

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.632908>

Динамика ультраструктурных изменений желточного синцитиального слоя и его микроокружения в период гастрюляции и раннего постэмбрионального развития *Hemichromis bimaculatus*

Н.Н. Дубинина, С.В. Айдагулова, С.В. Залавина

Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. В эмбриогенезе рыб желточный мешок является важнейшим провизорным органом. Период его активного функционирования совпадает с эмбриональным и ранним постэмбриональным развитием зародыша. Основная функция данного органа — трофическая. Её реализация у костистых рыб (Teleostei) связана со специализированной структурой — желточным синцитиальным слоем (ЖСС). Ультраструктурные преобразования этого слоя в период гастрюляции и раннего постэмбрионального развития, а также его взаимодействие с мигрирующими мышечными волокнами и меланофорами, вероятно, необходимы для эффективного использования питательных веществ развивающимся зародышем. Роль желточного мешка в эмбриогенезе *Hemichromis bimaculatus* может оказаться несколько шире в сравнении с имеющимися представлениями.

Цель исследования — изучить особенности структурной организации желточного мешка Хромиса красавца (*H. bimaculatus*) в эмбриональном и раннем постэмбриональном периодах развития.

Материалы и методы. Исследование проводили на 22 эмбрионах и личинках *H. bimaculatus* с 1-е по 7-е сутки после откладывания икры. Изучали морфологические особенности желточного мешка с использованием световой микроскопии парафиновых и полутонких срезов и трансмиссионной электронной микроскопии.

Результаты. На 2-е сутки желточный мешок был отделён от материала зародыша туловищной складкой. Основной его структурой являлся ЖСС, содержащий многочисленные ядра, микроворсинки, митохондрии и фаголизосомы. Морфологические признаки ЖСС были сходны с таковыми симпластотрофобласта плаценты и свидетельствовали в пользу его высокой функциональной активности. В мезенхиме желточного мешка присутствовали кровеносные сосуды, мигрирующие меланофоры и мышечные волокна. Перидерма, покрытая особой оболочкой, выполняла роль первичной кожи зародыша. Переход личинок Хромиса красавца на экзогенное питание сопровождался значительным уменьшением размера желточного мешка с последующей его инволюцией.

Заключение. Трофическая функция желточного мешка у *H. bimaculatus* реализуется благодаря ЖСС, который в период гастрюляции и постэмбрионального развития взаимодействует с рядом структур, присутствующих в стенке органа. Мигрирующие мышечные волокна способствуют активации желточных гранул; накопление токсичных продуктов обмена связано с меланофорами. Особое строение перидермы обеспечивает защиту желточного мешка и самого зародыша от внешних воздействий.

Ключевые слова: Хромис красавец; *H. bimaculatus*; желточный мешок; желточный синцитиальный слой; микроокружение; морфология; эмбриогенез костистых рыб.

Как цитировать:

Дубинина Н.Н., Айдагулова С.В., Залавина С.В. Динамика ультраструктурных изменений желточного синцитиального слоя и его микроокружения в период гастрюляции и раннего постэмбрионального развития *Hemichromis bimaculatus* // Морфология. 2024. Т. 162, № 2. С. 115–126. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.632908>

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.632908>

Dynamics of ultrastructural changes in the yolk syncytial layer and its microenvironment during gastrulation and early postembryonic development of *Hemichromis bimaculatus*

Natalya N. Dubinina, Svetlana V. Aidagulova, Svetlana V. Zalavina

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: In fish embryogenesis, the yolk sac is the critical provisional organ, actively functioning during the embryonic and early postembryonic stages. Its primary role is trophic, facilitated in Teleostei by a specialized structure — the yolk syncytial layer (YSL). Ultrastructural transformations of this layer during gastrulation and early postembryonic development, as well as its interaction with migrating muscle fibers and melanophores, are probably necessary for the efficient use of nutrients by the developing embryo. The yolk sac's role in the embryogenesis of *Hemichromis bimaculatus* may extend beyond current conceptions.

AIM: To study the structural organization of the Jewel Cichlid (*H. bimaculatus*) yolk sac during the embryonic and early postembryonic development.

MATERIALS AND METHODS: The research was involved 22 embryos and larvae of *H. bimaculatus* from 1 to 7 days after egg laying. The morphological features of the yolk sac were studied using light and transmission electron microscopy.

RESULTS: By day 2, the yolk sac was separated from the embryo by the trunk fold. Its main structure was the YSL, containing numerous nuclei, microvilli, mitochondria and phagolysosomes. The morphological features of the YSL were similar to those of the placental symplastotrophoblast and indicated high functional activity. The yolk sac mesenchyme contained blood vessels, migrating melanophores, and muscle fibers. The periderm, covered with a special shell, functioned as the primary skin of the embryo. The transition to exogenous nutrition in Jewel Cichlid larvae was accompanied by a significant decrease in yolk sac size with its subsequent involution.

CONCLUSIONS: The trophic function of the yolk sac in *H. bimaculatus* is mediated by the YSL, which, during gastrulation and postembryonic development, interacts with a number of structures present in the yolk sac wall. Migrating muscle fibers promote activation of yolk granules; accumulation of toxic metabolic products is associated with melanophores. The special structure of the periderm protects both the yolk sac and the embryo from external influences.

Keywords: Jewel Cichlid; *H. bimaculatus*; yolk sac; yolk syncytial layer; microenvironment; morphology; teleost embryogenesis.

To cite this article:

Dubinina NN, Aidagulova SV, Zalavina SV. Dynamics of ultrastructural changes in the yolk syncytial layer and its microenvironment during gastrulation and early postembryonic development of *Hemichromis Bimaculatus*. *Morphology*. 2024;162(2):115–126. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.632908>

Received: 27.05.2024

Accepted: 17.07.2024

Published: 05.09.2024

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.632908>

胚胎发育和胚后早期发育过程中卵黄合质层及其微环境的超微结构动态变化

Hemichromis bimaculatus

Natalya N. Dubinina, Svetlana V. Aidagulova, Svetlana V. Zalavina

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

摘要

论证。在鱼类胚胎发育过程中，卵黄囊是最重要的辅助器官。其功能活跃期与胚胎和胚后早期发育期一致。该器官的主要功能是营养。在硬骨鱼类（远洋鱼类）中，它的实现与一种特殊的结构——卵黄合质层——有关。

这项研究的目的是调查戴氏绒螯虾（*H. bimaculatus*）在胚胎和胚后早期发育时期卵黄囊结构组织的特殊性。

材料和方法。该研究针对产卵后第 1 天至第 7 天的 22 枚胚胎和 *H. bimaculatus* 幼虫进行。使用石蜡和半薄切片光镜以及透射电子显微镜研究了卵黄囊的形态特征。

结果。第 2 天，卵黄囊通过体褶与胚胎物质分离。其主要结构是卵黄合质层，包含大量细胞核、微绒毛、线粒体和吞噬体。卵黄合胞层的形态特征与胎盘合体滋养细胞的形态特征相似，证明其具有很高的功能活性。卵黄囊间质中有血管、迁移的黑色素细胞和肌纤维。外皮覆盖着一层特殊的鞘，是胚胎的主要皮肤。在 *H. bimaculatus* 幼虫过渡到外源喂养的过程中，卵黄囊的体积显著缩小，随后内陷。

结论。在胚胎形成和胚后发育过程中，卵黄合质层与器官壁上的许多结构相互作用，从而实现了 *H. bimaculatus* 卵黄囊的营养功能。移动的肌肉纤维有助于激活卵黄颗粒。有毒代谢产物的积累与黑素细胞有关。外皮的特殊结构可保护卵黄囊和胚胎本身免受外界影响。

关键词：贝氏鲂；*H. bimaculatus*；卵黄囊；卵黄合胞层；微环境；形态；硬骨鱼类的胚胎发生。

To cite this article:

Dubinina NN, Aidagulova SV, Zalavina SV. 胚胎发育和胚后早期发育过程中卵黄合质层及其微环境的超微结构动态变化 *Hemichromis bimaculatus*. *Morphology*. 2024;162(2):115–126. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.632908>

Received: 27.05.2024

Accepted: 17.07.2024

Published: 05.09.2024

ОБОСНОВАНИЕ

Общепризнанным является тот факт, что большинство хордовых животных в период овогенеза синтезируют и запасают желток в цитоплазме женских половых клеток [1]. В то время как яйцеклетки ланцетника содержат лишь небольшой запас питательных веществ, количество желтка в яйцеклетках костистых рыб (Teleostei) оказывается достаточно высоким [2, 3]. Неполный тип дробления, характерный для данных животных, приводит к формированию дискобластулы, в которой желток полностью отделяется от материала эмбриона [4]. В процессе гаструляции пролиферирующая бластодерма быстро обрастает поверхность желтка, что приводит к формированию желточного мешка — важнейшего внезародышевого органа позвоночных [5]. Из всей системы провизорных органов в процессе эволюции он возникает первым. Важнейшей функцией этого органа (наряду с кроветворением и локализацией гоноцитов) является депонирование желтка с последующим его использованием развивающимся зародышем.

Планомерное и эффективное усвоение запаса питательных веществ у всех костистых рыб осуществляется благодаря формированию желточного синцитиального слоя (ЖСС) — высокоспециализированной структуры, отсутствующей у других представителей позвоночных [3]. Её взаимодействие с желтком, а позже и сосудами желточного мешка обеспечивает трофическую поддержку развивающемуся эмбриону до полного перехода последнего на экзогенный тип питания [4].

Несмотря на неослабевающий интерес исследователей к особенностям строения и функционирования ЖСС [6–10], некоторые структуры желточного мешка рыб до сих пор изучены фрагментарно. Между тем в составе его стенки присутствуют ткани, отличные от дефинитивных [2, 6], а также клеточные элементы, мигрирующие в период формообразовательных процессов в направлении своего будущего месторасположения [8, 11, 12]. Кроме того, в литературе практически отсутствуют сведения, касающиеся возможных взаимодействий между такими элементами.

Цель исследования — изучить структурную организацию желточного мешка у представителя костистых рыб Хромиса красивца (*Hemichromis bimaculatus*) в эмбриональный и ранний постэмбриональный периоды развития.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено экспериментальное неослепленное одноцентровое одномоментное выборочное неконтролируемое исследование.

Объектом исследования служили личинки Хромиса красивца (*H. bimaculatus*), представителя африканских цихлид, в периоды желточного и смешанного питания. Данный вид семейства цихловых широко используется

в аквариумистике из-за простоты его разведения, неприхотливости и яркого, запоминающегося внешнего вида. Потомство было получено в результате естественного нереста родительской пары линии рыб на открытый субстрат. Начальный этап инкубации икры (1-е сутки) проходил в аквариуме ($V=120$ л) при температуре воды 24–26 °С, на фоне непрерывной аэрации и фильтрации воды. Световой режим соответствовал сезону (ранняя осень) и составлял 10/14 ч (день/ночь). На 2-е сутки после нереста икринки вместе с субстратом были перенесены в меньший аквариум ($V=5$ л) с аналогичными условиями содержания. Каждые 2–3 дня заменяли 1/5 объема воды. С 3-х суток, когда личинки начинали вылупляться и могли самостоятельно перемещаться, в их рацион вводили декапсулированное яйцо артемии и стартовый сухой корм «Малыш» («Аква Меню», Россия).

Забор материала выполняли с 1-х по 7-е сутки развития ($n=22$, n — суммарное количество исследуемых особей) с интервалом в одни сутки. При работе с животными соблюдали этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). Исследование одобрено Комитетом по этике ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России (протокол № 32 от 17.03.2011 г.). Личинки целиком (вместе с желточным мешком) фиксировали в охлажденном до 4 °С 4% растворе параформальдегида, приготовленном на фосфатном буфере Миллонига (pH 7,3). Для светооптического исследования материал обезживали в растворе этилового спирта возрастающей концентрации, выдерживали в ксилоле, смеси ксилола и парафина с последующей заливкой в парафин. Серийные поперечные и парасагитальные гистологические срезы получали при помощи ротационного микротомы EpreDia HM 325 (Carl Zeiss, Германия). Для окрашивания срезов использовали гематоксилин Эрлиха и эозин («БиоВитрум», Россия).

Для электронно-микроскопического исследования материал дофиксировали в 1% растворе OsO_4 , обезживали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, затем заливали в смесь эпоксидных смол; блоки полимеризовали в термостате при 60 °С в течение 24 ч. Полутонкие (1 мкм) и ультратонкие (30–50 нм) срезы получали на ультрамикротоме LKB-3 (LKB, Швеция). Полутонкие срезы монтировали на обезжиренные предметные стёкла и окрашивали на гистологическом столике (37 °С) в капле 1% раствора толуидинового синего. Все гистологические препараты изучали с помощью микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали при помощи цифровой видеокамеры AxioCam ICc 1 (Carl Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным спиртовым раствором уранилацетата и цитратом свинца в парах щёлочи натрия по Рейнольдсу, затем исследовали в электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВт.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Хромисы красавцы по месту нереста являются литофильными рыбками — свою икру откладывают на камни. Икринки у них очень мелкие, диаметром 0,4–0,5 мм, прочно связанные с субстратом клейкой оболочкой, покрывающей их снаружи. На 1-е сутки после откладывания икры размеры эмбриона крайне малы, в связи с чем его идентификация на парафиновых срезах оказывалась затруднительной.

На 2-е сутки развития зародыш находился на стадии гастрюляции и постепенно увеличивался в размерах. Формирующаяся туловищная складка отделяла его от желточного мешка (рис. 1, *a*), который был заполнен значительным количеством желтка. Желток *H. bimaculatus*, как и у большинства представителей цихловых рыб, имел пластинчатую структуру. Распределение пластинок было неравномерным: наиболее крупные из них располагались в центральной части органа (рис. 1, *b*). В процессе эпиболии наблюдали постепенное продвижение ЖСС в латеральные, а позже и в вентральный отделы желточного мешка. Характерным морфологическим признаком ЖСС Хромиса красавца являлись многочисленные крупные ядра неправильной формы, расположенные в части цитоплазмы, контактирующей с желтком (рис. 1, *c*).

На 3-и сутки наблюдали появление двигательной активности сформированных и отделившихся от желточного

мешка хвостовых частей личинок, при этом зародыши сохраняли связь с субстратом в своей головной части. При анализе полутонких срезов отмечали появление ряда зачатков органов (будущих эмбриональных структур) и тканей, наблюдали процессы гисто- и органогенеза (рис. 2, *a*). Желточный мешок выглядел сформированным и вполне дифференцированным органом, что соответствует хорошо известному принципу опережающего развития провизорных структур. Толщина ЖСС значительно увеличивалась (рис. 2, *b*). В его составе присутствовали многочисленные ядра с «комообразными хвостами» (рис. 2, *c*). Часть цитоплазмы, свободная от ядер, содержала желточные включения, фаголизомы и находилась в непосредственном контакте с крупными жировыми каплями, кажущимися пустыми из-за особенностей проводки материала (рис. 2, *d*). В мезенхиме желточного мешка присутствовали кровеносные сосуды с эритроцитами и меланофоры, расположенные снаружи от ЖСС (см. рис. 2, *c*). К концу данного периода некоторые эмбрионы освобождались от яйцевых оболочек и начинали самостоятельно передвигаться.

На 4-е сутки все развивающиеся личинки *H. bimaculatus* вместе с желточным мешком откреплялись от субстрата, имели близкую к линейной форму и переходили на смешанный тип питания. Морфологические особенности, характерные для ЖСС в этот период (многочисленные полирибосомы, цистерны гранулярной эндоплазматической

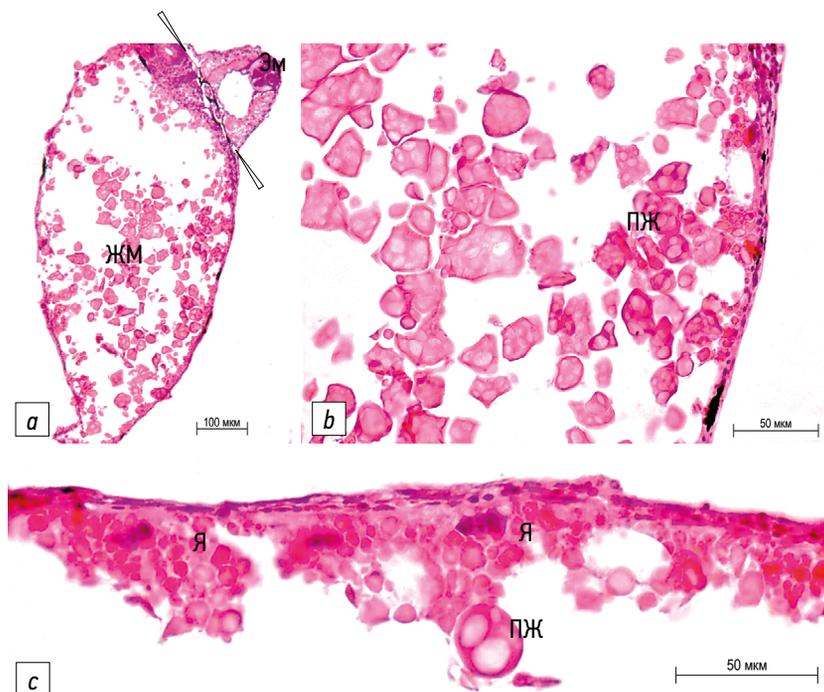


Рис. 1. Желточный мешок Хромиса красавца на 2-е сутки после откладывания икры (окраска гематоксилином и эозином): *a* — поперечный срез зародыша на стадии гастрюлы, общий вид; $\times 100$; *b* — пластинчатая структура желтка; $\times 400$; *c* — крупные ядра желточного синцитиального слоя; $\times 400$. Здесь: ЖМ — желточный мешок; Эм — эмбрион; ПЖ — пластинки желтка; Я — ядра желточного синцитиального слоя. Наконечниками стрелок отмечена туловищная складка.

Fig. 1. Yolk sac of *Hemichromis bimaculatus* on the 2nd day after egg laying (hematoxylin and eosin staining): *a* — cross section of the embryo at the gastrula stage, general view; $\times 100$; *b* — lamellar structure of the yolk; $\times 400$; *c* — large nuclei of yolk syncytial layer; $\times 400$. Here: ЖМ — yolk sac; Эм — embryo; ПЖ — yolk plates; Я — yolk syncytial layer nuclei. The tips mark the trunk fold.

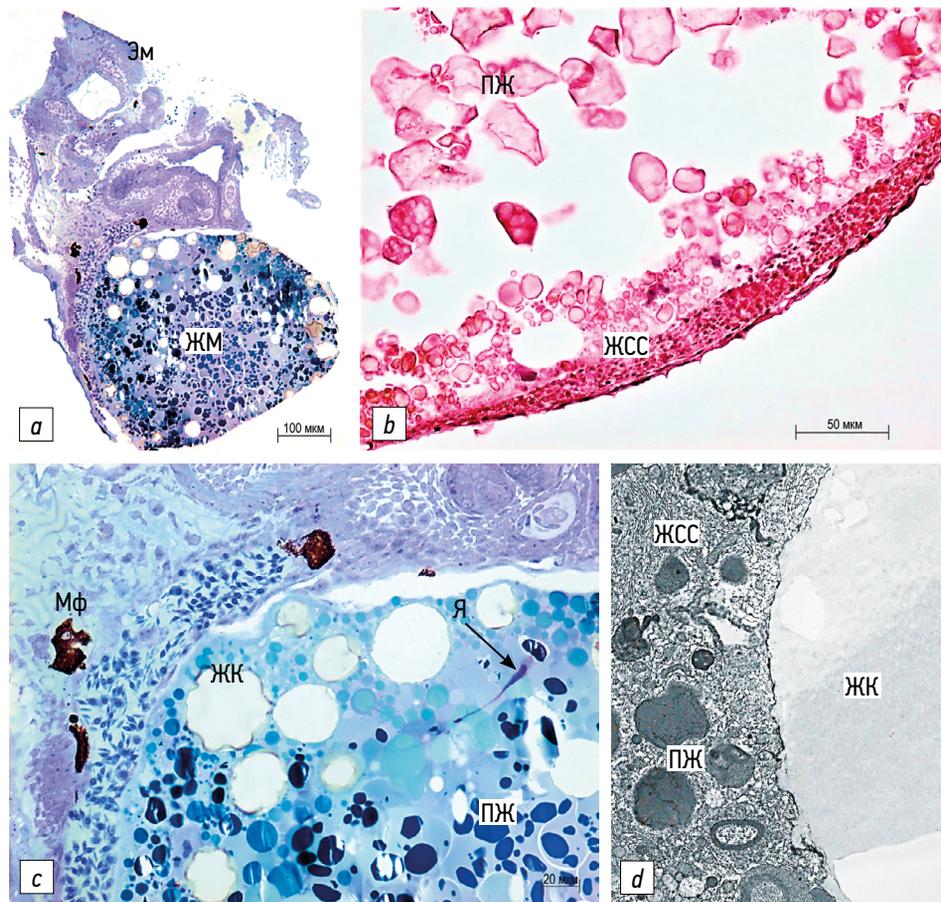


Рис. 2. Желточный мешок Хромиса крапеваца на 3-и сутки после откладки икры: *a* — поперечный срез зародыша, общий вид, полутонкий срез; окраска толуидиновым синим; $\times 100$; *b* — контактирующий с желтком желточный синцитиальный слой, парасагитальный срез; окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$; *c* — жировые капли, пластинки желтка, ядра желточного синцитиального слоя и меланофоры в стенке органа, поперечный срез, полутонкий срез; окраска толуидиновым синим; $\times 400$; *d* — жировая капля, желточные включения и фаголизосомы желточного синцитиального слоя, электронограмма, $\times 4000$. Здесь: ЖМ — желточный мешок; Эм — эмбрион; ПЖ — пластинки желтка; ЖСС — желточный синцитиальный слой (цитоплазма); Я — ядро желточного синцитиального слоя (указано стрелкой); ЖК — жировая капля; Мф — меланофор.

Fig. 2. Yolk sac of the *Hemichromis bimaculatus* on the 3rd day after egg laying: *a* — embryo cross section, general view; toluidine blue staining; $\times 100$; *b* — yolk syncytial layer in contact with the yolk, parasagittal section; hematoxylin and eosin staining; $\times 400$; *c* — fat droplets, yolk plates, yolk syncytial layer nuclei and migrating melanophores in the organ wall, cross section; toluidine blue staining; $\times 400$; *d* — the ultrastructure (TEM) of the yolk syncytial layer; $\times 4000$. Here: ЖМ — yolk sac; Эм — embryo; ПЖ — yolk plates; ЖСС — yolk syncytial layer (cytoplasm); Я — yolk syncytial layer nucleus (indicated by an arrow); ЖК — fat droplet; Мф — melanophore.

сети, вакуоли и митохондрии), свидетельствовали о его высокой биосинтетической и метаболической активности (рис. 3). Поглощение и расщепление желточных включений осуществлялось при активном участии микроворсинок и фаголизосом. В результате утилизации фосфолипидов в цитоплазме ЖСС появлялись миелиновые тельца, характерные также для желточной энтодермы птиц.

Помимо ЖСС, в стенке желточного мешка *H. bimaculatus* наблюдали ряд структур и клеток, нехарактерных для данного органа большинства животных. В частности, здесь присутствовали крупные меланофоры, содержащие в теле и отростках многочисленные гранулы пигмента (рис. 4, *a, b*). К концу исследуемого периода (7-е сутки) часть меланофоров вплотную прилежала к кишке эмбриона (рис. 5, *c*). Между ЖСС и перидермой, ближе к наружной поверхности желточного мешка,

идентифицировали поперечно-полосатую мышечную ткань, производную миотомов (рис. 4, *c*; рис. 5, *b*). По данным электронно-микроскопического исследования, в её составе преобладали примитивные одноядерные мышечные волокна с миофибриллами, в которых были чётко выражены саркомеры (рис. 4, *d*).

Перидерма была представлена 1–2 слоями клеток округлой (рис. 4, *e*) или неправильной формы (рис. 4, *f*), связанных десмосомами. Снаружи её покрывала электронно-плотная оболочка с «шипообразными» выростами (см. рис. 4, *a, c, e, f*). Между клетками перидермы выявляли широкие межклеточные пространства.

На 5–6-е сутки личинки Хромиса крапеваца переходили в основном на экзогенное питание. В пользу этого свидетельствовали как соотношение эмбриональных и внезародышевых структур (рис. 5, *a*), так и ряд морфологических

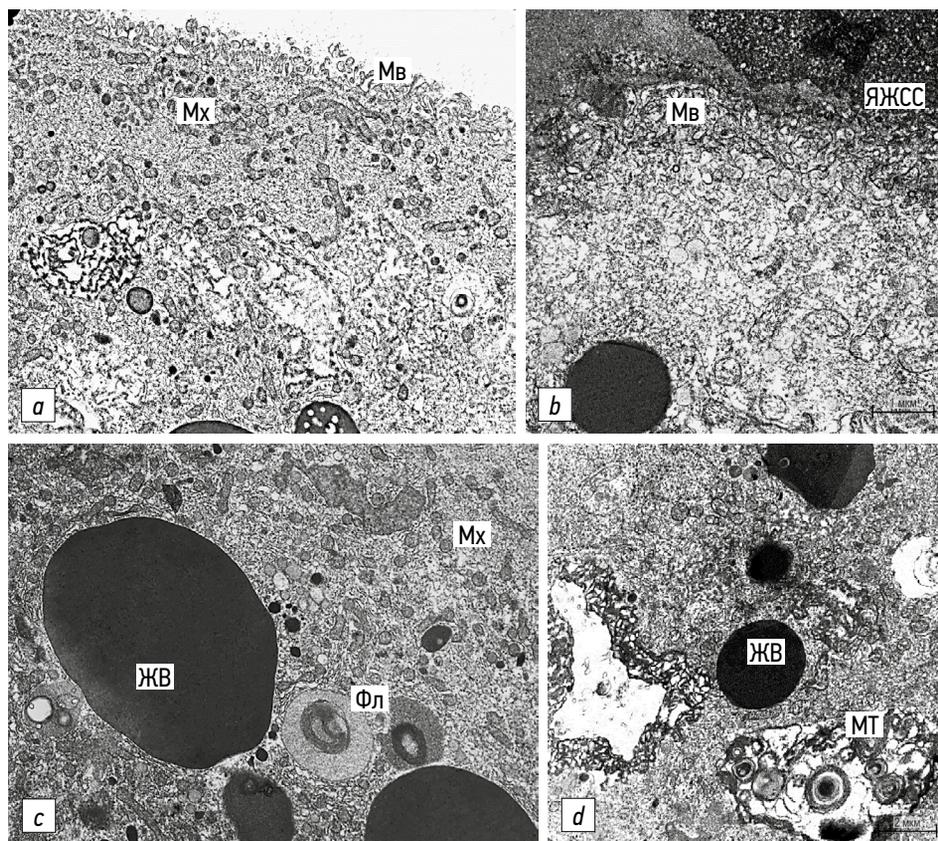


Рис. 3. Ультраструктурная организация желточного синцитиального слоя Хромиса крапивоца на 4-е сутки после откладки икры ($\times 4000$): *a* — апикальная поверхность с микроворсинками; *b* — ядродержащая часть; *c, d* — желточные включения, фаголизосомы, миелиновые тельца и митохондрии в цитоплазме. Здесь: ЖВ — желточные включения; ЯЖСС — ядро желточного синцитиального слоя; Мв — микроворсинки; Мх — митохондрии; Фл — фаголизосомы; МТ — миелиновые тельца.

Fig. 3. The ultrastructure (TEM) of the yolk syncytial layer of the *Hemichromis bimaculatus* on the 4th day after egg laying ($\times 4000$): *a* — apical surface with microvilli; *b* — nucleus-containing part; *c, d* — yolk inclusions, phagolysosomes, myelin bodies and mitochondria in the cytoplasm. Here: ЖВ — yolk inclusions; ЯЖСС — yolk syncytial layer nucleus; Мв — microvilli; Мх — mitochondria; Фл — phagolysosomes; МТ — myelin bodies.

особенностей органов системы пищеварения личинки: «ажурная» печень, наличие химуса в желудке, присутствие ворсинок в стенке тонкой кишки (см. рис. 5, *a*; рис. 5, *d*). Желток в полости желточного мешка становился более структурированным — его периферическая часть была представлена глобулами, размеры которых уменьшались от центра органа по направлению к ЖСС (см. рис. 5, *b*).

К 7-м суткам развития объём желточного мешка значительно сократился. На парафиновых срезах остатки органа визуализировали преимущественно в головной части *H. bimaculatus*. Наиболее характерными структурами ЖСС в данный период по-прежнему были многочисленные ядра неправильной формы (см. рис. 5, *d*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Желточный мешок является ключевым внезародышевым органом в эмбриогенезе животных. Унаследовав общие черты своего строения и функции от костистых рыб, он сохранил высокую степень их консервативности у большинства наземных позвоночных.

Полость желточного мешка Teleostei заполнена значительным количеством желтка. Он накапливается в цитоплазме яйцеклетки ещё в период овогенеза и на этом этапе обеспечивает её механическую прочность. На стадии дробления, при взаимодействии желтка с бластодермой, активируется ряд процессов, которые в последующем контролируют формирование и дифференциацию большинства эмбриональных зачатков [3].

Важнейшим дискуссионным вопросом эволюции многоклеточных является симпластический (в современной литературе отождествляемый многими авторами с термином «синцитиальный») принцип организации обеспечивающих трофику структур, которые функционируют в эмбриогенезе [6, 7, 13–15]. Типичными примерами таких структур являются симпластотрофобласт ворсинчатого хориона плацентарных и ЖСС желточного мешка костистых рыб. В основу создания этих моделей положен универсальный принцип организации, который возник в филогенезе сотни миллионов лет назад. При этом морфологические особенности ЖСС (из всех известных в настоящее время симпластов) остаются наименее изученными [3], как, впрочем, и у разных представителей Teleostei [8].

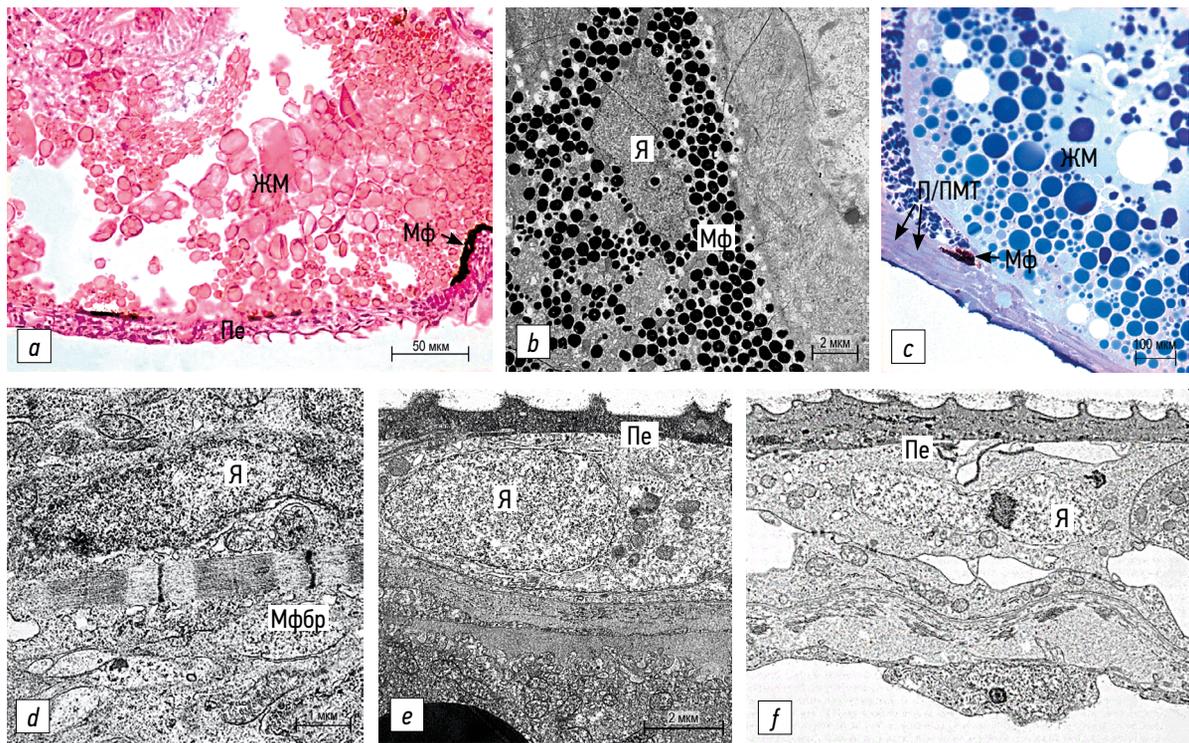


Рис. 4. Структурные элементы желточного мешка Хромиса красавца на 4–5-е сутки после откладки икры: *a* — перидерма, парасагитальный срез; окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$; *b* — ультраструктурная организация меланофора; $\times 4500$; *c* — мышечные волокна и меланофоры на поверхности органа, поперечный срез, полутонкий срез; окраска толуидиновым синим; $\times 400$; *d* — фрагмент мышечного волокна; *e, f* — ультраструктурная организация клеток перидермы, электронограммы, $\times 4000$. Здесь: ЖМ — желточный мешок; Я — ядра клеток; Мф — меланофор; Пе — перидерма; П/ПМТ — поперечно-полосатая мышечная ткань; Мфбр — миофибрилла.

Fig. 4. Structural elements of the *Hemichromis bimaculatus* yolk sac on days 4–5 after egg laying: *a* — periderm, parasagittal section; hematoxylin and eosin staining; $\times 400$; *b* — melanophore ultrastructure; $\times 4500$; *c* — muscle fibers and melanophores on the organ surface, the cross section, the thin section; toluidine blue staining; $\times 400$; *d* — muscle fiber fragment; *e, f* — ultrastructure of periderm cells, electronograms, $\times 4000$. Here: ЖМ — yolk sac; Я — cell nuclei; Мф — melanophore; Пе — periderm; П/ПМТ — striated muscle tissue; Мфбр — myofibril.

Механизм образования симпластов оказывается во многом сходным. В частности, возникновению симпластотрофобласта предшествует появление его клеточной формы с последующим слиянием клеток. Многочисленные деления бластомеров с неполным цитокинезом [16, 17] приводят к появлению ЖСС, цитоплазма которого также содержит несколько сотен ядер [18]. Отдельного внимания заслуживает факт обособления зачатков данных структур в один и тот же период эмбриогенеза. Это происходит на этапе дробления, когда потенциалы бластомеров сохраняются на достаточно высоком уровне.

Принимая во внимание вышеизложенное, можно говорить о сходных морфофункциональных характеристиках ЖСС и симпластотрофобласта [1], механизме и сроках формирования данных структур в процессе развития позвоночных. Очевидно, что уже на начальных этапах эмбриогенеза «клеточные ансамбли» трофических структур постепенно преобразуются в симпластические формы в связи с наличием у последних ряда существенных функциональных преимуществ. Одним из подтверждений такого предположения является гипотеза «миогенного домена» [19], согласно которой каждое ядро в составе

мышечного волокна контролирует часть своей собственной территории; дифференциальная транскрипция генов характерна и для ядер симпластотрофобласта плаценты. Присутствие множества небольших ядер в подобных структурах позволяет минимизировать расстояние, на которое осуществляется транспорт продуктов их транскрипции в цитоплазму. Нельзя исключать, что аналогичные взаимодействия внутри ЖСС лежат в основе его быстрой структурной перестройки в периоды активного формирования и завершения функционирования.

Помимо обеспечения зародыша питанием, ЖСС приписывают функции передачи врожденного иммунитета от матери к потомству и активного участия в морфогенетических процессах. Так, ЖСС в эмбриогенезе является «каркасом» для миграции меланофоров, кардиомиоцитов и мышечных волокон скелетной мускулатуры [3, 20]. Последние представляют собой две последовательно возникающие генерации мышечных волокон, детально описанные в эмбриогенезе *Danio rerio* [21]. В отличие от высших позвоночных, формирование исчерченной мышечной ткани у рыбок *Danio* начинается ещё до образования сомитов, в особых адаксиальных клетках, расположенных

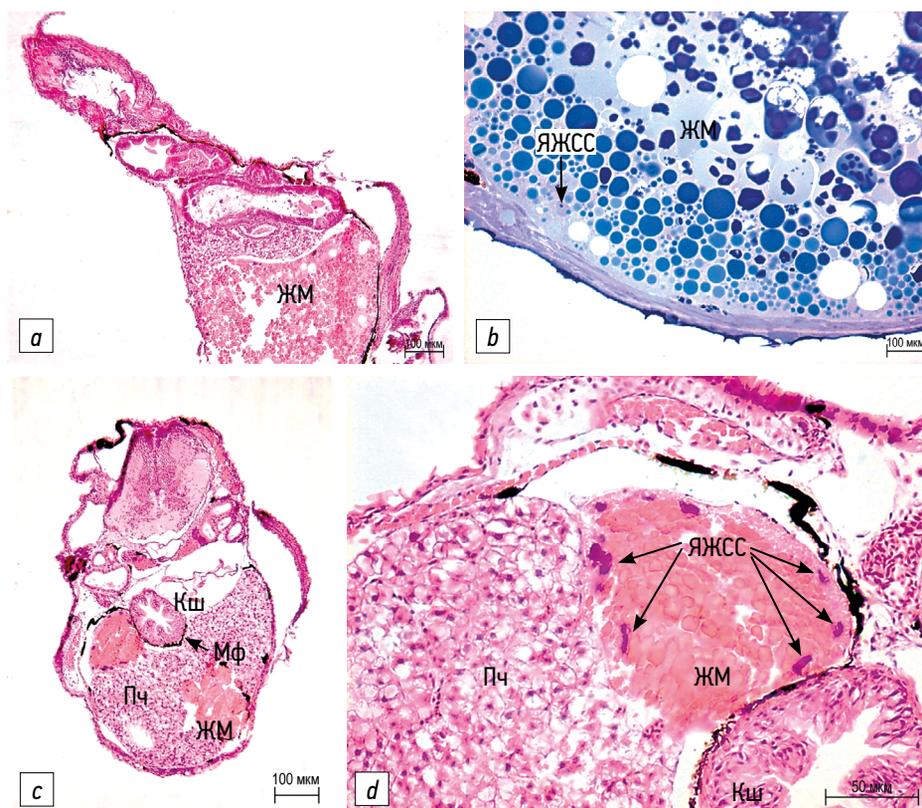


Рис. 5. Желточный мешок Хромиса крапивоца на 5–7-е сутки после откладывания икры: *a* — поперечный срез зародыша (5-е сутки), общий вид; окраска гематоксилином и эозином; $\times 100$; *b* — структура желтка, парасагитальный срез; окраска толуидиновым синим; $\times 400$; *c* — поперечный срез зародыша (7-е сутки), общий вид; окраска гематоксилином и эозином; $\times 100$; *d* — фрагмент вентральной части зародыша; окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$. Здесь: ЖМ — желточный мешок; ЯЖСС — ядра желточного синцитиального слоя (указаны стрелками); Мф — меланофоры (указаны стрелкой); Пч — печень; Кш — кишка эмбриона.

Fig. 5. Yolk sac of the *Hemichromis bimaculatus* on the 5–7 day after egg laying: *a* — embryo cross section (5th day), general view; hematoxylin and eosin staining; $\times 100$; *b* — yolk structure, parasagittal section; toluidine blue staining; $\times 400$; *c* — embryo cross section (7th day), general view; hematoxylin and eosin staining; $\times 100$; *d* — fragment of the ventral part of the embryo; hematoxylin and eosin staining; $\times 400$. Here: ЖМ — yolk sac; ЯЖСС — YSS nuclei (indicated by arrows); Мф — melanophore (indicated by arrow); Пч — liver; Кш — embryonic intestine.

рядом с хордой в составе пресомитной мезодермы. Присутствие в стенке желточного мешка *H. bimaculatus* поверхностных медленных одноядерных мышечных волокон, которые мы наблюдали в своём исследовании, отражает общий принцип миогенеза у разных представителей костистых рыб и совпадает по времени с началом первичной двигательной активности зародыша, а также с его ротацией внутри икринки. Согласно данным I. Ramos с соавт., миграция дифференцирующихся мышечных волокон в направлении закладки мышц плавников сопровождается локальным «перемешиванием» содержимого желточного мешка, что в последующем приводит к активации желточных гранул различного типа (в том числе содержащих гидролазы) [1]. Важную роль в этом процессе, по-видимому, играют быстросокращающиеся многоядерные волокна второй генерации. Подтверждением этого факта являются результаты R. Piesiewicz с соавт., согласно которым личинки трёх исследованных видов рыб рода *Cichlasoma* после вылупления из икринки свободно лежат на дне, совершая интенсивные движения телом, но при этом не могут активно плавать [22].

В целом ЖСС *H. bimaculatus* демонстрирует морфологические черты, характерные для большинства изученных костистых рыб (структурную регионализацию, крупные полиморфные ядра и липидные капли, окружённые тонким слоем цитоплазмы) [2, 3, 6, 8, 9, 20]. Желточный комплекс Хромиса крапивоца оказывается близким по строению с таковым у бирюзовой акары, *Andinoacara rivulatus* (Cichlidae). В частности, в цитоплазме ЖСС у личинок этих рыб присутствуют желточные включения, размер которых уменьшается от базальной к апикальной поверхности, а сам желток имеет глобулярную структуру. Апикальная поверхность ЖСС тесно связана с кровеносными сосудами и мигрирующими пигментными клетками [20].

В то же время ЖСС *H. bimaculatus* имеет ряд особенностей, характерных для представителей других семейств Teleostei. В частности, длинные, густо расположенные на апикальной поверхности микроворсинки в области Кювьеровых протоков позволяют сравнивать эту структуру с ЖСС *D. rerio* [8], а сохранившиеся жировые капли после полной утилизации желточной массы — с Сиговыми Coregonidae (Salmoniformes) [9].

Присутствие многочисленных меланофоров в стенке желточного мешка рыб, на первый взгляд, можно объяснить их участием в рефлекторных реакциях, связанных с изменением окраски кожных покровов, и защитой от ультрафиолетовых лучей. Однако изначально в филогенезе у этих животных пигментная система кожи обеспечивала выделение токсичных для зародыша продуктов обмена [5, 23]. В частности, меланин оказался идеальным вариантом для консервации вредных индольных производных, а некоторые функции пигментного комплекса кожи во время эмбриогенеза рыб напрямую зависели от пигментов, расположенных в тканях, некоторых органах и икре.

У современных Teleostei важную роль в эмбриональном развитии играют каротиноиды, которые в свободном виде присутствуют в жировых каплях желтка. В период каскадообразного расщепления содержимого желточного мешка каротиноиды активно участвуют в процессе перекисного окисления липидов, выполняя роль антиоксидантов [23]. В результате они позволяют сохранить высокоэнергетические запасы питательных веществ нетронутыми до момента вылупления личинок. Позже эти вещества используются для эндогенного питания, а также для увеличения плавучести зародышей после их выхода из яйцевых оболочек.

Важную роль в защите эмбриона от механических воздействий выполняет перидерма, покрытая снаружи толстой оболочкой неклочного строения (хорионом). Последняя образуется во время овогенеза, состоит преимущественно из белков и гликопротеинов и быстро затвердевает после активации яйцеклетки. Особый химический состав этой оболочки обеспечивает прочное приращение икры к субстрату на определённом этапе развития эмбриона. Помимо функции механической защиты хорион регулирует водный баланс икры, а также является полупроницаемым барьером для микроорганизмов и загрязняющих факторов окружающей среды [3]. Расширенное пространство между клетками перидермы, а также перидермой и хорионом облегчают процессы диффузии между тканями зародыша и средой его обитания.

Сами клетки перидермы, представленные 1–2 слоями эпителия, функционируют как первичная «кожа», защищающая расположенные глубже эмбриональные структуры от механических повреждений. Эта функция реализуется начиная с этапа дробления и заканчивая по меньшей мере личиночным периодом, после чего перидерма заменяется дефинитивным эпидермисом [3].

Период функционирования желточного мешка у *H. bimaculatus* недолгий (7 сут) и в целом совпадает с таковым у других представителей рода *Cichlasoma* — зелёного террора (*Andinoacara rivulatus*), красного дискуса (*Symphysodon discus*) и цихлиды ягуар (*Parachromis managuensis*). Рассасывание желточного мешка у личинок этих рыб наблюдается в течение 4–7 сут после откладывания икры [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Желточный мешок играет одну из фундаментальных ролей в эмбриогенезе *Hemichromis bimaculatus*. Помимо ассимиляции белков желтка с целью обеспечения развивающегося зародыша питательными веществами он участвует в ряде морфогенетических процессов, являясь направляющим каркасом для обеспечения миграции меланофоров и мышечных волокон скелетной мускулатуры. Общеизвестными для всех позвоночных функциями желточного мешка являются его участие в процессе кроветворения, а также создание условий для дифференцирующихся гоноцитов. Нельзя исключать, что полифункциональность данного внезародышевого органа является результатом тесной кооперации структурных элементов различного генеза, присутствующих в его стенке в изученный период.

Полученные результаты расширяют имеющиеся знания о фундаментальной роли желточного мешка в эмбриогенезе костистых рыб и позвоночных в целом. Они позволяют говорить о существовании ряда структурных и функциональных параллелей между желточным мешком и ворсинчатым хорионом плацентарных млекопитающих, возникшим в эволюции в значительно более поздний период.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов и интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: Н.Н. Дубинина — концепция и дизайн исследования, гистологическая обработка материала, анализ материала, анализ литературных источников, написание и редактирование статьи; С.В. Айдагулова — гистологическая обработка материала, написание текста статьи, редактирование статьи; С.В. Залавина — написание текста, редактирование статьи, общее руководство исследованием.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation

of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. N.N. Dubinina — conception and design of the study, analysis of the material and literary sources, preparation and writing of the text of the article; S.V. Aidagulova — histological processing of the material, writing the text of the article, editing

the article; S.V. Zalavina — writing the text, editing the article, general management of research.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the Center for Shared Use of Microscopic Analysis of Biological Objects of the SB RAS (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) for the equipment provided.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ramos I., Machado E., Masuda H., et al. Open questions on the functional biology of the yolk granules during embryo development // *Mol Reprod Dev.* 2022. Vol. 89, N 2. P. 86–94. doi: 10.1002/mrd.23555
- Fleig R. Embryogenesis in mouth-breeding cichlids (Osteichthyes, Teleostei) structure and fate of the enveloping layer // *Roux Arch Dev Biol.* 1993. Vol. 203, N 3. P. 124–130. doi: 10.1007/BF00365051
- Concha M.L., Reig G. Origin, form and function of extraembryonic structures in teleost fishes // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2022. Vol. 5, N 377 (1865). P. 20210264. doi: 10.1098/rstb.2021.0264
- Городилов Ю.Н., Мельникова Е.Л. Эмбриональное развитие европейской корюшки *Osmerus eperlanus eperlanus* (L.) (Невская популяция) // *Биология моря.* 2006. Т. 32, № 3. С. 204–216. EDN: HZJKFN
- Кауфман З.С. Эмбриология рыб. Москва: Агропромиздат, 1990.
- Walzer D.C., Schönenberger N. Ultrastructure and cytochemistry of the yolk syncytial layer in the alevin of trout (*Salmo fario trutta* L. and *Salmo gairdneri* R.) after after hatching. II. The cytoplasmic zone // *Cell Tissue Res.* 1979. Vol. 196, N 1. P. 75–93. doi: 10.1007/BF00236349
- Ninhaus-Silveira A., Foresti F., de Azevedo A., et al. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae) // *Zygote.* 2007. Vol. 15, N 3. P. 267–271. doi: 10.1017/S0967199407004261
- Kondakova E.A., Efremov V.I., Nazarov V.A. Structure of the yolk syncytial layer in Teleostei and analogous structures in animals of the meroblastic type of development // *Biology Bulletin.* 2016. Vol. 43, N 3. P. 208–215. EDN: WVBNMF doi: 10.1134/S1062359016030055
- Kondakova E.A., Efremov V.I., Bogdanova V.A. Structure of the yolk syncytial layer in the larvae of whitefishes: A histological study // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2017. Vol. 48, N 3. P. 176–184. EDN: XMWZJH doi: 10.1134/S1062360417030055
- Kondakova E.A., Efremov V.I., Kozin V.V. Common and specific features of organization of the yolk syncytial layer of Teleostei as exemplified in *Gasterosteus aculeatus* L. // *Biology Bulletin.* 2019. Vol. 46, N 1. P. 26–32. EDN: IYQFJO doi: 10.1134/S1062359019010023
- Herbomel P., Thisse B., Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo // *Development.* 1999. Vol. 126, N 17. P. 3735–3745. doi: 10.1242/dev.126.17.3735
- Sakaguchi T., Kikuchi Y., Kuroiwa A., et al. The yolk syncytial layer regulates myocardial migration by influencing extracellular matrix assembly in zebrafish // *Development.* 2006. Vol. 133, N 20. P. 4063–4072. doi: 10.1242/dev.02581
- Carter A.M. IFPA Senior Award Lecture: Mammalian fetal membranes // *Placenta.* 2016. Vol. 48, Suppl. 1. P. S21–S30. doi: 10.1016/j.placenta.2015.10.012
- Thowfeequ S., Srinivas S. Embryonic and extraembryonic tissues during mammalian development: shifting boundaries in time and space // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2022. Vol. 377, N 1865. P. 20210255. doi: 10.1098/rstb.2021.0255
- Дубинина Н.Н., Склянов Ю.И., Попп Е.А., и др. Гистогенетические параллели в дифференциации желточной энтодермы у некоторых позвоночных // *Морфология.* 2019. Т. 156, № 6. С. 93. EDN: YRNTXT doi: 10.17816/morph.102018
- Peterson N.G., Fox D.T. Communal living: the role of polyploidy and syncytia in tissue biology // *Chromosome Res.* 2021. Vol. 29, N 3–4. P. 245–260. doi: 10.1007/s10577-021-09664-3
- Chu L.T., Fong S.H., Kondrychyn I., et al. Yolk syncytial layer formation is a failure of cytokinesis mediated by Rock1 function in the early zebrafish embryo // *Biol Open.* 2012. Vol. 1, N 8. P. 747–753. doi: 10.1242/bio.20121636
- Carvalho L., Stühmer J., Bois J.S., et al. Control of convergent yolk syncytial layer nuclear movement in zebrafish // *Development.* 2009. Vol. 136, N 8. P. 1305–1315. doi: 10.1242/dev.026922
- Schwartz L.M. Skeletal muscles do not undergo apoptosis during either atrophy or programmed cell death—revisiting the myonuclear domain hypothesis // *Front Physiol.* 2019. Vol. 9. P. 1887. doi: 10.3389/fphys.2018.01887
- Кондакова Е.А., Шкиль Ф.Н., Ефремов В.И. Структура желточного синцитиального слоя в постэмбриональном развитии бирюзовой акары, *Andinoacara rivulatus* (Günther), 1860 (Cichlidae) // *Труды Зоологического института РАН.* 2019. Т. 323, № 4. С. 523–532. EDN: NFAGNN doi: 10.31610/trudyzin/2019.323.4.523
- Jackson H.E., Ingham P.W. Control of muscle fibre-type diversity during embryonic development: The zebrafish paradigm // *Mech Dev.* 2013. Vol. 130, N 9–10. P. 447–457. doi: 10.1016/j.mod.2013.06.001
- Piesiewicz R, Krzystolik J, Korzelecka-Orkisz A, et al. Early ontogeny of cichlids using selected species as examples // *Animals (Basel).* 2024. Vol. 14, N 8. P. 1238. doi: 10.3390/ani14081238
- Микулин А.Е. Функциональное значение пигментов и пигментации в онтогенезе рыб. Москва: ВНИРО, 2000.

REFERENCES

- Ramos I, Machado E, Masuda H, et al. Open questions on the functional biology of the yolk granules during embryo development. *Mol Reprod Dev.* 2022;89(2):86–94. doi: 10.1002/mrd.23555
- Fleig R. Embryogenesis in mouth-breeding cichlids (Osteichthyes, Teleostei) structure and fate of the enveloping layer. *Roux Arch Dev Biol.* 1993;203(3):124–130. doi: 10.1007/BF00365051

3. Concha ML, Reig G. Origin, form and function of extraembryonic structures in teleost fishes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2022;377(1865):20210264. doi: 10.1098/rstb.2021.0264
4. Gorodilov YN, Melnikova EL. Embryonic development of the European smelt *Osmerus eperlanus eperlanus* (L.) (Neva population). *Russian Journal of Marine Biology.* 2006;32(3):173–185. EDN: HZJKFN
5. Kaufman ZS. *Embryologiya ryb.* Moscow: Agropromizdat; 1990. (In Russ.)
6. Walzer DC, Schönenberger N. Ultrastructure and cytochemistry of the yolk syncytial layer in the alevin of trout (*Salmo fario trutta* L. and *Salmo gairdneri* R.) after hatching. *Cell and Tissue Research.* 1979;196(1):75–93. doi: 10.1007/BF00236349
7. Ninhaus-Silveira A, Foresti F, de Azevedo A, et al. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). *Zygote.* 2007;15(3):267–271. doi: 10.1017/S0967199407004261
8. Kondakova EA, Efremov VI, Nazarov VA. Structure of the yolk syncytial layer in Teleostei and analogous structures in animals of the meroblastic type of development. *Biology Bulletin.* 2016;43(3):208–215. EDN: WVBNMF doi: 10.1134/S1062359016030055
9. Kondakova EA, Efremov VI, Bogdanova VA. Structure of the yolk syncytial layer in the larvae of whitefishes: A histological study. *Russian Journal of Developmental Biology.* 2017;48(3):176–184. EDN: XMWZJH doi: 10.1134/S1062360417030055
10. Kondakova EA, Efremov VI, Kozin VV. Common and specific features of organization of the yolk syncytial layer of Teleostei as exemplified in *Gasterosteus aculeatus* L. *Biology Bulletin.* 2019;46(1):26–32. EDN: IYQFJO doi: 10.1134/S1062359019010023
11. Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development.* 1999;126(17):3735–3745. doi: 10.1242/dev.126.17.3735
12. Sakaguchi T, Kikuchi Y, Kuroiwa A, et al. The yolk syncytial layer regulates myocardial migration by influencing extracellular matrix assembly in zebrafish. *Development.* 2006;133(20):4063–4072. doi: 10.1242/dev.02581
13. Carter AM. IFPA senior award lecture: mammalian fetal membranes. *Placenta.* 2016;48 Suppl. 1:S21–S30. doi: 10.1016/j.placenta.2015.10.012
14. Thowfeequ S, Srinivas S. Embryonic and extraembryonic tissues during mammalian development: shifting boundaries in time and space. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2022;377(1865):20210255. doi: 10.1098/rstb.2021.0255
15. Dubinina NN, Sklyanov YI, Popp EA, et al. Histogenetic parallels in the differentiation of yolk sac endoderm in some vertebrates. *Morphology.* 2019;156(6):93. EDN: YRNTXT doi: 10.17816/morph.102018
16. Peterson NG, Fox DT. Communal living: the role of polyploidy and syncytia in tissue biology. *Chromosome Res.* 2021;29(3–4):245–260. doi: 10.1007/s10577-021-09664-3
17. Chu LT, Fong SH, Kondrychyn I, et al. Yolk syncytial layer formation is a failure of cytokinesis mediated by Rock1 function in the early zebrafish embryo. *Biol Open.* 2012;1(8):747–753. doi: 10.1242/bio.20121636
18. Carvalho L, Stühmer J, Bois JS, et al. Control of convergent yolk syncytial layer nuclear movement in zebrafish. *Development.* 2009;136(8):1305–1315. doi: 10.1242/dev.026922
19. Schwartz LM. Skeletal muscles do not undergo apoptosis during either atrophy or programmed cell death—revisiting the myonuclear domain hypothesis. *Front Physiol.* 2019;9:1887. doi: 10.3389/fphys.2018.01887
20. Kondakova EA, Shkil FN, Efremov VI. Structure of the yolk syncytial layer during postembryonic development of *Andinoacara rivulatus* (Günther, 1860) (Cichlidae). *Proceedings of the Zoological Institute RAS.* 2019;323(4):523–532. EDN: NFAGNN doi: 10.31610/trudyzin/2019.323.4.523
21. Jackson HE, Ingham PW. Control of muscle fibre-type diversity during embryonic development: The zebrafish paradigm. *Mech Dev.* 2013;130(9–10):447–457. doi: 10.1016/j.mod.2013.06.001
22. Piesiewicz R, Krzystolik J, Korzelecka-Orkisz A, et al. Early ontogeny of cichlids using selected species as examples. *Animals (Basel).* 2024;14(8):1238. doi: 10.3390/ani14081238
23. Mikulin AE. *Functional significance of pigments and pigmentation in fish.* Moscow: VNIRO; 2000. (In Russ.)

ОБ АВТОРАХ

* **Дубинина Наталья Николаевна**, канд. биол. наук, доцент;
адрес: Россия, 630091, Новосибирск, Красный пр-т, д. 52;
ORCID: 0009-0000-6725-9445;
eLibrary SPIN: 6724-9437;
e-mail: anna.dubinina05@gmail.com

Айдагулова Светлана Владимировна, д-р биол. наук, профессор;
ORCID: 0000-0001-7124-1969;
eLibrary SPIN: 5661-9765;
e-mail: asvetvlad@yandex.ru

Залавина Светлана Васильевна, д-р мед. наук, доцент;
ORCID: 0000-0003-3405-5993;
eLibrary SPIN: 8950-8517;
e-mail: zalavinasv@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

* **Natalya N. Dubinina**, Cand. Sci. (Biology), Assistant Professor;
address: 52 Krasny Prospect, 630091 Novosibirsk, Russia;
ORCID: 0009-0000-6725-9445;
eLibrary SPIN: 6724-9437;
e-mail: anna.dubinina05@gmail.com

Svetlana V. Aidagulova, Dr. Sci. (Biology), Professor;
ORCID: 0000-0001-7124-1969;
eLibrary SPIN: 5661-9765;
e-mail: asvetvlad@yandex.ru

Svetlana V. Zalavina, MD, Dr. Sci. (Medicine), Assistant Professor;
ORCID: 0000-0003-3405-5993;
eLibrary SPIN: 8950-8517;
e-mail: zalavinasv@mail.ru