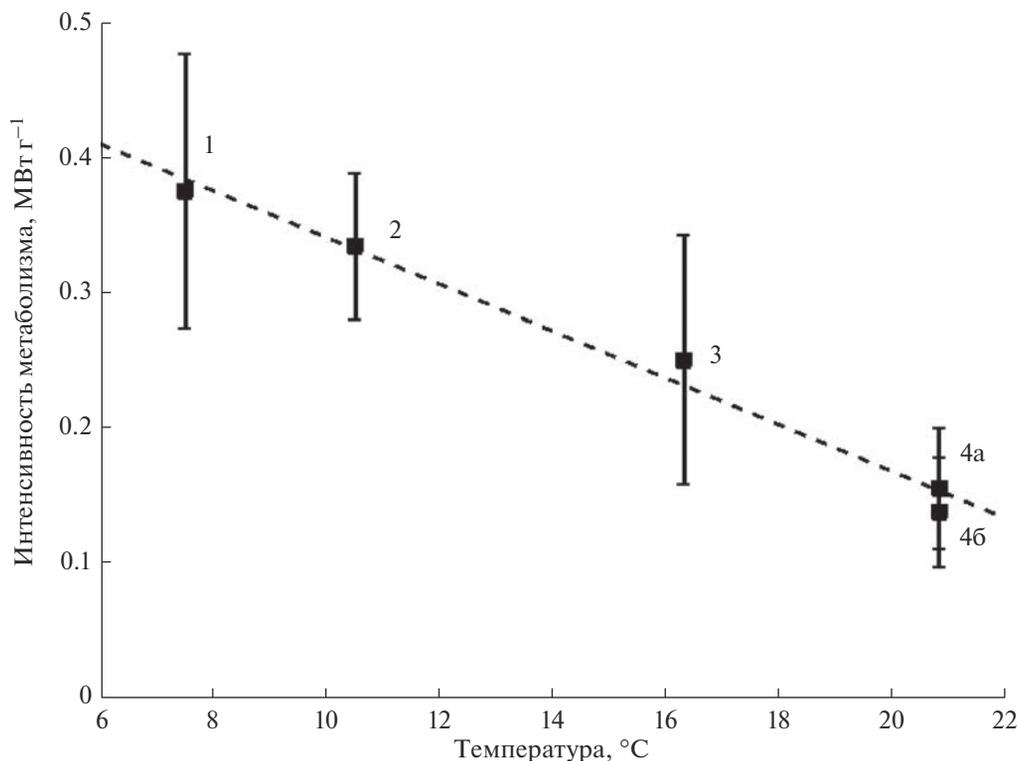
кислорода производили по его убыли в изолированных сосудах за одинаковый период времени. Головастики размещали в зависимости от размера по 1–4 особи в герметичном сосуде объемом 10 мл, заполненном водой из аквариума, где содержалась данная группа животных. В момент заполнения из каждого сосуда отбирали пробу воды объемом 1 мл для определения начальной концентрации кислорода. По истечении 20 мин из сосуда отбирали вторую пробу для измерения концентрации кислорода и взвешивали головастика на электронных весах Ohaus. Для расчета интенсивности метаболизма использовали оксикалорический коэффициент 5.59 Дж/мл O<sub>2</sub>. Полученные результаты были обработаны стандартными статистическими методами, достоверность различий массы тела и интенсивности дыхания между выборками определяли по непарному Т-критерию Стьюдента с использованием программы Matlab (MathWorks Inc.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Условия обитания амфибий в разных водоемах полуострова Камчатка заметно отличаются как по температурным показателям, так и по гидрологическому режиму, которые оказывают значительное влияние на индивидуальное развитие и энергетический метаболизм амфибий. Температурный режим и связанные с ним характеристики термальных водоемов, в которых производили сбор икры, включая среднюю годовую температуру, продолжительность зимовки и сезона активности животных приведены в табл. 1.

Поскольку водоемы ТЭЦ-2(а) и ТЭЦ-2(б) находятся в единой водной системе стоков ТЭЦ-2, головастики, полученные из собранной в этих водоемах икры, представляют собой две выборки из единой популяции. Температура и другие характеристики этих двух мест сбора икры также идентичны. Однако интенсивности потребления кислорода головастиками из этих двух водоемов несколько отличаются (табл. 2). Возможно, это вызвано иными факторами среды, влияющими на интенсивность энергетического метаболизма, но не вошедшими в настоящее исследование. Наиболее высокая среднегодовая температура обитания в водоемах ТЭЦ-2(а) и ТЭЦ-2(б) почти в 2.8 раза превышает этот показатель для водоема Мутновской ГеоТЭС. Продолжительность зимовки амфибий в водоемах ТЭЦ-2(а) и ТЭЦ-2(б) равна 2 мес., тогда как в водоеме Мутновской ГеоТЭС она составляет 9 мес. (табл. 1).

Наиболее высокая интенсивность потребления кислорода выявлена у головастика из популяции водоема Мутновской ГеоТЭС с самыми неблагоприятными условиями обитания: низкой средней годовой температурой и коротким сезоном активности (табл. 2, рис. 1). Более низкие показатели интенсивности потребления кислорода получены для головастика из водоемов поселка Анавгай и еще ниже из водоема поселка Термальный. Наиболее низкие величины интенсивности энергетического метаболизма были получены для головастика из водоемов ТЭЦ-2(а) и ТЭЦ-2(б). Температура этих водоемов выше по сравнению с водоемом поселка Термальный (табл. 1, рис. 1). Различия интенсивности энергетического метаболизма у головастика из разных водоемов ста-



**Рис. 1.** Интенсивность метаболизма (средние значения и стандартное отклонение) головастиков озерной лягушки 39–40 стадии развития в зависимости от среднегодовой температуры водоема: 1 – Мутновская ГеоТЭС; 2 – пос. Анавгай; 3 – пос. Термальный; 4а, 4б – ТЭС-2.

статистически достоверны, за исключением водоемов ТЭС-2(а) и ТЭС-2(б).

На основании полученных данных установлено, что интенсивность метаболизма  $q$  головастиков из разных популяций связана линейной зави-

симостью со среднегодовой температурой  $T_{сг}$  водоемов их обитания:

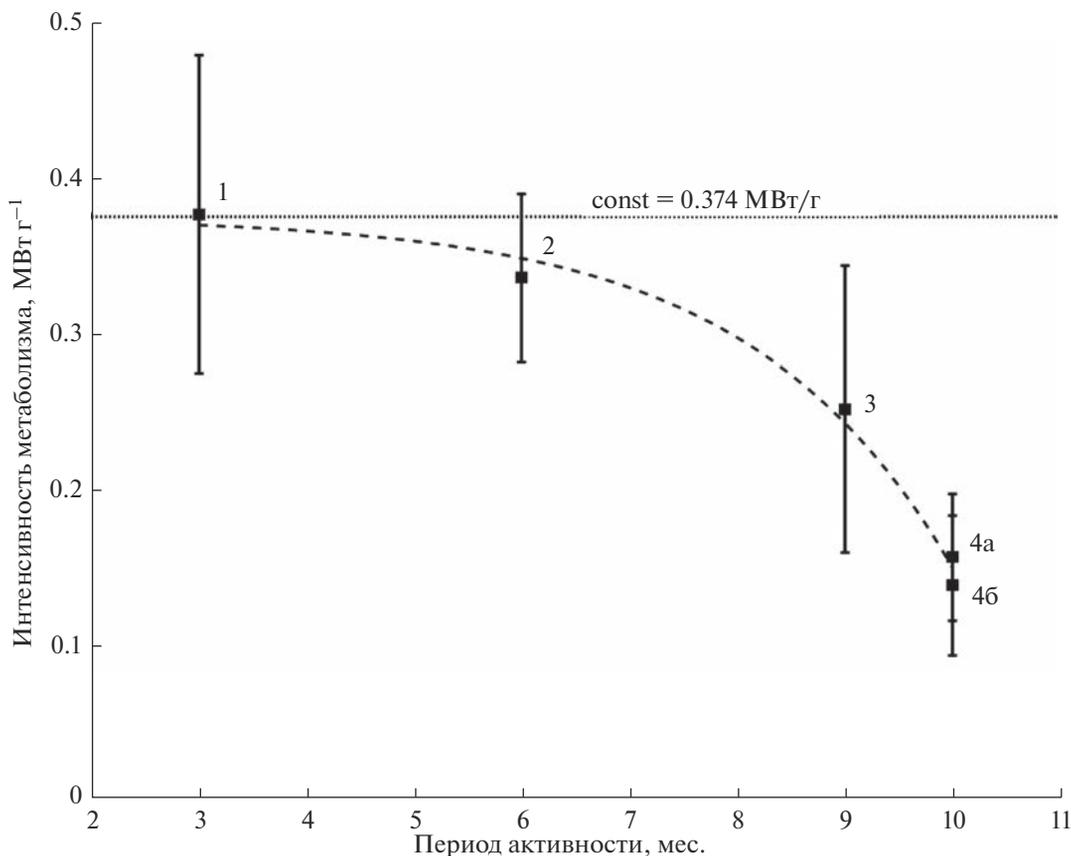
$$q = aT_{сг} + b \tag{1}$$

с коэффициентами  $a = -0.017$  и  $b = 0.51$  и высокой корреляцией ( $R^2 = 98\%$ ). Существенно, что ран-

**Таблица 2.** Интенсивность потребления кислорода и метаболизма у головастиков из разных водоемов полуострова Камчатка

| Популяция           | Масса тела, мг |           | Метаболизм, МВт г <sup>-1</sup> |           | Потребление O <sub>2</sub> , мкл г <sup>-1</sup> мин <sup>-1</sup> |           | Количество особей |
|---------------------|----------------|-----------|---------------------------------|-----------|--|-----------|-------------------|
|                     | средн.         | ст. откл. | средн.                          | ст. откл. | средн.   | ст. откл. |                   |
| 1 Мутновская ГеоТЭС | 19.76          | 5.14      | 0.376                           | 0.102     | 4.0  | 1.1       | 36                |
| 2 пос. Анавгай      | 33.81          | 6.33      | 0.335                           | 0.054     | 3.6  | 0.6       | 24                |
| 3 пос. Термальный   | 17.41          | 5.43      | 0.251                           | 0.092     | 2.7  | 1.0       | 35                |
| 4а ТЭС-2(а)         | 19.55          | 7.25      | 0.138                           | 0.041     | 1.5  | 0.4       | 31                |
| 4б ТЭС-2(б)         | 17.62          | 3.58      | 0.156                           | 0.045     | 1.7  | 0.5       | 35                |

*Примечание:* Различия по средним значениям метаболизма и потребления кислорода между всеми популяциями значимые ( $p < 0.05$ ), кроме различий между популяциями 4а и 4б ( $p = 0.28$ ).



**Рис. 2.** Интенсивность метаболизма (средние значения и стандартное отклонение) головастиков озерной лягушки 39–40 стадии развития в зависимости от продолжительности периода активности в водоеме обитания: 1 — Мутновская ГеоТЭС; 2 — пос. Анавай; 3 — пос. Термальный; 4а, 4б — ТЭЦ-2.

ние этапы индивидуального развития головастиков, используемых в наших экспериментах, протекали при одинаковой температуре от начала инкубации до момента измерения интенсивности потребления кислорода. Однако различия в величине компенсаторной реакции энергетического метаболизма сохранились в выборках головастиков из популяций, адаптированных к разным температурам. Этот факт свидетельствует о сохранении особенностей метаболизма лягушек из разных популяций в последующих поколениях, несмотря на идентичные условия выращивания головастиков.

Результатом различий температурных режимов водоемов является также разная продолжительность периода активности лягушек. Сопоставление метаболизма головастиков  $q$  и продолжительности периода активности лягушек  $t$  в разных популяциях показало нелинейный характер их взаимосвязи, которая была описана эмпирическим экспоненциальным уравнением вида:

$$q = A - b \exp(ct + d) \quad (2)$$

с высокой корреляцией ( $R^2 = 96\%$ ). Поскольку указанная зависимость эмпирическая, интерес представляет только коэффициент  $A$ , который показывает величину асимптоты уравнения и равен  $0.374 \text{ МВт/г}$  ( $b = 13 \times 10^{-5}$ ;  $c = 0.53$ ;  $d = -0.15$ ). Наличие асимптоты для зависимости уровня метаболизма головастиков от продолжительности периода активности лягушек и практически совпадение с ней величины метаболизма головастиков из водоема Мутновской ГеоТЭС может указывать на то, что популяция в этом водоеме достигла предела диапазона физиологической нормы вида по темпу индивидуального развития и интенсивности метаболизма головастиков (рис. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Водоемы полуострова Камчатка представляют широкий спектр температурных режимов за счет подпитки термальными водами разной интенсивности и температуры. Интродуцированные около 30 лет назад амфибии частично расселились самостоятельно, частично были искусственно

перенесены в различные водоемы полуострова. К сожалению, интродукция произошла спонтанно, из-за чего отсутствуют точные данные о популяции-доноре. Тем не менее, популяции озерной лягушки полуострова представляют интересную модель для изучения адаптивных возможностей вида и скорости формирования устойчивых адаптаций к условиям среды обитания.

Наши исследования показали, что за прошедшие 30 лет сформировались адаптированные к разным температурным режимам популяции лягушек, различающиеся по интенсивности метаболизма головастика на 39–40 стадии развития. Эти различия соответствуют концепции температурной компенсации метаболизма, ранее неоднократно подтвержденной экспериментами на взрослых особях разных таксонов (Schölander et al., 1953; Carlisle, Cloudsley-Thompson, 1968; Brett, 1971, 1972; Хочачка, Сомеро, 1977, 1988; Dunn, 1988; Озернюк, 1992). Следует ожидать, что отмеченная нами закономерность будет наблюдаться и у взрослых особей озерной лягушки. Аналогичный факт установлен для взрослых азиатских жаб (*Bufo gargarizans*), у которых отмечено повышение интенсивности потребления кислорода по мере уменьшения длительности сезона активности в местах обитания их популяций (Tan et al., 2021).

Представляет интерес относительно короткий срок — от 30 до 5 лет (табл. 1) формирования устойчивых различий метаболизма озерной лягушки в популяциях, оказавшихся в различных температурных условиях. Филогенетическая устойчивость межпопуляционных различий стандартного энергетического метаболизма на стадии 39–40 развития головастика подтверждается тем, что они наблюдались при выращивании головастика при единой для всех выборке температуре 18°C.

Связь интенсивности метаболизма головастика с продолжительностью периода активности лягушек, описанная выше единым экспоненциальным уравнением с асимптотой, позволяет заключить, что наблюдаемые изменения метаболизма не выходят за адаптивный диапазон вида. Существование предела в уравнении (2) говорит о том, что дальнейшее ускорение онтогенеза до полного завершения метаморфоза за счет повышения интенсивности метаболизма, скорее всего, невозможно. В аналогичной ситуации в слабо подогреваемых водоемах Свердловской области развитие головастика идет до завершения метаморфоза, однако выход на сушу происходит сравнительно поздно, и часть головастика, попадающих под осеннее похолодание, зимуют в водоеме и завершают метаморфоз только весной следующего года (Ляпков, Фоминых, 2017).

Описанная в настоящей работе температурная компенсация метаболизма головастика озерной лягушки может быть обеспечена изменением активности основных метаболических ферментных систем, как это было отмечено в ряде исследований (Sidell, 1977; Dunn, 1988; Демин и др., 1990; Озернюк, 1992; Озернюк и др., 1993; Ozernyuk et al., 1994), либо изменениями чувствительности к соотношению АДФ/АТФ в клетке посредством комбинации изоформ АМФ-активируемой протеинкиназной (АМРК) системы (Jeon, 2016). Следствием этого может быть увеличение относительной доли митохондрий в объеме клетки (Озернюк, 2000). Однако открытым остается вопрос о механизме закрепления этих свойств в потомстве, что может стать предметом дальнейших исследований.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Полевые исследования, сбор материала и квалифицированная доставка в лабораторию выполнены в рамках госзадания (Ч. 2 № ЦИТИС АААА-А16-116021660031-5). Лабораторные исследования, инкубация икры, выращивание головастика, измерение интенсивности метаболизма проводились в рамках Государственного задания ИБР РАН 0088-2021-0009.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы внесли одинаковый вклад в данное исследование и подготовку статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Владимирова И.Г., Зотин А.И. Стандартный обмен в классе амфибий // Изв. РАН. Сер. биол. 1994. № 1. С. 81–92.
- Дабаян Н.В., Слепцова Л.А. Травяная лягушка *Rana temporaria*. Объекты биологии развития. М.: Наука. 1975. С. 442–563.
- Демин В.И., Андросова И.М., Озернюк Н.Д. Возрастные изменения цитохромной системы и особенности ее строения у рыб // Докл. АН СССР. 1990. Т. 315. С. 1492–1497.

- Зотин А.И., Зотин А.А.* Направление, скорость и механизмы прогрессивной эволюции. 1999. М.: Наука. 320 с.
- Ляпков С.М.* Места находок и состояние популяций озерной лягушки на Камчатке // Вестник Тамбовского университета. Серия: естественные и технические науки, 2016. Т. 21. № 5. С. 1821–1824.
- Ляпков С.М., Ермаков О.В., Титов С.В.* Распространение и происхождение двух форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* complex (Anura, Ranidae) на Камчатке по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК // Зоол. журн. 2017. Т. 96. № 11. С. 1384–1391.
- Ляпков С.М., Фоминых А.С.* Внутрипопуляционная изменчивость длительности водной фазы жизненного цикла озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Anura, Amphibia) и размеров головастика и метаморфов // Эволюционная и функциональная морфология позвоночных. Материалы I Всероссийской конференции и школы для молодых ученых памяти Феликса Яновича Дзержинского, Т-во научных изданий КМК, г. Москва, 2017. С. 192–199.
- Озернюк Н.Д.* Механизмы адаптаций. 1992. М.: Наука. 272 с.
- Озернюк Н.Д.* Температурные адаптации. 2000. М.: Изд-во Московского Университета. 205 с.
- Озернюк Н.Д.* Экологическая энергетика животных. 2006. М.: Т-во научных изданий КМК. 168 с.
- Озернюк Н.Д., Булгакова Ю.В., Демин В.И., Андросова И.М., Стельмащук Е.В.* Механизмы эволюционных и онтогенетических адаптаций метаболизма у пойкилотермных // Изв. РАН. Сер. биол. 1993. № 5. С. 703–713.
- Хочачка П., Сомеро Дж.* Стратегия биохимической адаптации. 1977. Изд-во “Мир”. 398 с.
- Хочачка П., Сомеро Дж.* Биохимическая адаптация. 1988. Изд-во “Мир”. 567 с.
- Brett J.R.* Energetic responses of salmon to temperature: A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) // Amer.Zool. 1071. V. 1. P. 99–113.
- Brett J.R.* The molecular demand for oxygen in fish, particularly salmonids, and a comparison with other vertebrates // Respirat. Physiol. 1972. V. 14. P. 151–170.
- Campbell R.S., Davies P.S.* Temperature acclimation in the teleostei, *Blennius pholis*: changes in enzyme activity and cell structure // Comp. Biochem. Physiol. 1978. V. 61B. P. 165–167.
- Carlisle D.B., Claudsley-Thompson J.L.* Respiratory function and thermal acclimation in tropical invertebrates // Nature. 1968. V. 218. P. 684–687.
- Dunn J.F.* Low-temperature adaptation of oxidative energy production in cold-water fishes // Canad. J. Zool. 1988. V. 66. P. 1098–1104.
- Jeon S.M.* Regulation and function of AMPK in physiology and diseases // Exp. Mol. Med. 2016. V. 48(7): e245. PMID: ; PMCID: PMC4973318. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.8127416781>
- Krogh A.* The quantitative relations between temperature and standard metabolism in animals. Intern. J. Phys. Chem. Biol. 1914. V. 1. P. 491–508.
- Krogh A.* The respiratory exchange of animal and man. London: Longman, Green. 2016. 173 p.
- Lindgren B., Laurila A.* Physiological variation along a geographical gradient: is growth rate correlated with routine metabolic rate in *Rana temporaria* tadpoles? // Biological J. Linnean Society. 2009. V. 98. P. 217–224.
- Lyapkov S.M., Kleymenov S.Yu.* Interpopulational differences in the developmental rate and oxygen consumption in tadpoles of moor frog (*Rana arvalis* Nilsson, 1842. Anura: Amphibia) // Russian J. Developmental Biology. 2021. V. 52. № 2. P. 151–154.
- Mueller C.A., Bucsky J., Korito L., Manzanares S.* Immediate and persistent effects of temperature on oxygen consumption and thermal tolerance in embryos and larvae of the Baja California chorus frog, *Pseudacris hypochondriaca* // Frontiers in Physiology. June 2019. V. 10. Article 754.
- Niehaus A.C., Wilson R.S., Seebacher F., Franklin C.E.* Striped marsh frog (*Limnodynastes peronii*) tadpoles do not acclimate metabolic performance to thermal variability // J. Experimental Biology. 2011. V. 214. P. 1965–1970.
- Ozernyuk N.D., Klyachko O.S., Polosukhina E.S.* Acclimation temperature affects the functional and structural properties of lactate dehydrogenase from fish (*Misgurnus fossilis*) skeletal muscles // Comp. Biochem. Physiol. 1994. V. 107B. P. 141–145.
- Scholander P.F., Flagg W., Hoch R.J., Irving L.* Studies on the physiology of frozen plants and animals in the Arctic // J. Cell. Comp. Physiol. Suppl. 1953. V. 1. P. 1–56.
- Seebacher F., Grigaltchik V.S.* Embryonic developmental temperatures modulate thermal acclimation of performance curves in tadpoles of the frog *Limnodynastes peronii* // PLOS ONE. September 2014. V. 9. № 9. e106492.
- Sidell B.D.* Turnover of cytochrome *c* in skeletal muscle of green sunfish (*Lepomis cyanellus* R.) during thermal acclimation // J. Exp. Zool. 1977. V. 199. P. 233–250.
- Tan S., Li P., Yao Z., Liu G., Yue B., Fu J., Chen J.* Metabolic cold adaptation in the Asiatic toad: intraspecific comparison along an altitudinal gradient // J. Comp. Physiol. B. 2021. V. 191. № 4. P. 765–776.
- Wagener C., Kruger N., Measey J.* Progeny of *Xenopus laevis* from altitudinal extremes display adaptive physiological performance // J. Experimental Biology. 2021. V. 224. № 7. jeb233031.

**Temperature Compensation of Energy Metabolism in Tadpoles of the Marsh Frog from Different Populations of the Kamchatka Peninsula (*Pelophylax ridibundus* Pallas 1771, Anura: Amphibia)**

**S. Yu. Kleymenov<sup>1,\*</sup>, S. M. Lyapkov<sup>2</sup>, and N. D. Ozernyuk<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

<sup>2</sup>*Department of Evolutionary Biology, Faculty of Biology, Moscow State University, Leninskie Gory d. 1, str. 12, Moscow, 119234 Russia*

*\*e-mail: s.yu.kleymenov@gmail.com*

The study of the peculiarities of energy metabolism in populations of the marsh frog *Pelophylax ridibundus* from several reservoirs of the Kamchatka peninsula with different temperature regimes revealed the temperature compensation of this parameter in tadpoles. The linear dependence of the tadpoles metabolic rate on the average annual temperature of habitat was shown. It was found that stable inherited differences in the intensity of tadpoles metabolism were formed in 30–20 years from the moment of the first introduction of the species into the reservoirs of Kamchatka. An assumption is made about the limit of adaptive diapason of the species for the development stage of 39–40 tadpoles of the marsh frog.

*Keywords:* tadpoles, *Pelophylax ridibundus*, Kamchatka populations, metabolism intensity, temperature compensation

## ИСТОРИЯ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

УДК 576.7

### РОЖДЕНИЕ МОРФОМЕХАНИКИ

© 2023 г. А. С. Ермаков<sup>a, b, c, \*</sup>

<sup>a</sup>Московский государственный университет, биологический факультет, кафедра эмбриологии,  
Ленинские Горы, 1/12, Москва, 119991 Россия

<sup>b</sup>Институт биологии развития РАН, Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

<sup>c</sup>Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, Группа РНК-эпигенетики и механизмов геномной стабильности,  
Пр. 60-летия Октября, 7/1, Москва, 117312 Россия

\*e-mail: [ermakov99@mail.ru](mailto:ermakov99@mail.ru)

Поступила в редакцию 19.01.2023 г.

После доработки 02.07.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

В начале 1970-х в СССР Л.В. Белоусов и его коллеги выдвигают гипотезу о возможной роли механических сил и напряжений в организации развивающихся живых систем. Авторы открыли стадиоспецифические паттерны механических напряжений в эмбриональном развитии амфибий и показали в дальнейшем, что механические напряжения необходимы для организации морфогенеза и клеточных дифференцировок. В результате многолетней работы коллектива эмбриологов под руководством Л.В. Белоусова рождается новая междисциплинарная наука на стыке биологии развития и механики – морфомеханика. В XXI в. происходит активное изучение механизмов механозависимой экспрессии генов, клеточной и ядерной механотрансдукции. Идея об организующей роли механических сил и напряжений в живых системах продолжает быть актуальной.

*Ключевые слова:* морфогенез, клеточная дифференцировка, морфомеханика, механобиология, интегральность развития, биология развития

DOI: 10.31857/S0475145023040031, EDN: NCWMFI

### ВВЕДЕНИЕ

В ходе индивидуального развития живых организмов выстраивается трехмерный план строения, происходит согласование множества биологических и биохимических процессов на разных уровнях организации, – от молекул до макроморфологии. Еще в конце XIX в. были открыты эмбриональные регуляции: показано, что живые организмы способны к существенной коррективке нарушений, возникающих в ходе развития и что судьба части зародыша зависит от ее позиции в целом (см. Белоусов, 2005).

В начале XX в. русский биолог Александр Гаврилович Гурвич выдвинул идею поля (морфогенетического или биологического поля) как организующего принципа, определяющего на надклеточном уровне судьбу клеток (Gurwitsch, 1912; см. также Belousov, 1997, 2015). Эта идея повлияла на развитие теоретической биологии XX в.; следует отметить, однако, что, несмотря на глубоко проработанные абстрактные построения, Гурвич не смог объяснить конкретные физические механизмы “морфогенетического поля”.

В XX в. появляются научные теории, делающие упор на объяснение механизмов интеграль-

ности развития живых организмов. Среди конкретных физических факторов, лежащих в основе таких механизмов, рассматриваются механические силы и напряжения, действующие на живые ткани. Одна из научных школ данного направления появилась в СССР в 1970-е годы, ее возникновение связано с именем профессора МГУ Льва Владимировича Белоусова, на формирование взглядов которого, в свою очередь, повлиял Александр Гаврилович Гурвич.

Целью данной статьи является анализ экспериментальных и теоретических достижений этого междисциплинарного научного направления, которое сам Л.В. Белоусов позднее назвал “морфомеханикой” (Belousov, Grabovsky, 2006). Приоритетное внимание будет уделено рассмотрению раннего периода (1970–1990-е годы) развития этого направления.

### МЕХАНИКА ЖИВОГО И ИНТЕГРАЛЬНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКОГО МОРФОГЕНЕЗА

В 1970-е и 1980-е появляются работы, в которых механические силы и напряжения рассматриваются как интегрирующие факторы биологического морфогенеза. Немецкий анатом Блешмидт описал

структуры механических напряжений в развитии человека и выдвинул предположение о том, что подобные структуры встречаются в развитии других животных и даже растений и могут влиять на это развитие (Bleichschmidt, Gasser, 1978).

В те же годы американским ученым Альбертом Харрисом и его коллегами была показана ведущая роль механических напряжений в самоорганизации клеток в культуре. Исследователи изучали механику клеточных движений на разных эластических субстратах, таких как латекс и коллаген (Harris, 1973; Harris et al., 1980; Harris et al., 1981). Было показано, что при высевании гомогенной клеточной культуры на эластичном субстрате происходило формирование регулярных клеточных кластеров за счет того, что клетки создавали определенные паттерны напряжения субстрата, на котором они росли (Harris et al., 1984; Belousov, 2012). Это пример реальной самоорганизации живой системы на основе механических напряжений: клетки объединяются в кластеры на микроуровне, а порождаемое клетками натяжение субстрата выступает в роли дальнедействующих организующих факторов.

Независимо от Блешмидта и Харриса, в начале 1970-х в США возникает интегральное учение о самоорганизации живого на основе Теории Тенсегрити (от английского tensegrity, tensional integrity, то есть напряженная интегральность) — системе взглядов, описывающих самонапряженные конструкции, связанной с именем американского инженера и мыслителя-энциклопедиста Р.Б. Фулера. Самонапряженными считают такие конструкции, которые имеют стабильную форму за счет постоянного стягивания элементов (а не за счет сдвливания, как большинство архитектурных конструкций). В 1970-х идеи самонапряженности проникают в биологию благодаря американскому ученому Дональду Ингберу, это научное направление получило название “Био-Тенсегрити”.

С точки зрения теории Био-Тенсегрити, цитоскелет механически сбалансирован. Силы натяжения в этой модели порождаются цитоскелетными микрофиламентами и промежуточными филаментами, они приложены к упругим структурам, таким как микротрубочки и элементы внеклеточного матрикса (Ingber, 2003a; Ingber, 2003b). Силы сбалансированы, и клетка имеет стабильную форму.

Принципы самонапряженности можно применить не только к отдельно взятой клетке, но и к разным уровням организации живого, как субклеточному, так и надклеточному. Так, в молекулах белков и ДНК относительно жесткие участки сочетаются с более гибкими и растяжимыми, так что структура биологических молекул может стабилизироваться по принципам Тенсегрити. С другой стороны, надклеточные тканевые и орган-

ные структуры тоже могут быть организованы как самонапряженные конструкции, причем механические напряжения могут передаваться между разными уровнями (см. обзор Ermakov, 2018a).

В эту же эпоху, в начале 1970-х, независимо от достижений западных коллег, самобытная научная школа, сделавшая упор на изучении механических сил и напряжений в регуляции морфогенеза, появилась в СССР. Рождение нового научного направления связано с именем профессора кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ Льва Владимировича Белоусова.

### ОТКРЫТИЕ ПАССИВНЫХ И АКТИВНЫХ ДЕФОРМАЦИЙ ЗАРОДЫШЕВЫХ ТКАНЕЙ

Научная деятельность Александра Гавриловича Гурвича пришлась на первую половину XX в., жить и творить ему пришлось в очень сложную эпоху (Belousov, 1997). В 1948 г., в результате конфликта с лжеученым Т.Д. Лысенко, он был изгнан с поста директора Института экспериментальной медицины и до конца жизни (1954) не занимал официальных позиций, но организовал лабораторию дома и продолжал заниматься наукой (Belousov, 1997). Внук А.Г. Гурвича (сын его дочери Натальи) Лев Владимирович Белоусов был одним из последних его учеников, и интерес к проблеме целостности живых систем он пронес через всю свою жизнь.

В начале 1970-х, независимо от исследовательских групп, возглавляемых А. Харрисом и Д. Ингбером, Л.В. Белоусов и его ученики Я.Г. Дорфман и В.Г. Черданцев приходят к выводу о том, что механические силы и напряжения играют важную роль в организации морфогенеза в ходе развития животных. Первые публикации в этом направлении (Белоусов и др., 1974; Belousov et al., 1975) были посвящены деформации фрагментов ткани зародышевой амфибий.

В 1974 г. в экспериментах на ранних стадиях развития травяной лягушки *Rana temporaria* авторы показали, что эмбриональные ткани способны к деформациям разных типов — быстрых энергонезависимых и медленных, для осуществления которых необходим расход энергии. Авторы вырезали фрагменты эмбриональной покровной и нейральной эктодермы, мезодермы, участков нервной трубки и комбинированных эктомезодермальных фрагментов на разных стадиях: от средней гастролы до ранней хвостовой почки (Белоусов и др., 1974).

Большая часть деформаций сводилась к скручиванию фрагмента, в некоторых случаях внутренней поверхностью внутрь (их назвали + деформации), в некоторых — внутренней поверхностью наружу (– деформации). Фрагменты оказались способны изменять форму немедленно либо в те-

чение латентного периода в несколько минут, деформации второго типа сопровождались клеточными перестройками. Авторы назвали деформации первого типа пассивными, а деформации второго типа — активными.

Немедленные (пассивные) деформации были присущи всем исследованным фрагментам. В наиболее выраженной форме они наблюдались в эктодермальных складках зародыша, в частности, в субнейральной складке, идущей вдоль тела вентральнее нейрального зачатка. Немедленные деформации не подавлялись действием низкой температуры и цианида калия, то есть являются пассивными релаксациями к формам с меньшей потенциальной энергией. Авторы пришли к выводу, что широкое распространение пассивных деформаций свидетельствует о существовании характерного паттерна механических напряжений в складках интактного зародыша (Белоусов и др., 1974).

Деформации второй категории происходили медленнее (не менее 1–2 мин), они подавлялись при понижении температуры или добавления цианида. Эти деформации приводили к сглаживанию и активному сокращению общей поверхности фрагмента. В ходе таких деформаций происходили комплексные перестройки клеток, требующие затрат энергии. Такого рода деформации авторы назвали активными (Белоусов и др., 1974). Позже было показано, что активные деформации подавляются действием цитохалазина В, а пассивные — не подавляются (Belousov et al., 1975). Эти данные позволили авторам высказать предположение о том, что пассивные деформации связаны с релаксацией предсуществующих в тканях механических напряжений и движений, а активные — с работой активных механохимических систем клеток (Belousov et al., 1975; Belousov et al., 1976).

### ПАТТЕРНЫ МЕХАНИЧЕСКИХ НАПРЯЖЕНИЙ В РАЗВИТИИ

Авторы сосредоточились на изучении типов пассивных деформаций, что позволило им построить карты паттернов механических напряжений в развитии амфибий (Belousov et al., 1976). Эксперименты проводили на зародышах травяной лягушки *Rana temporaria*. Авторы вырезали фрагменты эмбриональных тканей на стадиях поздней бластулы, средней и поздней гастролы, ранней нейрулы и ранней хвостовой почки, а также проводили сепаровки культивируемых эксплантатов. Изучали деформации фрагментов, их гистологическое строение и изменения формы клеток при деформациях (Белоусов и др., 1974). Оказалось, что на каждой стадии развития зародыши обладают характерным полем напряжений, которое может быть представлено в виде карты (Белоусов и др., 1974; Belousov et al., 1976; Belousov, 1978).

При построении карт перестроек архитектуры напряжений авторы выяснили, что пассивные деформации могут быть сведены к нескольким типам (рис. 1, Belousov et al., 1976; см. также Ермаков, 2018b):

1. Сокращение поверхности фрагмента без изгиба означает, что обе поверхности фрагмента в одинаковой степени эластично растянуты (рис. 1а).

2. Изгиб фрагмента без сокращения боковых стенок клеток свидетельствует о преимущественном эластичном сокращении одной из поверхностей (рис. 1в).

3. Сильный изгиб фрагмента с сокращением боковых стенок, вплоть до округления клеток, говорит о том, что до операции были растянуты и внешние и боковые клеточные стенки (рис. 1с).

4. Рассечение двуслойного фрагмента приводит к расхождению его краев (рис. 1D1), а изоляция участка слоя — к его складыванию (рис. 1D2). В этих случаях сокращаются растянутые клетки в основании складки. Наряду с натяжением внешней и внутренней поверхностей фрагмента имеются линии натяжения, идущие по боковым стенкам растянутой клетки (клеток) и пересекающие клеточный пласт.

5. Резкий (-) изгиб, локализованный на границе механического разделения (сепаровки) тканей, но без определенной прелокализации в интактном зародыше (рис. 1е).

6. (-) складывание (рис. 1F1) и (-) скручивание (рис. 1F2) отсепарованной зоны, при которых происходит симметризация исходно скошенных клеток, указывают на неравномерное растяжение как внешней, так и внутренней поверхностей и на эластичное растяжение боковых клеточных стенок.

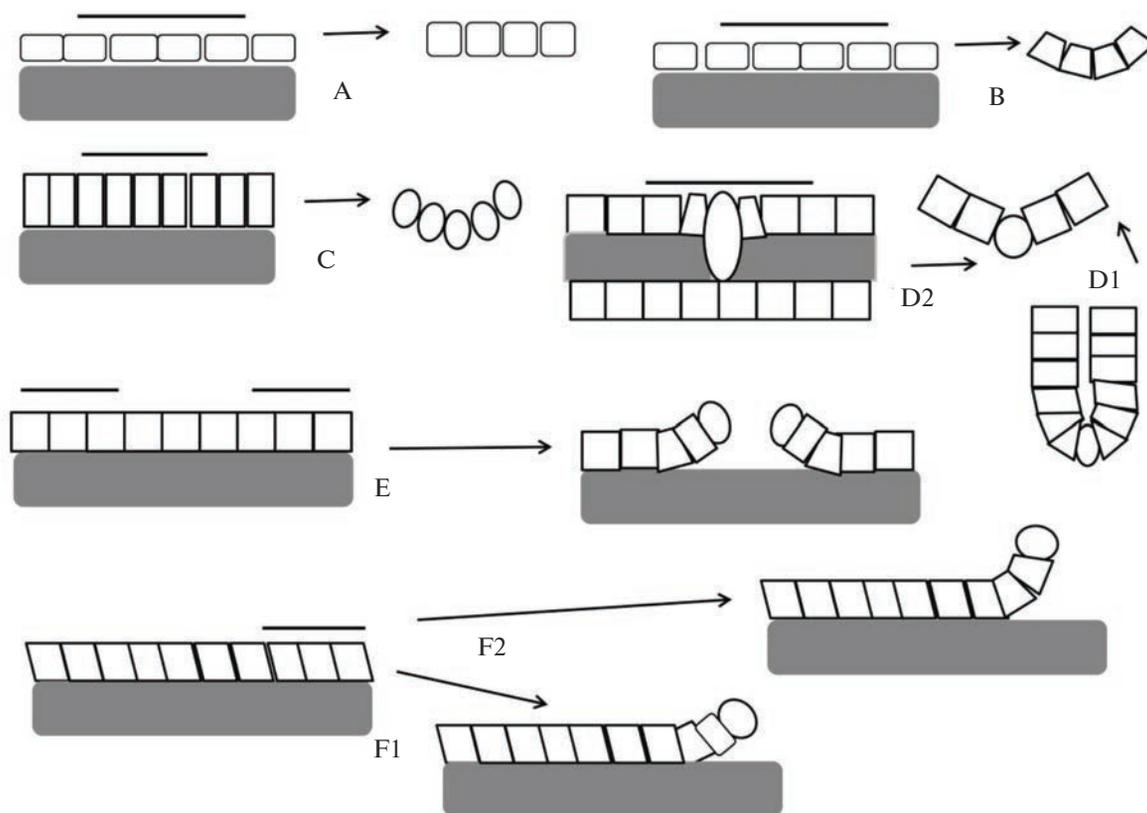
Все упомянутые деформации указывают на растяжение по крайней мере одной из поверхностей пласта, а деформации из пунктов 3, 4 и 6 указывают еще на наличие поверхностей натяжения, пересекающих клеточные пласты.

Авторы назвали такие линии натяжений кросс-линиями. На гистологическом уровне они обычно соответствуют плотным тяжам сцепленных растянутых клеток. Сравнивая паттерны кросс-линий с ходом нормального морфогенеза, авторы выявили морфогенетическое значение кросс-линий (Belousov et al., 1976):

1) В областях наиболее плотного расположения они соответствуют путям активной миграции клеток.

2) Узкие сквозные кросс-линии намечают границы закладок.

Рассечение эмбриональных тканей кросс-линиями натяжений является основным средством морфологической дифференцировки зародышей амфибий. Каждая последующая топологическая



**Рис. 1.** Различные типы деформаций отсепарованных слоев эмбриональных тканей. Сокращение поверхности фрагмента без изгиба (A). Изгиб фрагмента без сокращения боковых стенок клеток свидетельствует о преимущественном эластичном сокращении одной из поверхностей (B). Сильный изгиб фрагмента с сокращением боковых стенок, вплоть до округления клеток (C). Рассечение двухслойного фрагмента приводит к расхождению его краев (D1), а изоляция участка слоя – к его складыванию (D2). Резкий (-) изгиб, локализованный по границе сепаровки (рис. 1e). (-) складывание (1F1) и (-) скручивание (1F2) отсепарованной зоны, при которых происходит симметризация исходно скошенных клеток. Оригинальный источник: Belousov et al., 1976. Данная модификация рисунков по: Ermakov, 2018b.

трансформация подготавливается всем ходом предыдущего морфогенеза. При этом имеются определенные правила (Belousov et al., 1976).

3) Вновь возникающие кросс-линии ориентируются по направлению максимального растяжения поверхности зародыша, обусловленного предшествующими морфогенетическими процессами.

4) возникающие кросс-линии стремятся соединиться друг с другом или выйти на поверхность, и, таким образом, стать замкнутыми.

Например, клеточные движения при гастрюляции, ориентированные кранио-каудально, растягивают дорсальную поверхность зародыша и вызывают скосы боковых стенок близких к blastopore клеток. Именно параллельно направлению растяжения зародыша располагаются сагиттальная, парасагиттальная и субнейральные кросс-линии, впоследствии образующие единые замкнутые поверхности.

В ходе развития осевых органов серии кросс-линий формируют сплошные поверхности (Belousov, 1978). Более детальные микроскопические исследования позволили сделать вывод, что рост кросс-линий представляет собой движение по эмбриональной ткани волны возрастания поверхностей межклеточных контактов вдоль некоторого направления (волны контактной поляризации, увеличения поверхностей контактов между клетками) (Belousov, 1978). Зарождающиеся в эмбриональных тканях кросс-линии имеют сначала неопределенную форму, как бы находясь в состоянии поиска; формирование закономерного рисунка натяжения связано с образованием сквозных, выходящих на поверхность кросс-линий и их интеграцией в кросс-плоскости. Закладка кросс-линий напряжений определяется предшествующими процессами, а сама, в свою очередь, детерминирует локализацию и направление последующих активных миграций клеток (Belousov et al., 1976; Belousov, 1978). Возможность новой волны контактной

поляризации зависит от внутренних свойств тканей, определяемых, в частности, происхождением индукционных процессов (Belousov, 1978). В работе 1978 года показано, что первичный индуктор вызывает формирование полос поляризованных клеток в вентральной эктодерме ранней гаструлы амфибий (Белоусов, 1978). Автор сращивал фрагменты вентральной эктодермы стадии ранней гаструлы *Rana temporaria* с фрагментами либо хордомезодермы, либо наружных слоев энтодермы от эмбрионов тех же стадий и показал, что в именно в первом случае (то есть в том случае, когда происходит нейральная индукция) в энтодермальной части экспериментальных зародышей развивались линии поляризованных клеток (Белоусов, 1978). В описанных выше экспериментах авторы выявили специфичные для каждой исследованной стадии развития паттерны механических напряжений, а это позволяет говорить, что эти паттерны сменяют друг друга в ходе развития зародыша (Belousov et al., 1976; Belousov, 1978).

#### ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА РОЛИ МЕХАНИЧЕСКИХ НАПРЯЖЕНИЙ КАК ФАКТОРОВ ИНТЕГРАЛЬНОСТИ МОРФОГЕНЕЗА

Работы, проведенные в последующие годы, показали, что механические напряжения регулируют как морфогенетические движения, так и клеточные дифференцировки, а нарушение паттернов механических напряжений приводит к серьезным нарушениям развития (Belousov et al., 1990; Ermakov, Belousov, 1998; см. также Belousov, 2012; Ermakov, 2018b). В конце 1970-х и первой половине 1980-х происходит теоретическое переосмысление паттернов механических напряжений как факторов интеграции морфогенеза, важным шагом в этом направлении было сотрудничество с математиком Б.Н. Белинцевым, которое положило начало математическому моделированию механических аспектов биологического морфогенеза (Belintsev et al., 1985, Belintsev et al., 1987).

Одно из наиболее фундаментальных событий в морфогенезе — формирование доменов морфологически поляризованных клеток. Удачным результатом сотрудничества с Белинцевым было создание модели эпителиальных морфогенезов, объясняющая разбиение пласта клеток на домены с помощью механических напряжений. Модель построена на основе явления, открытого Л.В. Белоусовым, В.Г. Чеданцевым и Н.Н. Лучинской — активных деформаций эмбриональной ткани, связанных с удлинением клеток и увеличением площади их латеральных контактных поверхностей (контактная поляризацией клеток) (Cherdantsev, 1977; Luchinskaia, Belousov, 1977; Belousov, Chernavskii, 1977).

В основу модели легло несколько фундаментальных положений, к тому времени уже экспериментально подтвержденных:

1. Компетенция к контактной поляризации возникает на определенных стадиях развития у большинства клеток.

2. Контактная поляризация является кооперативным процессом: поляризованные клетки расположены группами. Процесс распространяется фронтом от уже поляризованных клеток к еще не поляризованным.

3. Процесс поляризации можно рассматривать как процесс перехода из одного устойчивого состояния в другое через неустойчивое.

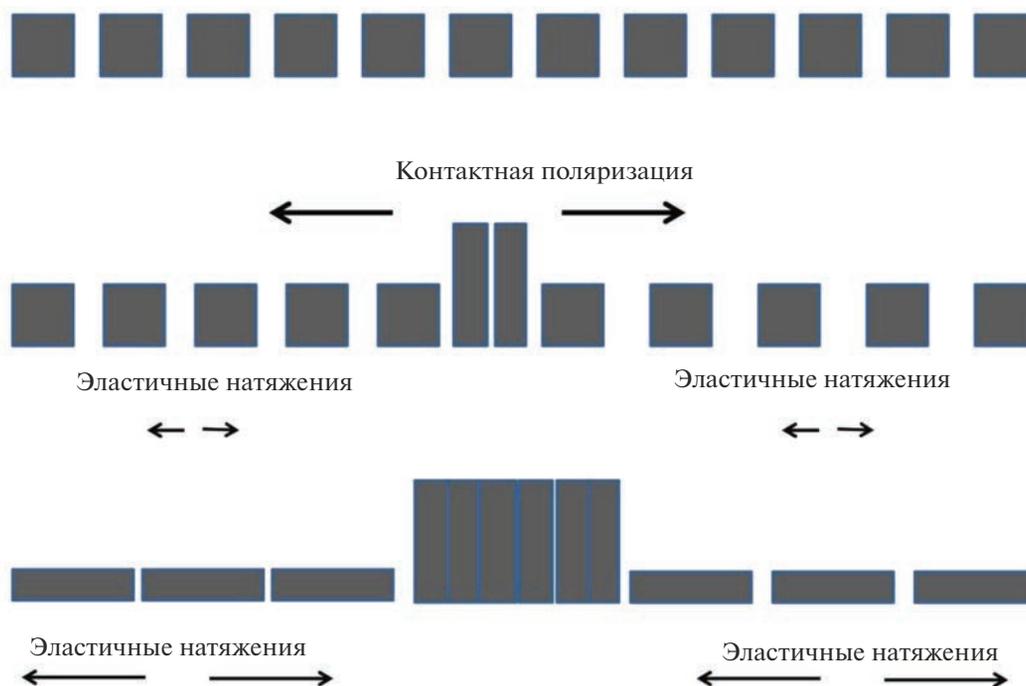
4. Волна контактной поляризации может распространяться вдоль направления поляризации отдельных клеток, поперек этого направления или под углом к этому направлению.

5. Распространение волны контактной поляризации порождает механические напряжения за счет того, что поляризованные клетки растягивают еще не поляризованные клетки.

Модель предполагает, что имеется система локального контроля (контактные взаимодействия клеток и перестройки цитоскелета) и система глобального контроля (упругие механические напряжения). Если в исходном состоянии упругих напряжений в пласте нет, клетки обладают компетенцией к поляризации. Если уровень натяжения, действующий на не растянутые клетки пласта, превышает пороговый уровень, контактная поляризация подавляется. Анализ модели показал, что, если локальное возмущение запускает поляризацию в пласте, то в результате происходит разбиение пласта на два домена — поляризованных и неполяризованных клеток (рис. 2). При этом соотношение размеров поляризованного и неполяризованного доменов не зависит от общего размера системы. Таким образом, введение в модель упругих напряжений как факторов глобальной регуляции, позволяет объяснить явление эмбриональной регуляции.

Из модели эпителиальных морфогенезов Белинцева (Belintsev et al., 1987) следует, что пласт эктодермы разбивается на два домена при достижении определенного уровня натяжений в неполяризованной части пласта. Расширение домена поляризованных клеток можно ожидать в результате релаксации механических напряжений: в случае падения напряженности пласта ниже определенного уровня контактная поляризация может захватить большее число клеток.

Предсказания данной модели согласуются с данными, полученными в ходе экспериментов по релаксации механических напряжений на стадии ранней гаструлы шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Belousov et al., 1990). Релаксацию паттерна напряжений авторы производили с помощью вер-



**Рис. 2.** Модель эпителиальных морфогенезов Белинцева. Принимается, что сначала нет эластических напряжений в клеточном пласте, который состоит из одинаковых клеток (вверху). Небольшое локальное возмущение запускает процесс клеточной контактной поляризации в пласте (в середине). Волна контактной поляризации распространяется по пласту. Клетки, вступившие в контактную поляризацию, сильно меняют свои пропорции, за счет этого возрастают эластические механические натяжения областей пласта, еще не вовлеченных в процесс контактной поляризации. Механические натяжения подавляют волну контактной поляризации в этих областях. В результате этого процесса, клеточный пласт разделяется на два домена – поляризованных и неполяризованных клеток (внизу). Оригинальный источник: Belintsev et al., 1985, 1987. Данная модификация рисунков по: Ermakov, 2018b.

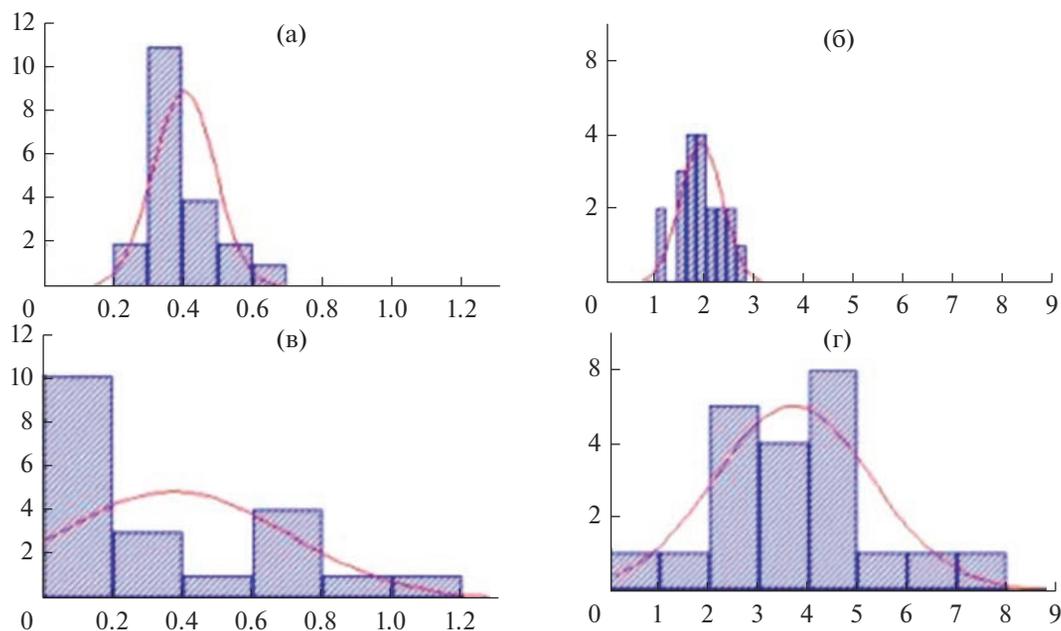
тикального разреза вегетативного полушария, в разрез вращивали клин эмбриональной ткани из вентрального полушария другого зародыша. Такая операция приводила к релаксации напряжений в эктодерме, клин из вентральной ткани препятствует быстрому восстановлению паттерна механических напряжений.

В ходе гастрюляции амфибий происходит разбиение эктодермы на домен сильно поляризованных клеток, из которых разовьется нервная ткань и домен неполяризованных клеток, из которых разовьется покровная эктодерма. Авторы показали, что в экспериментальных “релаксированных” эмбрионах область поляризованных клеток распространялась более вентрально и латерально, чем в контроле, занимала большую площадь, кроме того, эта область была очень нерегулярной.

Разбиение эктодермы на домен поляризованных и неполяризованных клеток можно интерпретировать как механизм детерминации судьбы участка эктодермы к развитию в нервную ткань (домен поляризованных клеток) или в покровы тела. В случае расширения домена поляризованных клеток логично ожидать увеличения объема

нервной ткани в зародышах по сравнению с контролем, и морфометрические данные это подтверждают. В исследовании было показано, что на более поздних стадиях (через 2 дня после операции) наблюдалось достоверное возрастание общего объема нервной ткани у экспериментальных “релаксированных” эмбрионов по сравнению с нормальными (Belousov et al., 1990).

Релаксация механических напряжений на стадии бластулы приводит к еще более драматическим последствиям (Ermakov, Belousov, 1998). Релаксацию кольцевых напряжений у зародышей шпорцевой лягушки на стадии поздней бластулы осуществляли с помощью разреза вегетативного полушария. Кратковременным эффектом такой операции было исчезновение бластоцеля, перемешивание клеток и увеличение числа слоев крыши бластоцеля. Затем на поверхности зародышей возникали впадины и хоботообразные выросты, нарушалось нормальное развитие зародышей (Ermakov, Belousov, 1998). Часть зародышей инкубировалась в течение 2 сут, после чего проводилось морфометрическое изучение зачатков осевых органов у экспериментальных, “релаксированных” и нор-



**Рис. 3.** Диаграммы распределения объемов закладок хорды и нервной ткани у нормальных зародышей *X. laevis* и зародышей после релаксации механических напряжений. Распределение объемов зачатков хорды (а) и зачатка нервной ткани (б) у нормальных эмбрионов шпорцевой лягушки *X. laevis* на стадии хвостовой почки в сравнении с распределением объемов зачатков хорды и нервной ткани у эмбрионов после операции по релаксации механических напряжений (в и г соответственно). Для каждой диаграммы использованы данные по 20 образцам. Горизонтальная ось: объемы, условные единицы; вертикальная ось: число случаев. В случае “релаксированных” зародышей заметно возрастает изменчивость объемов зачатков. Оригинальный источник: Ermakov, Belousov, 1998. Данная модификация рисунков по: Luchinskaia et al., 2018.

мальных зародышей. Среднее значение объема хорды не изменялось у “релаксированных” зародышей (рис. 3в) по сравнению с контролем (рис. 3а), но разброс значений увеличивался. Средний объем нейральной закладки у релаксированных зародышей (рис. 3г) существенно превышает этот показатель у нормальных (рис. 3б), что хорошо согласуется с моделью эпителиальных морфогенозов Белинцева (Belintsev et al. 1985; Belintsev et al., 1987). Большой интерес представляет факт высокой вариабельности как объемов зачатков хорды, сомитов, нервной ткани, так и их соотношений в случаях экспериментальных “релаксированных” эмбрионов. На основании анализа морфометрических данных была высказана гипотеза о том, что паттерны механических напряжений можно рассматривать как систему, ограничивающую вариабельности дифференцировочных потенциалов клеток (Ermakov, Belousov, 1998). Аналогичными по замыслу можно считать более современные работы, посвященные изучению дифференцировочных потенциалов мезенхимных стволовых клеток в зависимости от механических свойств субстрата (например, Engler et al., 2006). В данной работе строго заданные параметры жесткости субстрата приводили к ограничению типов получаемых дифференцировок. Однако, сравнивать результаты этой работы с результатами исследований и гипотезами Л.В. Белоусова напря-

мую сложно, так как он говорил не просто о количественном значении одного из механических параметров, а о паттернах механических напряжений.

Вернемся к экспериментам Л.В. Белоусова по релаксации механических напряжений. Часть “релаксированных” зародышей культивировали в течение нескольких часов после операции в гипотоническом растворе, а затем переносили в изотонический раствор, у большинства зародышей после такой обработки происходила нормализация развития (Ermakov, Belousov, 1998). Видимо, кратковременное культивирование в гипотоническом растворе приводит к быстрому восстановлению паттерна механических напряжений. Нормализация развития “релаксированных” зародышей происходит также в случае растягивания их на стеклянных иглах (Belousov, Ermakov, 2001).

Как примирить это факты с утверждением, что морфология будущего зародыша детерминируется еще на стадии зиготы в связи с поворотом оплодотворения (Gerhart et al., 1988)? Ответ может быть таковым: для реализации детерминированности, установленной на стадии зиготы, необходимо сохранение возникшего паттерна механических напряжений хотя бы до стадии гастрюлы. Даже кратковременное нарушение этого паттерна приводит к аномалиям развития.

### ОРГАНИЗУЮЩАЯ РОЛЬ МЕХАНИЧЕСКИХ НАПРЯЖЕНИЙ В ОРИЕНТАЦИИ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ ДВИЖЕНИЙ

А можно ли не ослабить, а, напротив, искусственно усилить уровень механической напряженности в участке эмбриональной ткани? В исследовании организующей роли механических напряжений в ориентации морфогенетических движений аксиализации Лакирев и соавторы (Lakirev et al., 1988) использовали остроумно сконструированную камеру, с помощью которой они могли растягивать полоску латекса. Участки маргинальной зоны ранней гастролы шпорцевой лягушки прикрепляли раневой поверхностью на специально обработанный латекс. Такая система позволяла дозированно прилагать механические напряжения извне к фрагменту эмбриональной ткани (маргинальной зоны). Маргинальную область растягивали перпендикулярно анимально-вегетативной оси, то есть перпендикулярно тому, как это происходит в норме. В качестве контроля использовали эксплантаты, которые помещали либо на предварительно растянутый, либо на нерастянутый латекс. Растяжение дорсальной маргинальной зоны в 2 раза приводило к тому, что в эксплантатах развивались хорда и нервная ткань, причем хорда ориентировалась по оси растяжения эксплантата, то есть перпендикулярно тому направлению, как это происходит в нормальном развитии. Изменение времени растяжения от 10 мин до 24 ч практически не влияло на возникающие дифференцировки и их ориентацию. В контрольных эксплантатах, помещенных как на нерастянутый, так и на растянутый латекс, вплоть до 24 ч инкубации не обнаруживалось зачатков органов. Такие эксплантаты распадались на отдельные клетки. Минимальное время растяжения для нормального развития самого эксплантата сопоставимо со временем сборки цитоскелетных структур и ассоциированных с ними контактов (Belousov, Luchinskaia, 1983).

В дальнейших исследованиях было показано, что не только дорсальная маргинальная зона, но и фрагменты эмбриональной ткани из других участков эмбриона, таких как вентральная эктодерма и эктодерма крыши, меняют свою форму в ответ на искусственно приложенные механические напряжения (Belousov, Luchinskaia, 1995; Белоусов и др., 1999). Растяжение фрагментов вентральной эктодермы ранней гастролы шпорцевой лягушки вызывало активные клеточные перестройки и изменение формы фрагментов, в течение нескольких часов эксплантаты вытягивались в направлении растяжения (Belousov, Luchinskaia, 1995). Кроме того, искусственно приложенное натяжение влияло на формирование клеточных контактов и выростов клеток. Авторами было подмечено, что на базаль-

ной (обращенной к латексу) поверхности эксплантата образуются выросты, вытягивающиеся в направлении растяжения латекса.

В работе 1999 г. Л.В. Белоусов и его коллеги вырезали квадратные фрагменты эктодермы крыши ранней гастролы (Белоусов и др., 1999). Потом они складывали эти фрагменты складывали внутренними поверхностями друг к другу и ждали их срастания. Затем такие “сэндвичи” растягивали на агарозе с помощью стеклянных игл (Белоусов и др., 1999). В контрольной серии закрепленные с помощью игл на субстрате сэндвичи оставляли нерастянутыми. Авторы обнаружили, что ни изоляция фрагмента ни само по себе введение иглы не приводило к поляризации клеток либо началу их движения. В эксплантатах, подвергаемых растяжению, начинается ориентация клеток в направлении ближайшего источника растягивающей силы: в них запускается волна поляризации клеток, распространяющаяся от источника растяжения (Белоусов и др., 1999). В случае сильного (примерно в 2 раза) растяжения в “сэндвиче” начинаются движения интеркаляции клеток.

На основании этих экспериментов авторы сделали вывод о том, что клетки эктодермы ранней гастролы амфибий способны улавливать ближайший к ним источник натяжений, активно двигаться в сторону этого источника и передавать эстафету контактными путем на несколько рядов более удаленных клеток (Белоусов и др., 1999). Реакция клеток носит вначале пассивный характер, но в течение 10 мин становится активной, что проявляется в формировании ламеллы с множественными микроворсинками. Затем такие же изменения поведения и морфологии появляются у соседних клеток, более удаленных от источника силы. Авторы ввели новый термин “тензотаксис”, который расшифровывают в названии статьи: “Тензотаксис — коллективное движение эмбриональных клеток вверх по градиентам механических натяжений” (Белоусов и др., 1999). Сейчас этот термин стал общепринятым, а исследования тензотаксиса проводятся, в основном, с использованием клеточных культур (см., например, Lin et al., 2009).

Есть еще один важный аспект, о котором необходимо упомянуть, говоря о работах по изучению эффектов искусственно приложенных напряжений к эксплантатам эмбриональной ткани. Эксперименты по растяжению фрагментов вентральной эктодермы показали, что на клеточном уровне ответ на механическое напряжение направлен на то, чтобы скомпенсировать воздействие, при этом происходила не просто компенсация, но гиперкомпенсация такого воздействия (Belousov, Luchinskaia, 1995). Если произвести поперечный разрез эксплантатов сразу после растяжения и спустя некоторое время, то по степени расхождения краев раны можно заключить, что

степень механической напряженности спустя некоторого времени существенно снижается (Belousov, Luchinskaia, 1995). Если бы реакция клеток эксплантата была направлена только на компенсацию приложенного механического напряжения, то его форма вернулась бы к изначальной. Однако, эксплантат не только “сбрасывает” приложенное механическое напряжение, но и активно вытягивается, приобретая гантелевидную форму. В результате извне приложенного механического напряжения фрагмент эмбриональной ткани сначала пассивно растягивается, затем начинаются процессы, не только компенсирующие растяжение, но и ведущие к активному вытяжению эксплантата (Belousov, Luchinskaia, 1995).

Авторы заключают, что регуляция морфогенетических процессов может базироваться на самоорганизации на основе механически-опосредованных обратных связей между активными процессами, порождающими механические напряжения и пассивными напряжениями тканей; такие обратные связи направлены на восстановление изначальных значений напряжений, однако, этот процесс идет с “некоторым перехлестом” (Belousov, Luchinskaia, 1995).

#### ТЕОРИЯ БЕЛОУСОВА–МИТТЕНТАЛЯ

К середине 1990-х, благодаря многолетним исследованиям Л.В. Белоусова и его коллег, становится понятно, что механические силы и напряжения играют важную роль в организации морфогенеза и клеточных дифференцировок (Lakirev et al., 1988; Ermakov, Belousov, 1998; Belousov et al., 2006; Belousov, 2008). Механические силы и напряжения, действуя на эмбриональные ткани, вызывают в них пассивные деформации, что, в свою очередь, приводит к активным клеточным перестройкам. В ходе многолетних дискуссий выстраивается концепция, согласно которой эмбриональное развитие можно представить, как серию сменяемых друг друга пассивных деформаций и активных перестроек. Ключевым пунктом этой системы представлений становится предположение о том, что процессы, направленные на восстановление механических напряжений, идут с некоторым перехлестом, проскакивая мимо точки равновесия (гипервосстановление) (Belousov et al., 2006; Belousov, 2008; Belousov, 2012). Сам Лев Владимирович Белоусов считал, что решающую роль в становлении гипотезы о гипервосстановлении механических напряжений сыграли его длительные дискуссии с американским биологом Джейм Миттенталем из Университета Иллинойса во время его стажировки в США в 1992 г. (Белоусов, Миттенталь, 1992). Позднее эта система взглядов получила название “Гипотезы гипервосстановления механических напряжений” или “Теории Белоусова–Миттенталья”. Авторы теории базиро-

вались на уже открытых к этому времени положениях:

- механические напряжения влияют на живые ткани;
- живые клетки и ткани могут порождать механические напряжения;
- пассивные и активные напряжения взаимодействуют через живые структуры в ходе развития.

Хорошо известно, что организм, подвергнутый внешнему воздействию, стремится компенсировать это воздействие. Авторы предположили, что механическое воздействие вызывает в эмбриональных тканях процессы, направленные на компенсацию этого воздействия. Однако, такого рода изменения не только компенсируют воздействия, но и действуют с перехлестом.

Исходя из этих соображений, было добавлено два важных положения к уже известным:

- порождаемые тканями активные механические напряжения направлены на компенсацию механического воздействия на ткани;
- в ходе развития живые системы могут “проскакивать” через точку равновесия.

Основные положения Теории Белоусова–Миттенталья можно проиллюстрировать на примере гастрюляции амфибий (Belousov et al., 2006; Belousov, 2008). В ходе этого процесса происходит несколько типов морфогенетических движений (Keller, 1981, 1984). Инвагинация зародышевого материала начинается в дорсальной губе бластопора и продолжается затем через боковые губы и вентральную губу. Процессы эпиболии (радиальной интеркаляции в крыше бластоцеля и латеро-медиальной интеркаляции в материале дорсальной маргинальной зоны и во ввернувшемся материале осевой мезодермы) облегчают процесс инвагинации.

Рассмотрим, каким образом эти движения координируются в сложный морфогенетический процесс, исходя из гипотезы гипервосстановления механических напряжений (Belousov et al., 2006; Belousov, 2008).

На стадии бластулы, крыша бластоцеля растягивается благодаря тургорному давлению. Клетки стенок бластоцеля образуют плотные контакты. Транспорт ионов из наружной среды в бластоцель происходит через стенки бластоцеля. На наружной мембране клеток стенок бластоцеля расположены ионные каналы, а на внутренней – ионные насосы для для  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ . Это приводит к избытку ионов в бластоцеле, что ведет к нереносу воды в бластоцель и повышению тургорного давления (см. Белоусов, 2005). Крыша бластоцеля подвержена пассивным напряжениям, в этой области зародыша запускаются процессы радиальной интеркаляции, благодаря которым формиру-

ются активные силы, и происходит компенсация пассивных натяжений.

Натяжение крыши бластоцеля компенсируется, однако, процесс радиальной интеркаляции “проскакивает” через точку равновесия и не останавливается. Чрезмерное расширение крыши бластоцеля приводит к пассивному сдавливанию дорсальной маргинальной зоны.

Формируется дорсальная губа бластопора, этот активный процесс компенсирует сжатие дорсальной маргинальной зоны.

Благодаря формированию губы бластопора начинается инвагинация материала зародыша внутрь. Однако, инвагинация происходит слишком сильно, она не только компенсирует процесс пассивного сжатия маргинальной зоны, но делает это с некоторым перхлестом. Возникает пассивное растяжение как маргинальной зоны, так и близлежащей латеральной бластопоральной зоны. Начинаются активные морфогенетические движения в латеральной бластопоральной зоне.

Поскольку дорсальная маргинальная зона испытывает пассивное растяжение, в ней начинаются активные движения латеро-медиальной интеркаляции, дорсальная маргинальная зона активно вытягивается, и это компенсирует пассивное растяжение данной зоны. Однако, активное вытяжение маргинальной зоны происходит с некоторым перхлестом, что приводит к пассивному растяжению ввернувшейся мезодермы и пассивному сжатию прилегающей непосредственно к губе части маргинальной зоны, что способствует подворачиванию новой порции зародышевого материала внутрь зародыша.

Заключительную часть гастрюляции можно представить, как чередование процессов латеромедиальной интеркаляции в ввернувшемся и в неввернувшемся пластах и инвагинации. Поскольку ввернувшийся и неввернувшийся пласты сопряжены через внеклеточный матрикс, во ввернувшемся материале формируются пассивное растяжение. Чтобы его компенсировать, во ввернувшемся пласте начинаются клеточные движения латеро-медиальной интеркаляции. Активное растяжение ввернувшегося пласта формирует пассивное растяжение неввернувшегося, в котором в свою очередь начинаются движения латеромедиальной интеркаляции и т.д. Параллельно с этим продолжают движения инвагинации, благодаря которым новый зародышевый материал вворачивается внутрь зародыша.

Примечательно, что, если отсепарировать только то ввернувшийся слой мезодермы на стадии самой ранней гастрюлы, то он сокращается, что говорит о том, что данный участок пассивно растянут (Belousov, 2008). С другой стороны, на более поздней стадии та же самая операция приводит к вытягиванию фрагмента ввернувшегося

материала, что свидетельствует об активных силах, ведущих к вытягиванию (Belousov, 2008). В приведенную выше стройную схему гастрюляции амфибий хорошо укладываются экспериментальные данные, такие как формирование хорды в направлении искусственно приложенного натяжения (Lakirev et al., 1988), а также неспособность эмбрионов к нормальному ходу гастрюляции в случае описанной выше релаксации напряжений и восстановление такой способности в случае кратковременной инкубации релаксированных зародышей в гипотоническом растворе (Ermaikov, Belousov, 1998).

### СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ МЕХАНИЧЕСКИХ СИЛ И НАПРЯЖЕНИЙ В ОРГАНИЗАЦИИ ЖИВЫХ СИСТЕМ И НАУЧНОЕ НАСЛЕДИЕ ШКОЛЫ Л.В. БЕЛОУСОВА

Упорно работая в течение нескольких десятилетий, профессор Л.В. Белоусов и его ученики создали новую междисциплинарную науку на стыке биологии развития и механики, главной задачей которой является изучение роли механических сил и напряжений в регуляции биологического морфогенеза и клеточных дифференцировок. Поскольку работы в этой области велись с начала 1970-х, более 40 лет, то терминология авторов и даже название новой науки варьировали. Использовались такие термины, как “роль механических напряжений в организации развития”, “роль механических сил в организации онтогенеза”, “механические силы как интегральные факторы развития”, “обратные связи на основе биомеханики”, “биомеханика морфогенеза”, “цитомеханика развития”, морфодинамика. С середины 2000-х все чаще используется термин “морфомеханика” (Belousov, Grabovsky, 2006).

Середина нулевых как раз совпадает с глубоким переосмыслением принципов гипертонического восстановления механических напряжений (Теория Белоусова-Миттенталя) и применением этих принципов для объяснения раннего морфогенеза амфибий (Belousov et al., 2006; Belousov, Grabovsky, 2006; Belousov, 2008). Примерно в это же время идеи о возможной роли механических напряжений в регуляции морфогенеза и клеточных дифференцировок начинают активно признавать в странах Запада (Farge, 2003; Keller et al., 2003; Gordon, 2006; Rehfeldt et al., 2007; Davidson et al., 2009).

В настоящее время в литературе распространен термин “механобиология”; им обозначают бурно развивающуюся междисциплинарную дисциплину на стыке биологии, физики, химии, инженерии и медицины, изучающую механические свойства клеток и тканей, участие механических сил и напряжений в развитии живых организмов, процессах клеточных дифференцировок и фор-

мирования тканей, физиологических процессах и процессах развития патологий (Ingber, 2003c; Wang, Thampatty, 2006; Mammoto et al., 2013; Ingber, Di Carlo, 2022). Идея о том, что механические силы и напряжения играют роль в организации живых систем, не вызывает никаких возражений (Farge, 2003; Davidson et al., 2009; Buxboim, Discher, 2010; Eroshkin, Zarsky, 2017; Martino et al., 2018).

Вероятно, важную роль в принятии новой парадигмы сыграли открытие механозависимой экспрессии генов и расшифровка механизмов клеточной и ядерной механотрансдукции. В начале 2000-х было показано, что экспрессия гена *twist* запускалась в клетках зародышей дрозофилы на ранних стадиях при механическом воздействии на эмбрионы (Farge, 2003). Более того, и в нормальном развитии эмбрионов дрозофилы необходимо сжатие определенных областей зародыша (формирующийся кишечник) для запуска экспрессии гена *twist* (Desprat et al., 2008). Начиная с 2000-х, активно изучаются механизмы клеточной механотрансдукции – процесса, в ходе которого клетка детектирует механические сигналы, конвертируя их в биохимические (Alonso, Goldmann, 2016). Основные механизмы клеточной механотрансдукции – механозависимое открывание ионных каналов и перестройки цитоскелета, стимулируемые через фокальные и межклеточные контакты (Mammoto et al., 2013, Alonso, Goldmann, 2016, Martino et al., 2018). В последнее десятилетие активно изучается механизм механотрансдукции через альтерацию формы клеток, ключевыми участниками которого является регулятор транскрипции YAP1 (YES-associated protein) и транскрипционный ко-активатор TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) (Aragona et al., 2013; Piccolo et al., 2014).

Ядро испытывает механические воздействия со стороны цитоскелета, которые, в свою очередь, опосредуют механические воздействия на клетку. В настоящее время становится понятно, что механические силы, действующие на клеточные ядра, влияют на экспрессию генов, это явление получило название ядерной механотрансдукции (Petridou et al., 2017; Kirby, Lammerding, 2018). Механические силы могут влиять на ядерный транспорт, транскрипционные факторы, связанные с элементами ядерного скелета, а также непосредственно на структуру хроматина (Wang et al., 2009; Donnaloja et al., 2019; Uhler, Shivashankar, 2017).

Открытие механозависимой экспрессии генов, изучение процессов клеточной и ядерной механотрансдукции показали, что регуляторные механизмы, связанные с механикой клеток и тканей, могут влиять на организацию клеточного ядра и хроматина и, таким образом, – на процессы реализации генетической информации (экспрес-

сии генов). Вырисовывается связь между механизмами механозависимой самоорганизации на уровне целого организма и уровнем молекулярных процессов в живых системах. Если подходить к “морфомеханике” как к учению о регулирующей роли механических сил и напряжений в организации судьбы клеток и тканей развивающихся организмов, то в этом смысле идеи Льва Владимировича Белоусова и его учеников, несомненно, получили признание в науке XXI в.

Более сложным будет ответ на вопрос о том, в какой степени достижения современной механобиологии опираются на работы Белоусова и его учеников и в какой – возникли независимо от школы “морфомеханики”. Ссылки на работы школы Л.В. Белоусова встречаются в публикациях ведущих мировых ученых, в том числе в монографиях и учебниках. Как правило, однако, при этом рассматриваются проблемы организации конкретных морфогенетических процессов, без обсуждения довольно стройной теоретической системы взглядов Л.В. Белоусова об общих принципах самоорганизации живых систем на основе взаимосвязи механических и клеточных процессов.

В коллективной монографии “Evolutionary Developmental Biology” из серии Reference Guide авторитетного издательства Springer под редакцией Laura Nuño de la Rosa и Gerd B. Müller (Nuno de la Rosa, Müller, 2021), посвященной актуальным проблемам эволюционной биологии развития, упоминается работа Льва Владимировича Белоусова и его Коллеги Владимира Мещерякова, (Meshcheryakov, Belousov, 1975; Brun-Usan, Salazar-Ciudad, 2021) в которой рассматриваются механизмы организацией спирального дробления у брюхоногих моллюсков. В другой части этой книги (Burke, 2021) ссылаются на публикацию Наумиди и Белоусова 1977 года (Naumidi, Belousov, 1977), в которой показана сократимость параксиальной мезодермы у птиц и обсуждается возможная роль механических сил и напряжений в ходе метаморфизации сомитной мезодермы у позвоночных. Автор (Burke, 2020) осознает фундаментальность обозначенной Белоусовым проблемы взаимодействия генетически закодированной информации и механозависимой самоорганизации живых систем на надклеточном уровне, однако, не погружается глубоко в обсуждение этого вопроса, ограничившись признанием того факта, что генетическая подоплека механических свойств клеток и тканей пока еще плохо понимаема.

В 2012 г. профессор Л.В. Белоусов выступает в качестве редактора специального выпуска “Biological Morphogenesis: Theory and Computation” журнала Biosystems (Igamberdiev et al., 2012). В 2018 г., уже после смерти Льва Владимировича, выходит мемориальный номер этого журнала, посвященный его памяти “Computational, Theoretical,

and Experimental Approaches to Morphogenesis” (Igamberdiev et al., 2018). В номере более двух десятков работ по изучению фундаментальных аспектов биологического морфогенеза, часть из них касается наследия Л.В. Белоусова в области морфомеханики (например, Ermakov, 2018b; Luchinskaia et al., 2018; Igamberdiev, 2018; Stein et al., 2018; Cherdantsev, Korvin-Pavlovskaya, 2018).

Ссылки на работы Белоусова в области морфомеханики есть и в учебнике по биологии развития Гильберта и Барреси (Gilbert, Barresi, 2016). В частности, в главе про раннее развитие рыб и амфибий упоминается одна из ключевых публикаций Белоусова и соавторов (Belousov et al., 2006), в которой гастрюляция амфибий рассмотрена с точки зрения гипотезы гипертонического восстановления механических напряжений.

Следует отметить, что значительная часть экспериментальных работ школы Белоусова была сделана на амфибиях. С этой точки зрения, интересно отметить ссылки на публикации Белоусова в работах американского эмбриолога Роя Келлера — классика изучения раннего морфогенеза позвоночных, в первую очередь, процесса гастрюляции амфибий. Долгое время Келлер описывал ранний морфогенез амфибий без рассмотрения организующей роли механических сил и напряжений, однако, в начале 2000-х его взгляды претерпели существенную метаморфозу. В первых работах Келлера и его коллег, посвященных биомеханике раннего развития позвоночных, нет ссылок на публикации Белоусова (например, в статье Keller et al., 2003), однако, они встречаются в более современных публикациях этой группы (Shook et al., 2018; Shook et al., 2022). Думаю, этот факт довольно символичен: признание приходит, но для осознания научного наследия Льва Владимировича Белоусова требуется время.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 1970-х годах в Московском Государственном Университете усилиями профессора Л.В. Белоусова и его учеников начинаются исследования типов механических деформаций фрагментов эмбриональных тканей и паттернов механических напряжений, характерных для разных стадий зародышей амфибий. Эти эксперименты были началом долгого пути становления новой междисциплинарной науки — морфомеханики. В ходе десятилетий интенсивных экспериментальных и теоретических исследований было открыто, что стадии эмбрионального развития характеризуются определенными паттернами механических напряжений и что механические напряжения регулируют интегральность эмбрионального развития. Релаксация механических напряжений на ранних стадиях развития приводит к нарушению морфогенеза и клеточных дифференцировок. Механи-

ческие натяжения, искусственно приложенные к эксплантату, способны переориентировать морфогенетические движения и зачатки осевых органов. Развитие живых организмов можно рассматривать как смену паттернов механических напряжений и комплексов морфогенетических движений, влияющих друг на друга по типу обратной связи.

В начале XXI в. идеи о роли механических сил и напряжений в организации морфогенеза и клеточных дифференцировок приобретают популярность. Открытие механозависимой экспрессии генов, изучение механизмов клеточной и ядерной механотрансдукции выводят проблему механической организации клеток и тканей в число актуальнейших вопросов современной биологии развития. Можно говорить о том, что регуляторные механизмы, связанные с механикой клеток и тканей, участвуют в организации молекулярно-биологических процессов, в том числе в регуляции экспрессии генов. Научное наследие Л.В. Белоусова и его школы остается актуальным.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность оргкомитету Юбилейной научной конференции “Николай Константинович Кольцов и биология XXI в.” (3–8 октября 2022 г., Россия, Москва, ИБР РАН), а также организаторам симпозиума “Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии” памяти профессора Л.В. Белоусова.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоусов Л.В.* Основы общей эмбриологии. М.: Издательство Московского Государственного Университета: Наука, 2005. 368 с.
- Белоусов Л.В., Дорфман Я.Г., Черданцев В.Г.* Быстрые изменения формы и клеточной архитектуры изолированных фрагментов эмбриональных тканей амфибий как экспериментальная модель морфогенеза // Онтогенез. 1974. Т. 5. № 4. С. 323–333.
- Белоусов Л.В., Лучинская Н.Н., Зарайский А.Г.* Тензотаксис — коллективное движение эмбриональных клеток вверх по градиентам механических натяжений // Онтогенез. 1999. Т. 30. С. 346–352.
- Белоусов Л.В., Миттенталь Дж.* Гипертоническое восстановление механических напряжений как возможный движущий

- ший механизм морфогенеза // Журн. Общ. Биол. 1992. Т. 53. № 6. С. 797–807.
- Alonso J., Goldmann W. Cellular mechanotransduction // *AIMS Biophysics*. 2016. V. 3. № 1. P. 50–62.
- Aragona M., Panciera T., Manfrin A. et al. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors // *Cell*. 2013. V. 154. № 5. P. 1047–1059.
- Belintsev B.N., Belousov L.V., Zاراisky A.G. Model of epithelial morphogenesis based on elastic forces and cell contact polarization // *Ontogenez*. 1985. V. 16. № 1. P. 5–14.
- Belintsev B.N., Belousov L.V., Zاراisky A.G. Model of pattern formation in epithelial morphogenesis // *J Theor Biol*. 1987. V. 129. № 4. P. 369–394.
- Belousov L.V. Formation and cellular structure of the lines of tension in the axial rudimenta of amphibian embryos // *Ontogenez*. 1978. V. 9. № 2. P. 124–130.
- Belousov L.V. Life of Alexander G. Gurwitsch and his relevant contribution to the theory of morphogenetic fields // *Int. J. Dev. Biol*. 1997. V. 41. № 6. P. 771–779.
- Belousov L.V. Mechanically based generative laws of morphogenesis // *Phys. Biol*. 2008. V. 5. № 1:015009.
- Belousov L.V. Self-Organization, Symmetry and Morphomechanics in Development of Organisms, pp 189–210 // in L. A.V. Pereira (ed.), *Embryology – Updates and Highlights on Classic Topics*. London: IntechOpen. 2012. 224 p.
- Belousov L.V. Morphogenetic fields: history and relations to other concepts. pp. 271–282 // In: Fels, D., Cifra, M., Scholkmann, F. (Eds.), *Fields of the Cell*. Kerala, India: Research Signpost. 2015. 321 p.
- Belousov L.V., Dorfman I.G., Cherdantsev V.G. Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos // *J. Embryol. and Exper. Morphology*. 1975. V. 34. № 34. P. 559–574.
- Belousov L.V., Dorfman I.G., Cherdantsev V.G. Patterns of mechanical stress at the successive stages of early development of frog // *Ontogenez*. 1976. V. 7. № 2. P. 115–122.
- Belousov L.V., Chernavskii D.S. Instability and stability in biological morphogenesis // *Ontogenez*. 1977. V. 8. № 2. P. 99–114.
- Belousov L.V., Grabovsky V.I. Morphomechanics: goals, basic experiments and models // *Int. J. Dev. Biol*. 2006. V. 50. № 2–3. P. 81–92.
- Belousov L.V., Ermakov A.S. Artificially applied tensions normalize development of relaxed *Xenopus laevis* embryos // *Ontogenez*. 2001. V. 32. № 4. P. 288–94.
- Belousov L.V., Lakirev A.V., Naumidi I.I. et al. Effects of relaxation of mechanical tensions upon the early morphogenesis of *Xenopus laevis* embryos // *Int. J. Dev Biol*. 1990. V. 34. № 4. P. 409–419.
- Belousov L.V., Luchinskaia N.N. Intercellular relay interactions in explants of amphibian embryonic tissues. I. Intercellular relay interactions in normal explant morphogenesis // *Tsitologiya*. 1983. V. 25. № 8. P. 939–44.
- Belousov L.V., Luchinskaia N.N. Biomechanical feedback in morphogenesis, as exemplified by stretch responses of amphibian embryonic tissues // *Biochem Cell Biol*. 1995. V. 73. № 7–8. P. 555–6.3
- Belousov L.V., Luchinskaya N.N., Ermakov A.S. et al. Gastrulation in amphibian embryos, regarded as a succession of biomechanical feedback events // *Int. J. Dev. Biol*. 2006. V. 50. № 2–3. P. 113–122.
- Blechschimidt E., Gasser R. F. Biokinetics and biodynamics of human differentiation. Springfield Illinois: Ch. C. Thomas Publ. 1978. North Atlantic Books; Reprint edition. 2012. 312 p.
- Buxboim A., Discher D.E. Stem cells feel the difference // *Nat Method*. 2010. V. 7. P. 695–697.
- Brun-Usan M., Salazar-Ciudad I. The Evolution of Cleavage in Metazoans. P 529-544 // In: Nuno de la Rosa, L., Müller, G. (eds) *Evolutionary Developmental Biology*. Springer Cham. 2021. 1257 p.
- Burke A.C. Shifting the Black Box: Approaches to the Development and Evolution of the Vertebrate Mesoderm P. 833–848. // In: Nuno de la Rosa, L., Müller, G. (eds) *Evolutionary Developmental Biology*. Springer. Cham. 2021. 1257 p.
- Cherdantsev V.G. Spatial deployments of morphogenetic movements as elements of the oral field in anuran amphibians. I. Structurally stable morphogenetic movements // *Ontogenez*. 1977. V. 8. № 4. P. 335–347.
- Cherdantsev V.G., Korvin-Pavlovskaya E.G. Fluid model of epithelial morphogenesis: Oscillations and structuring. *Biosystems*. 2018. № 173. P. 83–99.
- Davidson L., von Dassow M., Zhou J. Multi-scale mechanics from molecules to morphogenesis // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. V. 41. № 11. P. 2147–2162.
- Desprat N., Supatto W., Pouille P.A. et al. Tissue deformation modulates twist expression to determine anterior midgut differentiation in *Drosophila* embryos // *Dev. Cell*. 2008. V. 15. № 3. P. 470–477.
- Donnalaja F., Jacchetti E., Soncini M. et al. Mechanosensing at the Nuclear Envelope by Nuclear Pore Complex Stretch Activation and Its Effect in Physiology and Pathology // *Front. in Physiol*. V. 12. № 10:896.
- Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification // *Cell*. 2006. V. 126. P. 677–689.
- Ermakov A.S. The Theory of Tensegrity and Spatial Organization of Living Matter // *Russ. J. Dev. Biol*. 2018a. № 49. P. 87–100.
- Ermakov A.S. Professor Lev Belousov and the birth of morphomechanics // *Biosystems*. 2018b. № 173. P. 26–35.
- Ermakov A.S., Belousov L.V. Morphogenetic and differentiation sequelae to relaxation of mechanical tensions in *Xenopus laevis* blastula // *Ontogenez* 1998. V. 29. № 6. P. 450–458.
- Eroshkin F.M., Zاراisky A.G. Mechano-sensitive regulation of gene expression during the embryonic development. *Genesis* // *Genesis*. 2017. № 55:e23026.
- Farge E. Mechanical induction of Twist in the *Drosophila* foregut/stomodaeal primordium // *Curr Biol*. 2003. V. 13. № 16. P. 1365–77.
- Gerhart J., Vincent J.-P., Scharf S. et al. Cortical-subcortical rotation in the amphibian egg. P. 245–250 // In: Satir P., Lazarides E., Condeelis J.S. (eds) *Signal Transduction in Cytoplasmic Organisation and Cell Motility*. N.Y.: Alan R. Liss Inc., 1988. 386 p.

- Gilbert S.F., Barresi M.F.* Developmental Biology. 11th Edition. Oxford University Press. 2016. 500 p.
- Gordon R.* Mechanics in embryogenesis and embryonics: prime mover or epiphenomenon // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. V. 50. № 2–3. P. 245–253.
- Gurwitsch A.G.* Die Vererbung als Verwircklichungsvorgang // *Biol. Zbl.* 1912. № 22. P. 458–486.
- Harris A.K.* Behavior of cultured cells on substrata of variable adhesiveness // *Exp. Cell Res.* 1973. V. 77. № 1. P. 285–297.
- Harris A.K., Wild P., Stopak D.* Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science.* 1980. V. 208. № 4440. P. 177–179.
- Harris A.K., Stopak D., Wild D.P.* Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis // *Nature.* 1981. V. 290. № 5803. P. 249–251.
- Harris A.K., Stopak D., Warner P.* Generation of spatially periodic patterns by a mechanical instability: a mechanical alternative to the Turing model // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1984. № 80. P. 1–20.
- Igamberdiev A.U.* Hyper-restorative non-equilibrium state as a driving force of biological morphogenesis // *Biosystems.* 2018. № 173. P. 104–113.
- Igamberdiev A., Belousov L.V., Gordon R. (eds).* Biological Morphogenesis: Theory and Computation. Biosystems. 2012. V. 109. № 3. P. 241–506.
- Igamberdiev A., Gordon R., Cherdantsev V. et al. (eds).* Computational, Theoretical, and Experimental Approaches to Morphogenesis. Biosystems. 2018. V. 173. P. 1–334
- Ingber D.E.* Tensegrity, I. Cell structure and hierarchical systems biology // *J. Cell Sci.* 2003a. V. 116. Pt 7. P. 1157–1173.
- Ingber D.E.* Tensegrity, I.I., How structural networks influence cellular information processing networks // *J. Cell Sci.* 2003b. V. 116. Pt 8. P. 1397–1408.
- Ingber D.E.* Mechanobiology and diseases of mechanotransduction // *Ann Med.* 2003c. V. 35. № 8. P. 564–77.
- Ingber D.E., Di Carlo D.* Interdisciplinarity and mechanobiology // *iScience.* 2022. V. 25. № 5. P. 104187.
- Keller R.E.* An experimental analysis of the role of bottle cells and the deep marginal zone in gastrulation of *Xenopus laevis* // *J. Exp. Zool.* 1981. V. 216. № 1. P. 81–101.
- Keller R.E.* The cellular basis of gastrulation in *Xenopus laevis*: active, postinvolution convergence and extension by mediolateral interdigitation // *Amer. Zool.* 1984. V. 24. № 3. P. 589–603.
- Keller R., Davidson L.A., Shook D.R.* How we are shaped: The biomechanics of gastrulation. *Differentiation.* 2003. V. 71. № 3. P. 171–205.
- Kirby T.J., Lammerding J.* Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor // *Nat Cell Biol.* 2018. V. 20. № 4. P. 373–381.
- Lakirev A.V., Belousov L.V., Naumidi I.I.* Effect of external tensions on tissue differentiation in embryos of the clawed toad *in vitro* // *Ontogenez.* 1988. V. 19. № 6. P. 591–600.
- Lin S.L., Yang J.C., Ho K.N. et al.* Effects of compressive residual stress on the morphologic changes of fibroblasts // *Med. Biol. Eng Comput.* 2009. V. 47. № 12. P. 1273–1279.
- Luchinskaia N.N., Belousov L.V.* Electron microscopic study of rapid morphogenetic processes in embryonic tissue explants of amphibia // *Ontogenez.* 1977. V. 8. № 3. P. 263–268.
- Luchinskaia N.N., Cherdantsev V.G., Ermakov A.S. et al.* Morphomechanical reactions and mechanically stressed structures in amphibian embryos, as related to gastrulation and axial organs formation // *Biosystems.* 2018. V. 173. № 18–25.
- Mammoto T., Mammoto A., Ingber D.E.* Mechanobiology and developmental control // *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* 2013. V. 29. P. 27–61.
- Martino F., Perestrelo A.R., Vinarský V. et al.* Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function // *Front Physiol.* 2018. V. 5. № 9. P. 824.
- Meshcheryakov V.N., Belousov L.V.* Asymmetrical rotations of blastomeres in early cleavage of gastropoda // *Roux Arch Dev. Biol.* 1975. V. 177. P. 193–203
- Naumidi I.I., Belousov L.V.* Sokratimost' i épitelizatsiia v osvoei mezoderme kurinogo zarodysha [Contractility and epithelization in the chick embryo axial mesoderm] // *Ontogenez.* 1977. V. 8. № 5. P. 517–520.
- Nuño de la Rosa L., Müller G.B.* Evolutionary Developmental Biology. Springer Cham. 2021. 1257 p.
- Piccolo S., Dupont S., Cordenonsi M.* The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* 2014. V. 94. № 4. P. 1287–1312.
- Petridou N.I., Spiró Z., Heisenberg C.P.* Multiscale force sensing in development // *Nat. Cell Biol.* 2017. V. 19. № 6. P. 581–588.
- Rehfeldt F., Engler A.J., Eckhardt A. et al.* Cell responses to the mechanochemical microenvironment—implications for regenerative medicine and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007. V. 59. № 13. P. 1329–1339.
- Shook D.R., Kaspruwicz E.M., Davidson L.A. et al.* Large, long range tensile forces drive convergence during *Xenopus* blastopore closure and body axis elongation // *Elife.* 2018. № 7:e26944.
- Shook D.R., Wen J.W.H., Rolo A. et al.* Characterization of convergent thickening, a major convergence force producing morphogenic movement in amphibians // *Elife.* 2022. № 11:e57642.
- Stein A.A., Logvenkov S.A., Volodyaev I.V.* Continuum modeling of mechano-dependent reactions in tissues composed of mechanically active cells // *Biosystems.* 2018. № 173. P. 225–234.
- Uhler C., Shivashankar G.V.* Regulation of genome organization and gene expression by nuclear mechanotransduction // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 18. № 12. P. 717–727.
- Wang J.H., Thampatty B.P.* An introductory review of cell mechanobiology // *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2006. V. 5. № 1. P. 1–16.
- Wang N., Tytell J.D., Ingber D.E.* Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. V. 10. № 1. P. 75–82.

## The Birth of Morphomechanics

A. S. Ermakov<sup>1, 2, 3, \*</sup>

<sup>1</sup>*Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Embryology, Leninskie Gory, d. 1, str. 12, Moscow, 119991 Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Scientific and Organizational Department, ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia*

<sup>3</sup>*Skryabin Institute of Bioengineering, The group of RNA epigenetics and mechanisms of genomic stability, pr. 60-letiya Oktyabrya, 7/1, Moscow, 117312 Russia*

*\*e-mail: ermakov99@mail.ru*

At the early 1970s, in the USSR, L.V. Belousov and his colleagues from Moscow State University put forward a hypothesis about the possible role of mechanical forces and stresses in the organization of developing living systems. The authors discovered stage-specific patterns of mechanical stresses during amphibian embryonic development and showed that mechanical stresses are necessary for the organization of morphogenesis and cellular differentiation. As a result of the long-term work of Moscow embryologists, morphomechanics, new interdisciplinary science at the intersection of developmental biology and mechanics, was born. In the XXI century, mechanisms of mechano-dependent gene expression, cellular and nuclear mechanotransduction are intensively studied. The idea of the organizing role of mechanical forces and stresses in living systems remains very relevant.

*Keywords:* morphogenesis, cellular differentiation, morphomechanics, mechanobiology, integrality of development, developmental biology