

ГЕНЕАЛОГИЯ НЕЙРОНОВ: 50 ЛЕТ РЕКОНСТРУКЦИИ ЭВОЛЮЦИИ НЕРВНЫХ СИСТЕМ

© 2024 г. Л. Л. Мороз^а, *, В. Е. Дьяконова^б, **

^аУниверситет Флориды, Флорида, США

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

*e-mail: leonidlmoroz@gmail.com

**e-mail: dyakonova.varvara@gmail.com

Поступила в редакцию 25.11.2024 г.

Окончательная версия 09.12.2024 г.

Принято к публикации 12.12.2024 г.

11 ноября ушел из жизни Дмитрий Антонович Сахаров (1930–2024), уникальный человек, наставник, ученый и поэт. В этом же году мировое сообщество отмечает 50-летие выхода в свет его книги “Генеалогия нейронов”, оказавшей громадное влияние на несколько поколений нейробиологов. Представленные в этой книге гипотезы, стратегии и экспериментальные подходы сохранили актуальность и сегодня. Мы представили гипотезы Сахарова о полигенезе и функциональном значении гетерохимизма нейронов в свете последних работ в области эволюционной нейробиологии, геномики и транскриптомики одиночных нейронов.

Ключевые слова: происхождение нейронов, гомологичные нейроны, нейротрансмиттеры, глутамат, ГАМК, эволюция нервной системы, нейрогенез, транскриптомика одиночных клеток, мозг

DOI: 10.31857/S0475145024020049, **EDN:** MCVORF

ПОЧЕМУ НЕЙРОНЫ РАЗНЫЕ?

11 ноября 2024 г. ушел из жизни Дмитрий Антонович Сахаров (1930–2024), уникальный человек, наставник, ученый и поэт.

Один из авторов этой статьи, будучи студентом третьего курса, совершенно случайно, в медицинской библиотеке Минска, работая по курсовому проекту, посвященному ядрам мозга кролика, натолкнулся на небольшую книжку (всего за 86 копеек!) Дмитрия Антоновича. Эта работа называлась “Генеалогия нейронов” (Сахаров, 1974), где сразу, во введении, были суммированы две фундаментальные, но далеко не тривиальные стратегии анализа принципов нейрональной организации. В результате прочтения “Генеалогии” в тот же день работа на кроликах была забыта. Представленные стратегии и экспериментальные подходы “Генеалогии” оказались не только чрезвычайно интересны, но и плодотворны. Они сохранили актуальность и сегодня, 50 лет спустя.



Дмитрий Антонович Сахаров, ученый и поэт, 2012 г.
Фото: Вячеслав Коротихин.

Первый подход — это необходимость исследовать “откровенность” (Вагнер, 1885; то есть открытость и доступность для исследования) простых нервных систем брюхоногих моллюсков с гигантскими полиплоидными нейронами ($n = 100/000 - 200/000$), иногда достигающими рекордных 1 мм в диаметре. Центральная нервная система у этих моллюсков (принадлежащих к подгруппе *Euthyneura* кледы *Heterobranchia*) состоит из нескольких тысяч нервных клеток, расположенных на поверхности пяти — десяти ганглиев, и, таким образом, доступных для физиологического, микрохимического и геномного анализов на уровне каждого отдельного нейрона. Что особенно важно, такой многофакторный анализ можно проводить во время реализации простого и сложного поведения, в реальной динамике процессов обучения и формирования памяти в *каждом* из нейронов участвующих в формировании этого поведения.

Второй подход — это постановка вопроса “Почему нейроны разные?” и ответ Сахарова на этот вопрос (Сахаров 1972). Действительно, уже в начале 1970-х стало известно, что практически все нейроны у моллюсков и многих других беспозвоночных уникальны по десяткам параметров. Объяснение, которое предложил для этого явления Сахаров, сразу и простое, и сложное: нейроны разные, главным образом потому, что у них разное происхождение. При этом функциональные адаптации клеточного фенотипа не исключаются, а интегрируются с историей становления нейрональной специфичности. В этом и научная оригинальность, и красота подхода Сахарова, опередившего время на десятилетия. Сахаров назвал свою гипотезу *гипотезой полигенеза* нейронов (то есть гипотезой множественного происхождения нейронов из разных тканевых или клеточных предшественников). Эта гипотеза была сформулирована в противовес альтернативной концепции *функциональной специализации*, в соответствии с которой нейроны и нервные системы могли возникнуть “из одного корня” (то есть от одного общего предка) или одного клеточного типа. Позднее Сахаров сказал, что правильнее было бы называть его гипотезу полигией или полифилией, чтобы избежать параллелей с религиозной терминологией.

Сахаров объединил два подхода неслучайно. Чтобы “разобраться” с полифилией (множественность происхождения) или монофилией (единство происхождения), надо было начинать

работать с *Euthyneura* и их большими, хорошо доступными нейронами. Это позволило бы находить *гомологичные* нейроны у разных видов и на разных филогенетических расстояниях. Иными словами, необходимо было разработать и применить критерии гомологии на уровне отдельных идентифицированных нейронов, что Сахаров и сделал на примере серотонергических и пептидергических клеток в 1970–1974, впервые в СССР и в мире.

Как это часто бывает в науке, история началась с переоткрытия Сахаровым в 1958 г. морского ангела (*Clione limacina*) как уникального модельного объекта нейробиологии. Н. П. Вагнер писал в 1885 г.: “При первом взгляде на узлы нервной системы клиона каждый наблюдатель, наверное, будет поражен громадной величиной их клеток... При взгляде на эту громадную величину... мне пришло на мысль исполнить давнее желание и разработать хоть у одного беспозвоночного типа вполне весь комплекс нервной системы. Такой разбор, по всей вероятности, повел бы к объяснению, хотя гадательному, многих функций нервной системы у большей части, если не у всех, беспозвоночных животных. Правда, мне хотелось сделать эту работу без особого труда, и прозрачность, или, так сказать, откровенность нервной системы клиона давала мне в этом случае надежду на успех” (Вагнер 1885).

“Сверкание околوجلочного ожерелья и наглая зримость нейронов” клиона (Сахаров 1960) поразила 28-летнего Сахарова, наверное, сильнее, чем Вагнера, и он расширил спектр видов, нашел и предложил для нейробиологии другие уникальные модельные объекты, такие как беломорские голожаберные моллюски *Aeolidia papillosa*, *Dendronotus frondosus* (Сахаров 1962) и дальневосточная *Tritonia diomedea* (Вепринцев и др., 1964; В. Л. Боровягин, Д. А. Сахаров 1968). Это было важное сравнительное дополнение к *Aplysia californica*, набирающей тогда популярность, но недоступной в Советском Союзе (рис. 1).

Сравнивая нейроны у разных видов брюхоногих моллюсков и их нейромедиаторы (творчески расширяя методологию своего учителя, Х. С. Коштойнца, при анализе сигнальных молекул (Коштойнец 1957; Koshtoyants, et al., 1961; Артемов, Сахаров 1986)), Сахаров показал, что секреторная специфичность нейронов у исследуемых моллюсков эволюционно консервативна и, следовательно, может быть использована как

один из важных параметров для идентификации гомологичных нейронов. Как итог нескольких лет сравнительных исследований — первые клеточные гомологи были найдены у морских, пресноводных и наземных моллюсков (Сахаров 1970, 1974, 1976).

Наиболее интересный случай представляет пара серотонин-содержащих интернейронов в церебральных ганглиях, известных как МСС (metacerebral cells) (рис. 2). К настоящему вре-

мени эти два нейрона найдены у всех исследованных *Euthyneura* исходя из критериев специального качества, положения и, что особенно важно, непрерывности, то есть наличия этих клеток у представителей всех “промежуточных” таксономических рангов от вида до подкласса. МСС отвечают за ключевое “поведенческое решение” моллюска — “есть” или не “есть”? (eat or not to eat), участвуя в запуске и интеграции пищевой программы (Rosen et al., 1983; 1989;



Рис. 1. Голожаберные моллюски — популярные нейробиологические модели. *Tritonia tetraquetra* (Pallas, 1788) [ранее известная как *T. diomedea*], *Clione limacina* (Phipps, 1774) из Friday Harbor США, *Aplysia californica* (J. G. Cooper, 1863) из Калифорнии, США. Фото: Леонид Мороз.

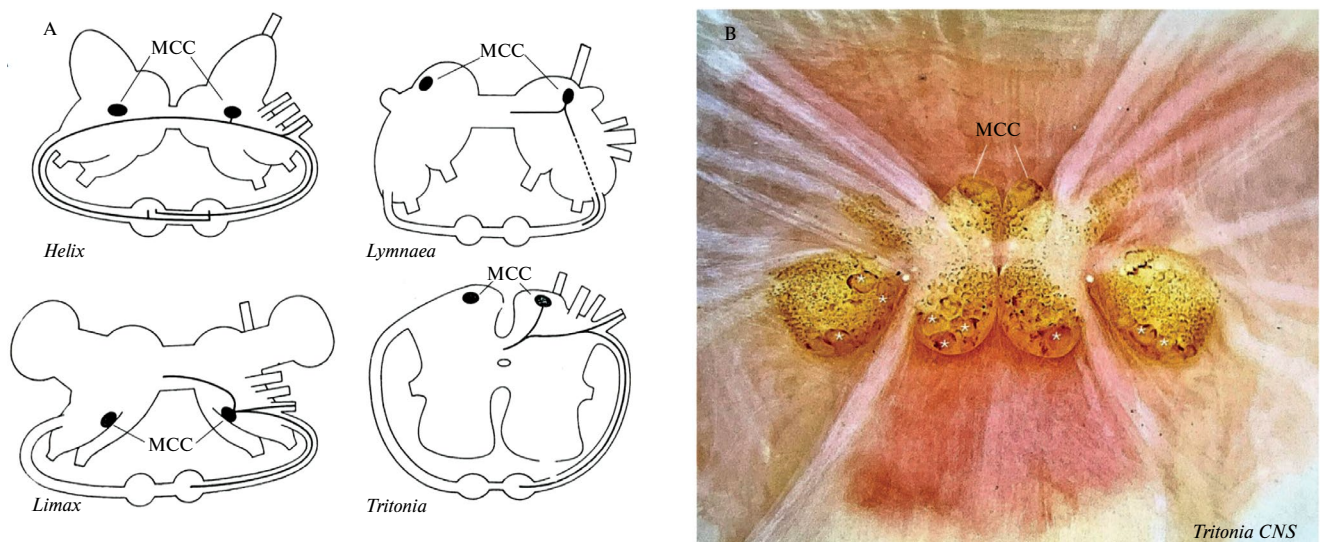


Рис. 2. А — МСС разных моллюсков, рисунок Сахарова (Сахаров, 1974); В — дорсальный вид живой центральной нервной системы *Tritonia* с гигантскими нейронами МСС; звездочками показаны некоторые другие гигантские нейроны; фото: Леонид Мороз.

Alexeeva et al., 1989) у тысяч видов и таксономических линий, разделенных 380 миллионами лет независимой эволюции (Moroz, 2018). Это уникальный пример сохранения сложного фенотипа одного идентифицированного нейрона и его роли в поведении на таких гигантских эволюционных расстояниях.

Не для всех типов нейронов такая удаленная гомология на клеточном уровне прослеживается: данные на моллюсках четко показывают, что есть большой диапазон нейронов: от эволюционно консервативных до эволюционно пластичных, с появлением и потерями разных клеточных линий (Moroz 1986; 1988). В любой интерпретации предложенные подходы создали фундамент для построения эволюционной классификации нейронов (Сахаров 1970) или даже “Периодической системы нейронов” (Moroz 2018), концептуального аналога периодической системы химических элементов Менделеева, с предсказуемыми свойствами клеточных фенотипов, что очень полезно для их поиска и функциональной идентификации.

Сейчас концептуальная гипотеза полифилии нейронов получает подтверждение в исследованиях на гребневиках (тип *Stenophora*) (Moroz et al., 2024). У этих загадочных морских организмов, потомков самой древней ветви животного царства (Whelan et al., 2017), нейроны, мышцы, мезодерма и пищеварительный тракт возникли независимо от остальных Metazoa (Moroz et al., 2014; Moroz 2024). Не исключена вероятность, что нейроны и синапсы независимо возникали в эволюции как минимум 3–4 раза из секреторных клеток (Moroz 2021). Альтернативные несинаптические нейроидные интегративные системы (non-synaptic neuroid systems) действительно найдены у губок (Porifera) (Musser et al., 2021) и пластинчатых (Placozoa) (Moroz, Romanova 2022). Неудивительно, что растущее разнообразие нейрональных фенотипов, молекулярная, морфологическая и функциональная гетерогенность клеточных популяций в мозге вызывает вопрос: “что такое нейрон?”. Попытки дать определение нейрону приводят к заключению, что универсальный нейрон — это не генетическая, а функциональная категория. Получается, что нейроны демонстрируют множество примеров конвергентной эволюции и мозаику *филогенетически разных* популяций клеток (Moroz 2014), как и предсказывал Сахаров полвека назад.

Помимо проблемы понимания возникновения нейронов, существует не менее важная проблема возникновения мозга как объединения множества гетерогенных нейронов и глии в единую морфологическую структуру/орган со своей уникальной микросредой и гомеостазом. Сахаров писал в далеком 1974-м: “Путь, приведший к рождению мозга, не был строго предопределен; на разных его этапах имелись возможности выбора направлений развития, и реализация этих возможностей привела к тому, что в природе, помимо мозга человека, существует мозг пчелы или, скажем, осьминога. В каких-то важных отношениях, однако, выбор был невелик, и возможности эволюции ограничивались свойствами исходного материала и тем, что этот материал мог меняться только в сфере действия биологических законов развития” (Сахаров 1974). Сколько же раз природа создавала мозг?

Теперь мы можем реконструировать многократное возникновение мозга или централизации нейронов в единую структуру (Moroz et al., 2021): не менее 20 раз в эволюции животных и даже не менее 5 раз в рамках только одного типа так любимых Сахаровым моллюсков (Moroz, 2009). Конечно, сейчас мы все еще в начале долгой дороги к полноценной реконструкции эволюции нейронных клеток и центральных нервных систем у более чем тридцати типов животных. На этом пути, с развитием “single-cell multi-omics” методологии (Baysou et al., 2023), проблема генеалогии клеточных типов снова стала и становится все более и более актуальной (Arendt et al., 2016). Исследования в рамках решения этой проблемы направлены на поиск и идентификацию разных гомологичных клеточных линий, даже между отдельными типами животных (Tarashansky et al., 2021). При этом, конечно, надо учитывая множественность транскрипционных фенотипов, и в первую очередь возможность существования многих, эволюционно древних линий секреторных клеток у безнервных животных.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГИПОТЕЗА ПОЛИФИЛИИ НЕЙРОНОВ

За прошедшие годы появилось много геномных и транскриптомных исследований, которые подтверждают, что все исследованные на сегодняшний день нервные системы представлены нейронами разной транскрипционной специфичности (Moroz 2021; Moroz et al., 2021b). Сахаров как наблюдатель, так и предвидел такую секретор-

ную гетерогенность, и его интерес рано сместился в сторону расшифровки функциональной роли множественности нейротрансмиттеров. Он пришел сначала к интуитивному пониманию того, что в нервной системе огромную роль должна играть несинаптическая коммуникация между нейронами, при которой упорядоченность взаимодействий достигается за счет наличия соответствующих рецепторов у соответствующих нейронов. Это представление было озвучено в 1985–1990 гг. под названием “*гетерон*” (Сахаров 1985; 1990).

Уже к девяностым годам в работах его лаборатории накопилось много экспериментальных доказательств несинаптической нейротрансмиссии (Сахаров, Каботянский 1986; Rózsa, Dyakonova 1989; Moroz 1991). Появились и другие авторы, активно развивающие это направление (Fuxe et al., 1990; Benfenati, Agnati 1991; Bach-y-Rita P, Illis 1993). Однако отличие взглядов Д. А. Сахарова от их представлений о роли несинаптической нейротрансмиссии было принципиальным. Он рассматривал “*volume transmission*” (объемную нейрональную секрецию) не как внешнюю модуляцию жесткого синаптического ансамбля, а как основу упорядоченного взаимодействия нейронов на всех уровнях организации нервной системы. А классический синапс с его изолирующими барьерами Сахаров рассматривал как редкий и предельный случай такой коммуникации.

Очевидно, что у двух основных гипотез Д. А. Сахарова, полигении нейронов и функциональности первичного гетерохимизма (множественности нейротрансмиттеров), должно было быть следствие: функциональный ансамбль нейронов (который может работать только при наличии в нем нейронов разного химизма) должен состоять из нейронов разного происхождения. То есть нейроны при образовании химических контактов руководствуются примерно тем же принципом, который работает при выборе полового партнера: *предпочтение отдается неродственному фенотипу*.

Стремительное развитие транскриптомики и мультиомики одиночных клеток, позволяющих не только устанавливать онтогенетическое родство нейронов на основании сходства их молекулярной архитектуры, но и проследить развитие разных линий в онтогенезе, может уже в ближайшее время ответить на вопрос о справедливости этого утверждения, так же, как и на вопрос о связи

нейротрансмиттерных фенотипов с онто- и филогенетическими линиями развития нейронов. Некоторые данные, важные для проверки гипотезы онтогенетической полигении, уже получены в 2023–2024 гг. при построении транскриптомных клеточных атласов мозга мыши и дрозофилы (Dorkenwald et al., 2024; Lin et al., 2024; Schlegel et al., 2024; Yao et al., 2023).

Всего десять лет назад коннекционизм, то есть построение коннектомов, изучающих анатомические синаптические связи между всеми отделами и нейронами нервной системы, доминировал в подходах к изучению мозга. Ожидаемый результат часто преподносился как информация, не только полезная для последующих исследований, но и обеспечивающая быстрое понимание механизмов функционирования мозга. С этими ожиданиями не соглашались сторонники гетерохимической парадигмы, осознававшие важность химического разнообразия нейронов и их несинаптической коммуникации для функционирования нервной системы. В какой-то момент выражение “*Beyond the connectome*” стало популярным слоганом среди нейробиологов, критиковавших увлечение коннектомами (см. например, Bargmann 2012; Kopell et al., 2014). Но критика должна быть конструктивной: если не коннектом, то что? Мечты о создании транскриптомов отдельных нейронов появились и реализовались как раз на серотонергических МСС нейронах у *Aplysia* (Moroz et al., 2006). В этот период были получены транскриптомы десятков видов моллюсков и их нервных систем, что привело к построению новой филогении моллюсков (Kocot et al., 2011) и открытию новых нейрон-специфичных секреторных молекул (как раз по Сахарову).

В 2015 г. Российское когнитивное сообщество было возбуждено лекцией Д. А. Сахарова с названием “*Нейронная основа мозговых функций: коннектом versus транскриптом*” (Сахаров Д. А. 2015). Обосновывая важность дальнейшего развития транскриптомики, он писал: “*Мозг — это арена постоянных взаимодействий между эндогенно активными, химически разнородными секреторными клетками* (биологическими нейронами). Они соединяются в ансамбли для принятия совместных решений, обеспечивающих бесперебойное функционирование организма. В пределах ансамбля продукты нейронной секреции действуют контактно (‘синапсы’) и дистантно, а также физически (‘синаптическая передача’) и тонически (в составе трансмиссер-

ного ‘бульона’ межклеточной среды). В приложении к отдельной клетке транскриптом означает совокупность транскриптов всех генов, экспрессирующихся в ней в определенные моменты функционирования, то есть контекст-зависимо. Транскриптом определяет и связи клетки (куда тянуть отростки), и ее химизм (экспрессия генов, отвечающих за нейротрансмиттеры и за рецепторы к сигнальным молекулам). Короче, он дает наиболее полное описание фенотипических свойств нейрона в конкретный момент времени”.

ГИПОТЕЗА ПОЛИГЕНЕЗА НЕЙРОНОВ И ТРАНСКРИПТОМНЫЕ АТЛАСЫ НЕРВНЫХ СИСТЕМ

Наиболее значимые подтверждения гипотезы Д. Сахарова о связи происхождения нейрона и его трансмиссивного фенотипа получены на дрозофиле. Первая работа, выполненная на брюшной нервной цепочке, вышла в 2019-м с четким выводом, обозначенном в самом названии статьи “Neurotransmitter identity is acquired in a lineage-restricted manner in the *Drosophila* CNS” (Lacin et al., 2019). При развитии нервной системы *Drosophila* каждый нейробласт обычно производит две гемелинии нейронов, которые заметно отличаются по друг от друга по морфологии клеток и могут экспрессировать разные нейротрансмиттеры. Авторы создали полную карту трех нейротрансмиссивных типов нейронов (ацетилхолин, ГАМК или глутамат) для всей брюшной нервной цепочки в соответствии с их происхождением, т.е. отношением к одной из 32 известных гемелиний. Они не обнаружили ни одного случая использования нейронами более одного низкомолекулярного нейротрансмиссивтера. Хотя ацетилхолин-специфический ген ChAT транскрибируется во многих глутаматергических и ГАМКергических нейронах, эти транскрипты обычно не покидают ядро и не транслируются. Наиболее важным результатом своей работы авторы сочли формулировку простого правила: *все нейроны в пределах онтогенетической гемелинии используют один и тот же нейротрансмиссивтер*. Таким образом, идентичность нейротрансмиссивтера приобретается на уровне стволовых клеток. Это правило немедленно приобрело название “Правило Лацина” (Lacin’s law). Не стоит, наверное, ожидать от международного сообщества памяти о вышедших, в том числе в международных журналах (Sakharov 1974a, b), работах 50-летней

давности Д. А. Сахарова, выдвинувшего гипотезу о связи трансмиссивного фенотипа с происхождением нейрона.

Правило Лацина заинтересовало некоторых исследователей, и правильность этого постулата проверили по отношению к головному мозгу дрозофилы, а затем и по отношению к мозгу млекопитающих. Для мозга дрозофилы правило выполнялось, хоть с некоторыми оговорками. Так, в мае 2024 г. в журнале Cell вышла статья (Eckstein et al., 2024), в которой искусственные нейронные сети научили предсказывать трансмиссивный фенотип нейронов для шести нейротрансмиссивтеров (ацетилхолин, глутамат, ГАМК, серотонин, дофамин, октопамин) по электронно-микроскопическим фотографиям секретирующих окончаний. Точность такого предсказания достигала 87% для отдельных синапсов, 94% для нейронов и 91% для известных типов клеток во всем мозге *D. melanogaster*. Способность нейронных сетей делать такие предсказания свидетельствует о том, что существуют тонкие, но существенные различия между трансмиссивными фенотипами нейронов по морфологии секретирующих окончаний. Анализируя распределение нейротрансмиссивтеров в мозге, авторы показали, что нейроны, которые развиваются вместе, в основном экспрессируют только один из быстродействующих трансмиссивтеров (ацетилхолин, глутамат или ГАМК), то есть подтвердили правило Лацина.

Октябрь 2024-го отмечен мощным выступлением консорциума по изучению мозга дрозофилы, выпустившим три статьи в Nature (Dogkenwald et al., 2024; Lin et al., 2024; Schlegel et al., 2024). Они посвящены построению транскриптомного, коннектомного и онтогенетического атласа мозга дрозофилы. Эти данные позволили максимально уточнить выявленные выше закономерности формирования трансмиссивного фенотипа нейронов в онтогенезе. Показано, что примерно 120 идентифицированных нейробластов генерируют все нейроны мозга и часть зрительных проекционных нейронов в каждом (левом и правом) полушарии. Каждая из этих стволовых клеток определяется уникальным транскрипционным кодом и генерирует стереотипную линию путем упорядоченных асимметричных делений. Каждый нейробласт обычно производит две гемелинии, которые заметно отличаются по нейронной морфологии и могут экспрессировать разные нейротрансмиссивтеры, но нейроны в каждой ге-

милинии обычно экспрессируют один быстродействующий трансмиттер. Внутри гемилинии нейроны образуют отростки, которые собираются вместе в один плотный пучок, образуя общий тракт, который входит, пересекает и соединяет разные области нейропиля. Таким образом, не нейробласт, а именно гемилиния представляет собой естественную функциональную, а также, возможно, эволюционную единицу, с помощью которой можно изучать нервную систему. В этом выводе авторов интересен акцент не только на онтогенетической систематике нейронов, объединенных общим химизмом, но и на эволюционно древней предковой составляющей, которая предполагает наследуемость и сохранение трансмиттерных фенотипов в филогенезе, что очень близко идеям Д. А. Сахарова.

В отношении применимости правила Лацина к мозгу млекопитающих все оказалось сложнее. В работе на мозге обезьяны игрунки обыкновенной исследователи проанализировали транскриптомы более 2.4 миллиона клеток мозга, пытаясь ответить на вопросы: (1) кластеризуются ли транскриптомные профили нейронов в соответствии с секретлируемым трансмиттером (глутаматом или ГАМК) и (2) есть ли у нейронов с общим секреторным химизмом (снова идет речь только о глутамате и ГАМК) какие-то дополнительные общие молекулярные особенности, помимо нескольких генов, напрямую отвечающих за синтез и высвобождение нейротрансмиттера (Krienen et al., 2023). В препринте этой статьи был дан четкий ответ на оба вопроса: нет. В принятой к публикации версии статьи этот вывод представлен в смягченной форме: “Транскриптомная идентичность большинства типов нейронов формируется в большей степени происхождением в процессе развития, чем нейротрансмиттерным фенотипом” (Krienen et al., 2023). Однако сама постановка вопроса, как представляется, уже была обречена на отрицательный ответ. Даже на основании данных, полученных на дрозофиле в 2019 г., понятно, что правило “одна гемилиния развития — один нейротрансмиттер” не работает в обратном направлении.

Более полезную информацию о взаимосвязи трансмиттерного фенотипа и происхождения нейронов в мозге млекопитающих дала работа по созданию транскриптомного атласа мозга мыши (Yao et al., 2023). Это исследование, в отличие от ряда других работ с применением

транскриптомики одиночных клеток, позволило не просто получить представление о разнообразии нейронов мозга, но и создать пространственный атлас клеточных типов с разрешением в одну клетку. Атлас был создан путем объединения набора данных поклеточного секвенирования РНК (scRNA-seq), включающего около 7 миллионов профилированных клеток, и набора пространственных транскриптомных данных, состоящего примерно из 4.3 миллиона клеток, с использованием мультиплексированного метода устойчивой к ошибкам флуоресцентной гибридизации *in situ* (MERFISH). На его основе создана онлайн-платформа Allen Brain Cell Atlas для пространственной визуализации типов клеток: <https://portal.brain-map.org/atlasses-and-data/bkp/abc-atlas>. Эти данные позволяют ответить на вопросы о том, как транскриптомный ландшафт типов клеток в масштабах всего мозга связан с анатомической и структурной организацией и его онтологией, основанной на развитии и эволюции, а также о том, как скоординированная экспрессия генов определяет идентичность и функциональные свойства типов клеток.

Помимо очевидной значимости для последующего изучения мозга, эта гигантская работа уже позволила сделать целый ряд важных выводов, в том числе о связи химического фенотипа и онтогенетического происхождения нейрона. Ниже коротко перечислим наиболее значимые ее результаты.

В очередной раз подтвердилось представление о большом разнообразии нейронов, входящих в состав головного мозга. На основе изучения степеней удаленности клеток друг от друга по составу экспрессируемых генов авторы построили иерархически организованную систему, которая в настоящий момент включает 34 больших класса нейронов, в которые входят 338 подклассов, которые, в свою очередь, делятся на 1201 супертип, а те, в свою очередь, состоят из 5322 кластеров нейронов (рис. 3).

Одним из наиболее важных результатов этого исследования оказалось то, что клетки со сходными или идентичными транскриптомами часто локализованы в одном и том же регионе и имеют общее происхождение и микроокружение. И наоборот, транскриптомно более удаленные типы клеток находятся дальше друг от друга в пространстве, а также в другом окружении. Переходные типы клеток в транскриптомном

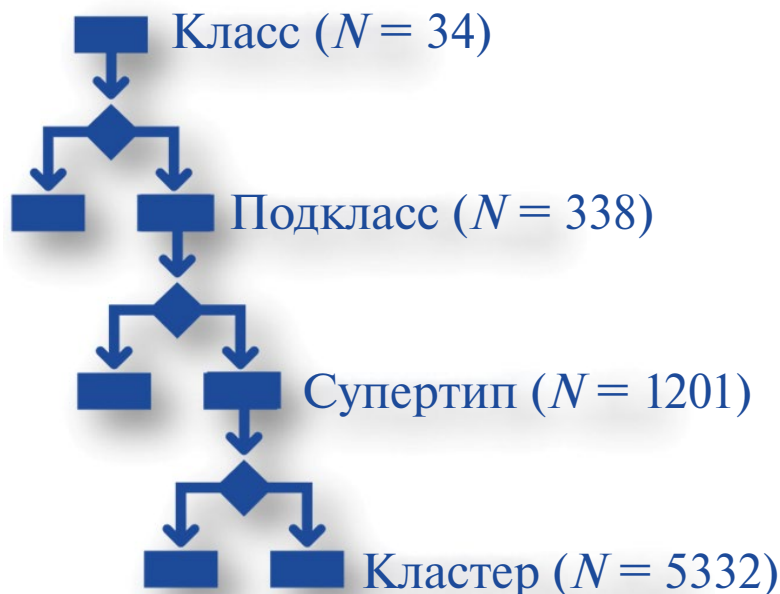


Рис. 3. Принцип иерархической классификации нейронов на основе сходства транскриптомов одиночных нейронов. Указано число групп на каждом иерархическом уровне (по данным статьи Yao et al., 2023).

пространстве также пересекают региональные границы. Сильное соответствие между транскриптомной и пространственной специфичностью и родством указывает на важность анатомической специализации и регионализации типов клеток, кроме того, повышает достоверность классификации типов клеток, основанной на транскриптоме.

Показаны уникальные особенности организации разных отделов мозга по разнообразию, размерам и удаленности друг от друга кластеров нейронов. Количество кластеров из разных областей мозга не коррелирует с количеством клеток, профилированных с помощью scRNA-seq, даже с поправкой на объемы областей мозга. В отдельных областях коры мозга обнаружили больше кластеров, чем во многих ядрах гипоталамуса, среднего и заднего мозга, что позволяет предположить, что в каждом кортикальном слое расположено больше типов клеток, чем в субрегионах гипоталамуса, среднего и заднего мозга. Кроме того, размеры кластеров (то есть количество клеток в каждом кластере) также различаются в разных областях мозга. Так, гипоталамус, средний мозг и задний мозг состоят из более мелких кластеров, что, вероятно, обусловлено небольшим размером ядер, характерных для этих областей. Выявилась отчетливая разница между антериальной/дорсальной и постериаль-

ной/вентральной частями мозга. Первая содержит сильно различающиеся между собой типы нейронов, тогда как вторая — многочисленные типы нейронов, более близких друг к другу. Выявленная дихотомия может отражать различия в эволюции этих структур мозга.

Наконец, возвращаемся к вопросу о нейротрансмиттерах. Было выявлено необычайное разнообразие и гетерогенность в экспрессии секреторных молекул: нейромедиаторов и нейропептидов. Связь транскриптомной (и онтогенетической) классификацией оказалась неоднозначна. Скорее всего, она отражает многоуровневость нейрональной интеграции и эволюции клеточных типов. Для некоторых нейротрансмиттеров, таких как серотонин, норадреналин и гистамин, действительно показана четкая принадлежность соответствующих нейронов лишь к определенным выразенно отличающимся кластерам, принадлежащими к конкретному подклассу нейронов. Эти транскмиттеры удовлетворяют правилу соответствия происхождения клетки ее транскмиттерной специфичности. Однако наиболее широко распространенные нейротрансмиттеры, глутамат и ГАМК, не только количественно доминируют среди других нейротрансмиттерных типов нейронов. Они к тому же гораздо шире распределены по отделам мозга, классам и клас-

терам нейронов, часто проникая и в консервативные кластеры дофаминовых, серотониновых и других нейронов.

Сходная картина наблюдается и при анализе распределения нейропептидов. Некоторые из них (например, *Cck*, *Pnoc*, *Adcyap1*, *Penk*, *Sst* и *Tac1*) экспрессируются чрезвычайно широко и на высоком уровне (подобно глутамату и ГАМК) в разных онтогенетических группах нейронов. Другие нейропептиды высоко экспрессируются только в одном или нескольких кластерах (например, *Avp*, *Agpr*, *Pomc*, *Pmch*, *Oxt*, *Rln3*, *Npw*, *Nps*, *Ucn*, *Hcrt*, *Gnrh1*, *Gcg* и *Pyy*).

Интересно, что состав коэкспрессируемых транмиттеров не выглядит случайным. Так, найдено большое число кластеров (а именно 62) с двойной экспрессией глутамат–ГАМК. Эти кластеры широко распространены в разных отделах мозга. Глутамат и ГАМК являются также и наиболее распространенными “добавочными” нейротрансмиттерами в сочетании с другими секреторируемыми молекулами. На этом фоне не выявлено ни одного нейрона, экспрессирующего одновременно маркеры серотонина и дофамина. Здесь следует напомнить, что способность синтезировать разные нейротрансмиттеры оценивали с помощью комбинаций маркерных генов. Однако недавние работы выявили выраженную посттрасляционную регуляцию транмиттерного фенотипа и у млекопитающих (Chen et al., 2023), указывающую на то, что оценка числа ко-транмиттеров на основе данных экспрессии маркерных генов может быть существенно завышена.

Таким образом, анализ связи транмиттерного фенотипа с формированием в онтогенезе нейронального фенотипа выявил у млекопитающих, в отличие от дрозофилы, довольно смешанную картину. С одной стороны, есть сигнальные молекулы (классические низкомолекулярные нейротрансмиттеры и пептиды), которые экспрессируются довольно строго в соответствии с линиями развития нейронов. Но на этом фоне глутамат, ГАМК и некоторые нейропептиды экспрессируются настолько широко и разнообразно, что правило “общее происхождение — общий нейротрансмиттер” кажется явно нарушенным. Хотя здесь следует разделять онтогенез и филогенез индивидуальных клеточных линий, а сравнительной инфор-

мации пока недостаточно для специфических предсказаний по типам нейронов.

Такая картина предполагает многофакторность формирования транмиттерного фенотипа нейронов у млекопитающих. То есть, помимо происхождения нейрона в эволюции и онтогенезе, на формирование транмиттер-специфических нейронов оказывали сильное влияние многие, пока не идентифицированные факторы. Одним из важных факторов может быть уже упомянутая динамическая функциональность гетерохимизма. Первое ограничение, которое обуславливает особенности нейрональной архитектуры: многофункциональный ансамбль не может работать на одинаковых нейронах, если он весь состоит из нейронов, имеющих общее происхождение в развитии. Под ансамблем понимается саморегулирующаяся система нейронов с обратными связями, способная контролировать определенную функцию (хороший пример — разнообразные центральные генераторы паттерна). Между тем в связи с возросшей нагрузкой на стабильность нейронального генома у теплокровных (Dyakonova, 2023) в их эволюции могла возникнуть необходимость быстро увеличить число нейронов за счет роста одной популяции нейронов общего происхождения. В таком случае формирование альтернативного гетерохимизма в такой популяции могло происходить уже вторично. Интересно, что “минимальный гетерохимизм” формируется главным образом за счет глутамат- и гамкергических нейронов. Работы 2021 г. позволяют предположить, почему (Moroz 2021; Moroz et al., 2021). Благодаря высокому содержанию глутамата как метаболита во всех живых клетках все, что требуется для формирования его транмиттерной функции, — это разблокировка экспрессии глутаматного везикулярного транспортера. Сходная “эпигенетическая простота” просматривается и в отношении ГАМК, которая синтезируется из глутамата. Здесь достаточно экспрессии всего двух генов для формирования транмиттерной функции.

Кроме того, на формирование транмиттерного ландшафта мозга в эволюции могла влиять разная биологическая стоимость разных транмиттерных фенотипов как в смысле энергии (Moroz et al., 2021), так и в смысле опасности для стабильности генома нейрона (Dyakonova, 2020; 2022; 2023). Действительно, с энергетической точки зрения глутамат является “дешевым” транмиттером. Он требует минимальных

затрат на синтез и позволяет к тому же использовать его метаболиты в качестве источника энергии (Moroz et al., 2021). Эпигенетической простотой и энергетической дешевизной глутамата как нейротрансмиттера можно объяснить выраженное увеличение доли глутаматергических нейронов головного мозга в эволюции млекопитающих (от 50 процентов у мыши до 80 у человека в сравнении с первичноротыми, у которых не более 10 процентов нейронов являются глутаматергическими) (Moroz et al., 2021). Можно предположить, что мозг стремительно увеличивался в эволюции млекопитающих, главным образом за счет увеличения доли глутаматергических нейронов. Кроме того, вторичное обогащение транскрипционного разнообразия новых популяций нейронов происходило, вероятно, за счет ГАМК и некоторых пептидов.

Таким образом, эволюционная траектория мозга формировалась совокупностью разных факторов. Сложное взаимодействие этих факторов может объяснять довольно неоднозначную связь происхождения нейрона, его химического фенотипа и функций у млекопитающих, в отличие от исследованных первичноротых, у которых эта связь хорошо показана.

В заключение следует сказать, что тема онто- и филогении транскрипционных фенотипов нейронов еще не закрыта, напротив, мы являемся свидетелями ее начавшегося возрождения на междисциплинарном этапе развития технологий и научных концепций. В ближайшие годы нас ждут данные по закономерностям формирования нейронального разнообразия у представителей всех 34 типов животных, включая Ctenophora, Porifera, Placozoa и Cnidaria, что существенно прояснит дальнейшие направления тестирования и развития гипотез Д. А. Сахарова.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа В. Е. Дьяконовой поддержана Государственным заданием ИБР РАН № 0088-2021-0008.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы внесли равный вклад в работу над статьей.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Артемов Н. М., Сахаров Д. А. Хачатур Седракович Коштоянц. М.: Наука, 1986.
- Боровягин В. Л., Сахаров Д. А. Ультраструктура гигантских нейронов тритонии. Атлас. М.: Наука, 1968.
- Вагнер Н. П. Беспозвоночные Белого моря. Зоологические исследования, произведенные на берегах Соловецкого залива в летние месяцы 1876, 1877, 1879 и 1882 г. Николаем Вагнером Почетным Членом и Ординарным Профессором Императорского С.-Петербургского Университета. Типография М. М. Стасюлевича, Санкт-Петербург, 1885 г.
- Вепринцев Б. Н., Крафтс И. В., Сахаров Д. А. Нервные клетки голожаберного моллюска *Tritonia diomedea* Bergh // Биофизика. 1964. Т. 9. С. 327–336.
- Коштоянц Х. С.. Основы сравнительной физиологии. Т. 2. Сравнительная физиология нервной системы. М.: Наука, 1957.
- Сахаров Д. А. Об автоматизме pedalных ганглиев у крылоногого моллюска *Clione limacina* L. // Научн. докл. высш. школы (биол. науки). 1960. № 3. С. 60–62.
- Сахаров Д. А. Гигантские нервные клетки у голожаберных моллюсков *Aeolidia papillosa* и *Dendronotus frondosus* // Журн. общ. биол. 1962. Т. 23. С. 308–311.
- Сахаров Д. А. Основания к построению системы нервных клеток // Журнал общей биологии. 1970. Т. 31. № 4. С. 449–457.
- Сахаров Д. А. Почему нейроны разные? // Природа. 1972, № 10. С. 52–62.
- Сахаров Д. А. Генеалогия нейронов. 1974. М.: Наука.
- Сахаров Д. А. Синаптическая и бессинаптическая модели нейронной системы // Простые нервные системы. Ч. 2. 1985. Казань: КГУ, С. 78–80.
- Сахаров Д. А. Множественность нейротрансмиттеров: функциональное значение // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1990. Т. 26. № 5. С. 733–741.
- Сахаров Д. А. Нейронная основа мозговых функций: коннектом versus транскриптом // Когнитивная наука в Москве: новые исследования. М.: Буки-Веди, 2015. С. 395–400.
- Сахаров Д. А., Каботянский Е. А. Интеграция поведения крылоногого моллюска дофамином и серото-

- нином // Журн. общ. биологии. 1986. Т. 47. № 2. С. 234–244.
- Alexeeva V., Borovikov D., Miller M.W., Rosen S.C., and Cropper E.C. Effect of a serotonergic extrinsic modulatory neuron (MCC) on radula mechanosensory afferent function in *Aplysia* // J. Neurophysiol. 1998. V. 80. P. 1609–1622.
<https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.4.1609>.
- Arendt D., Musser J.M., Baker C.V., Bergman A., Cepko C., Erwin D.H., Pavlicev M., Schlosser G., Widder S., and Laubichler M.D. The origin and evolution of cell types // Nature Reviews Genetics. 2016. V. 17. P. 744–775.
- Bach-y-Rita P., Illis L.S. Spinal shock: possible role of receptor plasticity and non synaptic transmission // Paraplegia. 1993. V. 31. N. 2. P. 82–87.
<https://doi.org/10.1038/sc.1993.14>
- Bargmann C.I. Beyond the connectome: How neuro-modulators shape neural circuits // Bioessays. 2012. V. 34. P. 458–465.
- Baysoy A., Bai Z., Satija R., and Fan. R. The technological landscape and applications of single-cell multi-omics // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2023. V. 24. P. 695–713.
<https://doi.org/10.1038/s41580-023-00615-w>
- Benfenati F., Agnati L.F. Communication and computation in the central nervous system // Funct. Neurol. 1991. V. 6. N. 3. P. 202–209.
- Chen N., Zhang Y., Rivera-Rodriguez E.J., Yu A.D., Hobin M., Rosbash M., Griffith L.C. Widespread post-transcriptional regulation of cotransmission // Sci. Adv. 2023. V. 9. N.22.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.adg9836>
- Dorkenwald S., Matsliah A., Sterling A.R. et al. Neuronal wiring diagram of an adult brain // Nature. 2024. V. 634. P. 124–138.
<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07558-y>
- Dyakonova V.E. Neuronal counter of the life span: does it exist? // Russian Journal of Developmental Biology. 2020. V. 51. P. 197–200.
- Dyakonova V.E. Origin and evolution of the nervous system: new data from comparative whole genome studies of multicellular animals // Russian Journal of Developmental Biology. 2022. V. 53. № 1. P. 55–64.
- Dyakonova V.E. DNA Instability in Neurons: Lifespan Clock and Driver of Evolution. // Biochemistry (Moscow). 2023. V. 88. № 11. P. 1719–1731.
<https://doi.org/10.1134/S0006297923110044>
- Eckstein N., Bates A.S., Champion A., Du M., Yin Y., Schlegel P. et al. Neurotransmitter classification from electron microscopy images at synaptic sites in *Drosophila melanogaster* // Cell. 2024. V. 187. N. 10. P. 2574–2594. e23.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.03.016>
- Fuxe K., Agnati L.F., Härfstrand A., Zoli M., von Euler G., Grimaldi R. et al. On the role of neuropeptide Y in information handling in the central nervous system in normal and physiopathological states. Focus on volume transmission and neuropeptide Y/alpha 2 receptor interactions // Ann. NY Acad. Sci. 1990. V. 579. P. 28–67.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb48351.x>
- Kocot K.M., Cannon J.T., Todt C., Citarella M.R., Kohn A.B., Meyer A. et al. Phylogenomics reveals deep molluscan relationships // Nature. 2011. V. 477. P. 452–456.
<https://doi.org/10.1038/nature10382>
- Koshtoyants Kh.S., Buznikov G.A., Manukhin B.N. The possible role of 5-hydroxytryptamine in the motor activity of embryos of some marine gastropods // Comp. Biochem. Physiol. 1961. V. 3. N. 1. P. 20–26.
- Krienen F.M., Levandowski K.M., Zaniewski H., Del Rosario R.C.H., Schroeder M.E., Goldman M. et al. A marmoset brain cell census reveals regional specialization of cellular identities // Sci. Adv. 2023. V. 9. N.41. eadk3986.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.adk3986>
- Kopell N.J., Gritton H.J., Whittington M.A., Kramer M.A. Beyond the connectome: the dynamome // Neuron. 2014. V. 83. N. 6. P. 1319–1328.
- Lacin H., Chen H.-M., Long X., Singer R. H., Lee T., Truman J.W. Neurotransmitter identity is acquired in a lineage-restricted manner in the *Drosophila* CNS // Elife. 2019. V. 8.
<https://doi.org/10.7554/eLife.43701>
- Lin A., Yang R., Dorkenwald S. et al. Network statistics of the whole-brain connectome of *Drosophila* // Nature. 2024. V. 634. P. 153–165.
<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07968-y>
- Moroz L.L. Evolutionary conservative and plastic elements in nervous system of the *Mollusca* // In: Problems of Modern Biology. Moscow University Press. 1986. pp. 19–23.
- Moroz L.L. Phylogenetic plasticity of neuronal cells in molluscan nervous systems // In: Simple Nervous Systems. D. Sakharov, ed. Nauka. 1988. pp. 198–202.
- Moroz L.L. Monoaminergic control of the respiratory behaviour in freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis* (L.) // In: Signal Molecules and Behaviour. W. Winlow, O.V. Vinogradova, and D.A. Sakharov, eds. Manchester University Press. 1991. pp. 101–123.
- Moroz L.L. On the independent origins of complex brains and neurons // Brain Behav. Evol. 2009. V. 74. P. 177–190.
<https://doi.org/10.1159/000258665>
- Moroz L.L. The genealogy of genealogy of neurons // Commun. Integr. Biol. 2014. V. 7. e993269.
<https://doi.org/10.4161/19420889.2014.993269>
- Moroz L.L. Neurosystematics and periodic system of neurons: model vs reference species at single-cell resolution // ACS Chem. Neurosci. 2018. V. 9. P. 1884–1903.
<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00100>
- Moroz L.L. Multiple origins of neurons from secretory cells // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021. V. 9. P. 669087.

- Moroz L.L. Brief History of Ctenophora // *Methods Mol. Biol.* 2024. V. 2757. P. 1–26.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3642-8_1
- Moroz L.L., Kocot K.M., Citarella M.R., Dosung S., Norekian T.P., Povolotskaya I.S. et al. The ctenophore genome and the evolutionary origins of neural systems // *Nature*. 2014. V. 510. P. 109–114.
<https://doi.org/10.1038/nature13400>
- Moroz L.L., Nikitin M.A., Poličar P.G., Kohn A.B., Romanova D.Y. Evolution of glutamatergic signaling and synapses // *Neuropharmacology*. 2021a. V. 199. P. 108740.
[https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90069-8)
- Moroz L.L., Romanova D.Y., Kohn A.B. Neural versus alternative integrative systems: molecular insights into origins of neurotransmitters // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2021b. V. 376. P. 1821. 20190762.
- Moroz L.L., Romanova D.Y. Alternative neural systems: What is a neuron? (Ctenophores, sponges and placozoans) // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 10. 1071961.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1071961>
- Moroz L.L., Collins R., Paulay G. Ctenophora: Illustrated Guide and Taxonomy // *Methods Mol. Biol.* 2024. V. 2757. P. 27–102.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3642-8_2
- Musser J.M., Schippers K.J., Nickel M., Mizzon G., Kohn A.B., Pape C. et al. Profiling cellular diversity in sponges informs animal cell type and nervous system evolution // *Science*. 2021. V. 374. P. 717–723.
<https://doi.org/10.1126/science.abj2949>
- Rózsa K.S., Dyakonova T.L. Interaction of serotonin and leu-enkephalin on the habituating central neurons of *Helix pomatia* L. *in situ* and *in vitro* // *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol.* 1989. V. 92. N.2. P. 361–370.
- Rosen S.C., Kupfermann I., Goldstein R.S., and Weiss K.R. Lesion of a serotonergic modulatory neuron in *Aplysia* produces a specific defect in feeding behavior // *Brain Res.* 1983. V. 260. P. 151–155.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90778-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90778-3)
- Rosen S.C., Kupfermann I., Goldstein R.S., and Weiss K.R. Lesion of a serotonergic modulatory neuron in *Aplysia* produces a specific defect in feeding behavior // *Brain Res.* 1983. V. 260. P. 151–155.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90778-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90778-3)
- Sakharov D.A. Evolutionary aspects of transmitter heterogeneity // *J. Neural. Transm.* 1974a. Suppl. 11. P. 43–59. PMID: 4152422.
- Sakharov D.A. Evolutionary aspects of transmitter heterogeneity // In: *Neurovegetative Transmission Mechanisms: Proceedings of the International Neurovegetative Symposium*, (1974b). Tihany. June 19–24. P. 43–59. Vienna: Springer Vienna.
- Schlegel P., Yin Y., Bates A.S. et al. Whole-brain annotation and multi-connectome cell typing of *Drosophila* // *Nature*. 2024. V. 634. P. 139–152.
<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07686-5>
- Tarashansky A.J., Musser J.M., Khariton M., Li P., Arendt D., Quake S.R., Wang B. Mapping single-cell atlases throughout Metazoa unravels cell type evolution // *Elife*. 2021. V. 10. e66747.
- Whelan N.V., Kocot K.M., Moroz T.P., Mukherjee K., Williams P., Paulay G., Moroz L.L., Halanych K.M. Ctenophore relationships and their placement as the sister group to all other animals // *Nat. Ecol. Evol.* 2017. V. 1. P. 1737–1746.
<https://doi.org/10.1038/s41559-017-0331-3>
- Yao Z., van Velthoven C.T.J., Kunst M., Zhang M., McMillen D., Lee C. et al. A high-resolution transcriptomic and spatial atlas of cell types in the whole mouse brain // *Nature*. 2023. V. 624. N.7991. P. 317–332.
<https://doi.org/10.1038/s41586-023-06812-z>

Genealogy of Neurons: 50 Years of Reconstructing the Evolution of Nervous Systems

L. L. Moroz^{1, *}, V. E. Dyakonova^{2, **}

¹University of Florida, Florida, USA

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

**e-mail: leonidlmoroz@gmail.com*

***e-mail: dyakonova.varvara@gmail.com*

On November 11, Dmitry Antonovich Sakharov (1930–2024), a unique person, mentor, scientist and poet, passed away. This year, the world community celebrates the 50th anniversary of the publication of his book “Genealogy of Neurons”, which had a profound influence on several generations of neuroscientists. The hypotheses, strategies and experimental approaches presented in this book remain relevant and inspiring today. We outline Sakharov’s hypotheses on neuronal polyphyly and the functional significance of neuronal heterogeneity in light of recent comparative, genomics, and single-cell transcriptomic data.

Keywords: origins of neurons, homologous neurons, neurotransmitters, glutamate, GABA, nervous system evolution, neurogenesis, single-cell transcriptomics, brain