

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	<i>ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН (16-17 ДЕКАБРЯ 2010 Г.)</i>	323-336	0
ОБЗОРЫ			
<input type="checkbox"/>	<i>ПРИОНЫ ДРОЖЖЕЙ КАК МОДЕЛЬ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ АМИЛОИДОЗОВ ЧЕЛОВЕКА</i> Инге-Вечтомов С.Г.	337-345	0
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ			
<input type="checkbox"/>	<i>СТАТИСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЫСТРЫХ МЕХАНОЗАВИСИМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ДВИЖЕНИЙ В ДЕФОРМИРОВАННЫХ ЭКСПЛАНТАТАХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ</i> Трошина Т.Г., Глаголева Н.С., Белоусов Л.В.	346-356	2
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ			
<input type="checkbox"/>	<i>СТИМУЛЯЦИЯ ДЕЛЕНИЙ КЛЕТОК ПОКОЯЩЕГОСЯ ЦЕНТРА В ОТРЕЗАННЫХ КОНЧИКАХ КОРНЕЙ</i> Иванов В.Б., Быстрова Е.И., Месенко М.М., Котова Л.М., Котов А.А.	357-362	4
СРАВНИТЕЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ			
<input type="checkbox"/>	<i>СВОЙСТВА НОРМЫ И ИЗМЕНЧИВОСТИ</i> Коваленко Е.Е.	363-377	0
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ			
<input type="checkbox"/>	<i>КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ R. ARVALIS. ЧАСТЬ 1: ЛИНЕЙНЫЕ РАЗМЕРЫ ЗАРОДЫША</i> Северцова Е.А., Северцов А.С.	378-389	0
КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ			
<input type="checkbox"/>	<i>ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ИНДУКЦИЮ СПИКУЛОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРАХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК МОРСКИХ ЕЖЕЙ</i> Кипрюшина Ю.О., Одинцова Н.А.	390-396	1
РЕЦЕНЗИИ			
<input type="checkbox"/>	<i>SCOTT F. GILBERT □ DEVELOPMENTAL BIOLOGY. NINTH EDITION. SINAUER ASS. SUNDERLAND, MASS. 2010</i> Белоусов Л.В.	397	0
<input type="checkbox"/>	<i>"СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ. БИОЛОГИЯ, ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ, РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ", ПОД РЕД. БРЮСА М. КАРЛСОНА (BRUCE M. CARLSON, ED. "STEM CELL ANTHOLOGY. STEM CELL BIOLOGY, TISSUE ENGINEERING, CLONING, REGENERATIVE MEDICINE, AND BIOLOGY." ACAD. PRESS, 2010)</i> Бродский В.Я.	398-400	0

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(16–17 ДЕКАБРЯ 2010 г.)**

**ИММУННЫЕ ПРОТЕАСОМЫ В ЦНС У МЫШЕЙ,
НОКАУТНЫХ ПО β_2 -МИКРОГЛОБУЛИНУ**

© 2011 г. М. Е. Богатырев

Лаборатория биохимии

В клетках млекопитающих иммунные протеасомы, внутриклеточные мультисубъединичные протеазные комплексы, образуют из белков антигенные эпитопы для представления их вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (ГКГ I) Т-лимфоцитам. Присутствие ГКГ I было установлено в клетках ЦНС, в том числе и в нейронах. В нейронах ГКГ I локализован постсинаптически и регулирует функцию синаптической структуры в ответ на изменение нейрональной активности. Изучение особенностей экспрессии иммунных протеасом в развитии ЦНС и при нарушенной экспрессии ГКГ I важно для понимания механизмов пластичности в ЦНС. Исследованы химо трипсин-подобная активность (ХПА), общий уровень протеасом и содержание субъединиц LMP2($\beta 1i$) и LMP7($\beta 5i$) иммунных протеасом в различных отделах ЦНС мышей, нокаутных по β_2 -микроглобулину ГКГ I ($\beta 2m$): фронтальной коре (коре), стриатуме, медиобазальном гипоталамусе, мозжечке и стволе мозга. При анализе содержания иммунных протеасом в ЦНС мышей оказалось, что количество иммунных субъединиц LMP7($\beta 5i$) в коре увеличивается, а в стриатуме уменьшается у нокаутных $\beta 2m$ животных. В стриатуме нокаутных $\beta 2m$ мышей снижен уровень конститутивных субъединиц $\beta 1$ и $\beta 5$

протеасом. Обнаружено снижение содержания регуляторной субъединицы PA28 α и тотального пула протеасом в стриатуме, стволе мозга и увеличение регуляторной субъединицы PA28 α в коре нокаутных $\beta 2m$ мышей. ХПА снижена в стриатуме и стволе нокаутных $\beta 2m$ мышей. В коре, мозжечке и стволе мозга нокаутных $\beta 2m$ мышей снижена экспрессия NeuN (нейронального ядерного белка). В каудальных отделах мозга снижена, а в коре отмечено достоверное увеличение экспрессии gFAP (глиального фибриллярного кислого белка). Таким образом, изменения в пуле протеасом и снижение экспрессии NeuN и gFAP отражают особенности ЦНС у нокаутных $\beta 2m$ мышей. Были выявлены возможные регуляторные пути изменения содержания иммунных протеасом. Показано, что количество белка теплового шока 70 – активатора экспрессии иммунных протеасом, и количество *n*NO-синтазы, запускающей этот сигнальный путь, увеличивается в коре и снижается в стволе мозга нокаутных животных. Изменение содержания иммунных протеасом в исследованных структурах ЦНС у нокаутных $\beta 2m$ мышей связано с процессами нейрогенеза и дифференцировки в этих структурах.

Работа поддержана РФФИ (грант № 09-04-00077а).

**МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФОРМЫ ПРОТЕАСОМ И ПЕРСПЕКТИВЫ
ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ**

© 2011 г. Ю. В. Богомяккова

Лаборатория биохимии

Протеасомы, мультисубъединичные протеазные комплексы, регулируют клеточные процессы путем устранения белков или образования пептидов, в этих процессах участвующих, в нужный для клетки момент времени. У млекопитающих протеасомы представлены наибольшим разнообра-

зием форм по сравнению с другими эукариотами. Только у млекопитающих обнаружены иммунные протеасомы, которые получили свое название из-за участия в Т-клеточных иммунных реакциях – первой открытой для них функции. Иммунные протеасомы отличаются от конститутивных набо-

ром протеолитически активных субъединиц. В процессе гидролиза чужеродных белков иммунными протеасомами образуется в несколько раз больше антигенных эпитопов, способных встраиваться в щель Бьоркмана молекул главного комплекса гистосовместимости класса I для последующего их представления Т-лимфоцитам. Кроме того, иммунные протеасомы участвуют в регуляции дифференцировки и пролиферации некоторых клеточных популяций и представляют собой необходимое звено сигнального пути, гасящего окислительный стресс в эндотелиальных клетках. Как иммунные, так и конститутивные протеасомы входят в состав пулов 26S- и 20S-протеасом. Признаком 26S-протеасом является наличие в их составе одной или двух 19S-субчастиц-активаторов, осуществляющих связывание с убиквитинированными белками-мишенями, их расплетание и проталкивание в протеолитическую камеру АТФ-зависимым образом. 20S-протеасомы гидролизуют белки, поврежденные окислительным

стрессом, и некоторые вирусные белки независимо от убиквитина и АТФ.

Все клеточные популяции характеризуются строго определенным соотношением множественных форм протеасом. Так, например, клетки лимфоидных органов обогащены иммунными протеасомами, в то время как клетки головного мозга — конститутивными протеасомами. Очевидно, что изменение соотношения множественных форм протеасом может привести к патологическим состояниям. Поэтому изучение пула протеасом при различных заболеваниях важно как для понимания причин возникновения этих заболеваний, так и для поиска новых лекарств. Недавно в лаборатории получены первые данные об изменениях в пуле протеасом в развитии папиллярной карциномы щитовидной железы человека. Перспективы связаны с выявлением мишени среди множественных форм протеасом этой опухоли для разработки новой противоопухолевой терапии.

Работа поддержана РФФИ (грант № 09-04-00077а) и ФЦП (госконтракт № 02.512.12.2047).

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ РЯДА РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ И МАРКЕРОВ НЕЙРАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В КЛЕТКАХ СЕТЧАТКИ И ПЕРЕДНЕГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В РАЗВИТИИ И КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

© 2011 г. Б. И. Вердиев

Лаборатория экспериментальной нейробиологии

Источником всех типов нейральных клеток центральной нервной системы позвоночных животных являются нейральные стволовые клетки (НСК). НСК и прогениторные клетки можно выделять из эмбрионального и взрослого мозга и сетчатки, размножать в культуре ткани, и они способны спонтанно дифференцироваться во все три типа нейральных клеток.

Важную роль в регуляции пластичности НСК в ходе эмбрионального развития играют гены, кодирующие специфические транскрипционные факторы. Мы сконцентрировались на генах *PAX6*, *PROX1*, *OCT4* и *NANOG*. Считается, что *PAX6* в неокортексе и сетчатке является маркером НСК. К таким маркерам может быть отнесен и *PROX1*, который экспрессируется в субпопуляции прогениторов сетчатки и мозга. Поскольку имеются данные об экспрессии генов плюрипотентного статуса *OCT4* и *NANOG* в стволовых клетках ряда опухолей мозга и сетчатки, было важно определить их участие в поддержании пластичности НСК в ходе развития.

Впервые показано, что экспрессия *PAX6* в исследованный период нейрогенеза (на 8–12 и 18–20 нед. развития) находится на постоянном уровне как в неокортексе, так и сетчатке глаза. Уровень экспрессии *PAX6* в сетчатке значительно выше, чем в неокортексе. В клеточных культурах неокортекса мозга и сетчатки глаза при стандартных условиях культивирования уровень экспрессии *PAX6* такой же, как в нативных тканях.

Впервые обнаружена экспрессия *PROX1* в неокортексе мозга плода человека. В клеточной культуре сетчатки глаза экспрессия этого гена сохраняется, а в культуре неокортекса мозга отсутствует.

Впервые проведено сравнение характера экспрессии *OCT4* и *NANOG* в неокортексе мозга и в сетчатке глаза в ходе нейрогенеза на 8–12 и 18–20 нед. развития. В культуре клетки сетчатки сохраняют сходство с нативной тканью по экспрессии *OCT4* и *NANOG*, в то время как клетки неокортекса его теряют.

РОЛЬ КЛЕТОК НЕРВНОГО ГРЕБНЯ В ФОРМИРОВАНИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА

© 2011 г. К. Ю. Гнедева

Лаборатория проблем пролиферации

Первичная ресничка – органелла, присутствующая на поверхности большинства клеток тела. Нокаут реснички приводит к драматическим дефектам развития, включая ингибирование морфогенеза волосяных фолликулов на ранних стадиях.

IFT20 – транспортный белок, необходимый для сборки первичной реснички. Мы получили трансгенных мышей генотипа IFT20^{flox}:Wnt1-Cre для изучения роли первичной реснички в судьбе клеток нервного гребня (НГ). Известно, что по крайней мере часть клеток дермальной папиллы (ДП) волосяных фолликулов головы и вибрисс происходят из мигрирующих клеток НГ. Мы показали, что отсутствие реснички в клетках ДП не останавливает морфогенез вибрисс на ранних стадиях. Более того, мы наблюдали увеличение числа вибрисс, а также нарушения в паттерне их распределения и морфологии. Мы показали, что ассоциированный с первичной ресничкой Shh митогенный сигнальный путь активирован у животных с нокаутом по гену IFT20. Мы предпола-

гаем, что увеличение числа вибрисс может быть вызвано усилением пролиферации в клетках дермы. Мы предположили, что аномальный паттерн расположения вибрисс может быть связан с дефектами адгезии в клетках НГ, не имеющих первичной реснички. Мы обнаружили, что Shh повышает экспрессию Noggin, который играет роль в конденсации ДП и индукции анагена.

Мы также разработали модель для изучения роли клеток НГ в морфогенезе волосяного фолликула не только у мыши, но и у человека. Используя протокол, разработанный в нашей лаборатории, мы дифференцировали эмбриональные стволовые клетки человека в клетки НГ, а затем в ДП-подобные клетки *in vitro*. Мы показали, что последние экспрессируют маркеры, характерные для клеток ДП взрослого человека. Более того, мы показали, что меченые GFP ДП-подобные клетки, полученные из ЭСК, индуцируют *de novo* рост волосяных фолликулов, будучи пересаженными под кожу иммунодефицитным мышам NUDE.

ГЕНЫ РАННЕГО РАЗВИТИЯ В ХИМИЧЕСКОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ПЕЧЕНИ

© 2011 г. Л. С. Зиневич

Лаборатория молекулярно-генетических механизмов онтогенеза

Показано, что уровень экспрессии транскрипционных факторов Klf6 и Ets2, которые являются одними из регуляторов активности гена *p21*, повышен в тканях гепатоцеллюлярной карциномы мыши. Целью настоящей работы было исследование роли Klf6 и Ets2 в регуляции экспрессии *p21* на самых ранних этапах повреждения печени мыши канцерогеном диэтилнитрозамином (DEN), а также при развитии гепатоцеллюлярной карциномы.

Через 4 ч после внутрибрюшинной инъекции взрослой мыши (3–4 мес.) DENA в дозе 100 мг/кг уровень экспрессии Klf6 повышался в 5 раз по сравнению с контролем (нормальной печенью и печенью мыши после инъекции физиологического раствора), уровень экспрессии *p21* тоже возрастал, но в значительно большей степени – в 90 раз. В то время как уровень экспрессии Ets2 не отличался от контроля. Динамика изменения экспрессии Klf6 и *p21* после

введения DENA также была сходной – она значительно снижалась к 18-ти часам после воздействия, достигая контрольного уровня (18 ч после инъекции физиологического раствора), а уровень экспрессии Ets2 не изменялся. Таким образом, можно сделать заключение, что Klf6 может являться одним из основных регуляторов экспрессии *p21* в печени мыши при воздействии химического канцерогена DENA.

Полученные ранее с помощью микроаррей-анализа результаты об экспрессии транскрипционных факторов Klf6 и Ets2 были подтверждены методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Показано повышение уровня экспрессии Klf6 и Ets2 в опухольчатой ткани печени мыши по сравнению с нормальной тканью печени, а также по сравнению с тканью, окружающей опухоль.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-01559.

БАЛАНС СЕРОТОНИНА ВНУТРИ И СНАРУЖИ КЛЕТКИ: НОВЫЙ РЕГУЛЯТОРНЫЙ МЕХАНИЗМ В РАННЕМ РАЗВИТИИ МОЛЛЮСКОВ?

© 2011 г. Е. Г. Ивашкин, М. Ю. Хабарова, Е. Е. Воронежская

Лаборатория сравнительной физиологии

Несмотря на обилие фактов о важной роли серотонина (5-НТ) в регуляции раннего развития животных, механизмы его действия до сих пор остаются спорными. Наиболее полно изучена ранняя серотониновая система позвоночных животных. Однако отсутствие эффективных моделей делает крайне затруднительной систематизацию существующих данных. Большинство исследований на беспозвоночных животных сводятся к феноменологическим описаниям. Целью нашей работы было комплексное исследование механизмов действия 5-НТ на модели раннего развития моллюсков.

Ранее мы показали, что инкубация в предшественнике 5-НТ (5-гидрокситриптофан) зародышей большого прудовика *Lymnaea stagnalis* на начальных стадиях дробления приводит к экзогастрюляции (ЭГ) на 3-й день развития. Мы использовали этот эффект как модельную систему для изучения функциональных взаимосвязей между различными компонентами ранней серотониновой системы. Фармакологический анализ показал, что к ЭГ приводит только одновременное повышение уровня 5-НТ снаружи и внутри клетки. Раздельное повышение вне- или внутриклеточного уровня 5-НТ не вызывает такого эф-

фекта. Ингибиторы серотонинового транспортера (SERT) снижают процент ЭГ в предшественнике 5-НТ, уменьшают выделение зародышами 5-НТ в среду и повышают внутриклеточную концентрацию 5-НТ. Процесс ЭГ задействует 5-НТ-рецептор смешанного типа, который экспрессирован начиная с самых ранних стадий развития. По фармакологическому профилю этот рецептор близок к 5-НТ₂-рецепторам позвоночных, но действует через активацию аденилатциклазы. Дальнейший анализ показал, что возможным механизмом, приводящим к ЭГ, является серотонилирование — ковалентная модификация белков 5-НТ с помощью трансглутаминаз.

Таким образом, нами было показано, что баланс 5-НТ внутри и снаружи клетки является новым, не описанным ранее механизмом регуляции раннего развития. Продемонстрирована принципиальная возможность SERT-зависимого выброса 5-НТ без фармакологического воздействия. Впервые показано серотонилирование у беспозвоночных животных и в раннем развитии.

Работа поддержана грантами РФФИ № 09-04-01326 и 10-04-10134.

ПРОТЕАСОМНЫЕ МЕХАНИЗМЫ В РАЗВИТИИ ПЕЧЕНИ И ПОРТАЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ

© 2011 г. Я. Д. Карпова

Лаборатория биохимии

Печень является уникальным органом в иммунологическом аспекте. С одной стороны, при инфицировании вирусами в печени развивается защитная иммунная реакция, с другой стороны, в ответ на индукцию антигеном, поступающим через портальную вену печени, как правило, развивается иммунологическая толерантность. Механизмы поддержания равновесия между этими процессами могут быть связаны с особенностями функционирования иммунных протеасом, играющих важную роль в Т-клеточном иммунном ответе. Цель данной работы — выявить особенности экспрессии иммунных протеасом в раннем онтогенезе печени в процессе становления иммунной системы и в развитии донор-специфической толерантности (ДСТ) у взрослых крыс при трансплантации неонатальных тканей яичника под капсулу почки. Кроме того, исследовано измене-

ние активностей и уровня тотального пула протеасом в этих процессах. Обнаружено, что экспрессия иммунных протеасом, содержащих субъединицы LMP2 и LMP7, увеличивается в печени в раннем онтогенезе вплоть до середины третьей постнатальной недели — времени формирования вторичных лимфоидных органов. Эти изменения сопровождаются возрастанием каспазаподобной (КП) и химотрипсинподобной (ХТП) активностей на фоне постоянного уровня тотального пула протеасом. КП-активность, но не ХТП-активность, возрастает также в печени крыс с индукцией ДСТ в сравнении с контрольными группами животных. Кроме того, для печени крыс с индукцией ДСТ характерно увеличение количества клеток, обогащенных LMP2, и уменьшение количества клеток, обогащенных LMP7. Различия в экспрессии иммунных протеасом выявлены так-

же для клеток трансплантатов яичника у разных групп животных. Иммунные протеасомы, содержащие LMP7, преобладают в отторгающихся трансплантатах, в прижившихся трансплантатах их количество снижено. По-видимому, увеличение их содержания связано с активным участием этого типа иммунных протеасом в представлении антигена и развитии полноценной иммунной реакции на чужеродную ткань. Иммунные протеасомы, содержащие LMP2, напротив, преоблада-

ют в приживающихся трансплантатах. Можно полагать, что этот тип иммунных протеасом важен для успешного приживления ткани. Таким образом, соотношение между различными типами иммунных протеасом является одним из ключевых факторов, которые определяют развитие иммунных реакций или иммунологической толерантности.

Работа поддержана РФФИ (грант № 09-04-00077а).

СТАНОВЛЕНИЕ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ СЕЛЕКЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ ТИМУСЕ

© 2011 г. Е. В. Маслова

Лаборатория гистогенеза

В тимусе в ходе дифференцировки Т-лимфоциты подвергаются процессам положительной и отрицательной селекции. Лимфоциты, не прошедшие селекцию, элиминируются из тимуса апоптозом, обеспечивая тем самым нормальное функционирование иммунной системы. При отрицательной селекции удаляются Т-лимфоциты, распознающие аутоантигены, генерация которых осуществляется в антигенпредставляющих клетках тимуса иммунными протеасомами. Ранее с помощью Вестерн-блоттинга было показано, что иммунные протеасомы экспрессируются в тимусе уже в раннем онтогенезе. Целью настоящей работы явилось выявление типов клеток, экспрессирующих иммунные протеасомы, и выявление зон локализации процесса отрицательной селекции в тимусе в перинатальном периоде развития крыс. Распределение иммунных протеасом в клетках тимуса анализировали с помощью иммуногистохимии и проточной цитометрии у крыс Wistar с 21-го эмбрионального дня по 30-й постнатальный день. В качестве маркеров дендритных клеток использовали антитела к ОХ-62, эпителиальных клеток — антитела к кератинам 18 и 19, макрофагов и нейтрофилов — антитела к CD68. С

помощью двойного иммунофлуоресцентного мечения было показано, что большинство дендритных и эпителиальных клеток в кортикальной и медуллярной зонах тимуса экспрессируют иммунные протеасомы на протяжении всего изученного периода развития. Дендритные клетки, представляющие собой гетерогенную популяцию, отличаются по уровню экспрессии иммунных протеасом, что может быть связано с их различной функцией в тимусе. Иммунные протеасомы были обнаружены также в макрофагах, функция которых в селекции сводится, в основном, к фагоцитированию тимоцитов, ушедших в апоптоз. Различий в распределении субъединиц LMP7 и LMP2 не выявлено на всех анализируемых этапах онтогенеза. Таким образом, становление процесса отрицательной селекции в тимусе крыс, зависимое от активности иммунных протеасом, может происходить уже в пренатальном онтогенезе. Экспрессия иммунных протеасом в антигенпредставляющих эпителиальных и дендритных клетках кортикальной и медуллярной зон свидетельствует о возможности отрицательной селекции не только в медуллярной зоне, как это считалось ранее, но и в обеих зонах тимуса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К РЕПРОГРАММИРОВАНИЮ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ *in vitro*

© 2011 г. И. А. Мучкаева, Э. Б. Дашинимаяев, А. В. Васильев

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки представляют собой уникальный материал ввиду способности к генерации всех клеточных типов трех зародышевых листков. Эти свойства делают их перспективным объектом для фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований. Получение эффективных и безопасных для клинического применения методов репрограммирования соматических клеток явля-

ется одной из самых актуальных проблем современных клеточных технологий.

Целью нашего исследования является оптимизация существующих методик репрограммирования дифференцированных клеток в культуре, а в перспективе также разработка новых подходов.

На первом этапе работы нами был проведен ряд экспериментов с целью исследования усло-

вий репрограммирования, которые включали в себя введение ключевых транскрипционных факторов плюрипотентности, а также использование малых молекул, увеличивающих эффективность репрограммирования. В работе использованы иммортализованные клеточные линии: 3T3NIH (эмбриональные фибробласты мыши), 1608-hT (фибробласты кожи человека), HaCaT (кератиноциты кожи человека).

Было показано, что под действием деметилирующих агентов в культуре кератиноцитов повышается экспрессия нейральных маркеров – нестина и бета-3-тубулина, в то время как экспрессия маркеров базальных кератиноцитов сохраняется. Также было показано, что обработка вальпроевой кислотой и 5-азациитидином спо-

собствует возрастанию пролиферативной активности клеток.

При помощи лентивирусных конструкций pLVT-Oct4 и pLVT-Sox2, нами были получены клеточные культуры 3T3NIH-OS, 1608-hT-OS, HaCaT-OS отличающихся по морфологии и экспрессии маркеров плюрипотентности от исходных клеток. В данных культурах мы наблюдали появление колоний с фенотипом эмбриональных стволовых клеток.

Полученные результаты позволяют предположить, что на основе предложенного нами подхода к репрограммированию соматических клеток возможно дальнейшее усовершенствование используемых экспериментальных методик.

ПРОБЛЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ

© 2011 г. Е. П. Мягкова

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Дермальная папилла (ДП) – мезенхимный компонент волосяного фолликула, управляющий его формированием и циклом регенерации. Индуцирующие свойства клеток ДП снижаются при пассировании. Продление времени культивирования возможно разными способами, в частности путем использования различных сред для культивирования, добавления факторов роста в среду и изменения условий культивирования. Используемыми базовыми средами были DMEM с добавлением 10% FBS и Amniotax C-100. В качестве условий культивирования были выбраны стандартная общеиспользуемая монослойная культура и культура 3D в висячей капле.

Было показано, что обе базовых среды рационально использовать до 3 пассажа культивирования. С четвертого пассажа индуцирующие способности клеток значительно снижаются. Если культивировать клетки в висячей капле, происходит частичное восстановление индуцирующих способностей клеток ДП, выражающееся в восстановлении интенсивности окраски на щелочную фосфатазу. Однако при высаживании полу-

ченных сфероидов обратно на пластик эта особенность снова теряется.

В монослойной культуре добавление белков BMP6 и FGF, а также витамина D3 позволяло увеличить число пассажей при сохранении индуцирующих свойств культуры. Однако при добавлении данных факторов в суспензию клеток в висячей капле сфероиды формировались в течение большего времени, чем в контроле. Похожие результаты были получены для среды, кондиционированной кератиноцитами. Данная среда позволяла поддерживать индуцирующие свойства 2D культуры на более высоком уровне до 5 пассажа, однако при использовании ее в 3D культивировании формирование полноценных сфероидов не происходило.

Сферические 3D культуры плохо изучены для клеток ДП, хотя эта культура по своим характеристикам ближе к *in vivo*, чем монослойная. Различия в восприимчивости и ответе клеток на различные факторы в условиях 2D и 3D нуждаются в объяснении, поскольку это поможет раскрыть некоторые аспекты метаболизма клеток ДП и решить проблемы, связанные с их культивированием.

ЭКСПРЕССИЯ КОМПОНЕНТОВ СЕРОТОНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ *Xenopus laevis*

© 2011 г. Д. А. Никишин

Лаборатория проблем регенерации, группа эмбриофизиологии

Серотонергическая система взрослых организмов включает в себя ферменты синтеза, семь типов рецепторов, системы везикулярного транспорта, обратного захвата и деградации серотонина. Само это вещество является классическим

нейротрансмиттером, нейромодулятором и локальным гормоном, но также участвует в регуляции многообразных процессов эмбрионального развития (оогенез, деления дробления, установление лево-правой асимметрии тела, различные

морфогенетические процессы), что продемонстрировано на различных объектах, в том числе морских беспозвоночных, амфибиях и млекопитающих. Однако на данный момент молекулярно-генетические исследования элементов серотонергической системы на ранних стадиях онтогенеза чрезвычайно малочисленны и неполны. Данная работа является первой частью систематического исследования трансмиттерных систем в эмбриогенезе шпорцевой лягушки.

Методом ОТ-ПЦР была исследована экспрессия известных рецепторов и транспортеров серотонина в эмбриогенезе *Xenopus laevis*. Экспрессия рецепторов серотонина HTR1A, HTR2B и HTR3A выявляется только после стадии нейрулы. HTR2C и HTR7 экспрессируются на всех стадиях эмбриогенеза, включая его ранние стадии. На всех стадиях эмбриогенеза слабо экспрессируется предполагаемый транспортер серотонина SERT. Везикулярный транспортер моноаминов VMAT1 выявляется после нейруляции, а VMAT2 экспрес-

сируется на всех стадиях развития, причем уровень экспрессии на догастрюляционных стадиях гораздо выше, чем на постгастрюляционных. Таким образом, получены свидетельства того, что на донервных стадиях развития экспрессируются рецепторы серотонина, сопряженные как с диацилглицерин-инозитолтрифосфатной (HTR2C), так и аденилатциклазной (HTR7) системами вторичных мессенджеров. Кроме того, на ранних стадиях развития экспрессируются VMAT2 и SERT, осуществляющие везикулярный транспорт и обратный захват серотонина. Зиготический геном у *Xenopus* включается лишь на стадии средней бластулы, следовательно, эти гены входят в состав материнской мРНК, что говорит об их функционировании на ранних стадиях развития. Таким образом, с учетом присутствия самого серотонина, можно констатировать наличие в ранних эмбрионах *X. laevis*, по крайней мере, части основных функциональных компонентов серотонергической системы.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТОДЕРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ *in vitro*

© 2011 г. О. С. Петракова*, Е. Н. Черниогло, А. В. Васильев*

*Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Актуальной проблемой современной клеточной биологии является изучение пластичности клеток, возможности трансдифференцировки клеток в пределах одного зародышевого листка и разработка методов направленной клеточной дифференцировки в условиях *in vitro*.

Целью данной работы является характеристика постнатальных культур клеток слюнной железы мыши в сравнении с постнатальными прогениторными клетками печени в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. Работа проводилась на самцах мышей линии ROSA26-LacZ 2–5-месячного возраста. Эпителиальные протоковые клетки подчелюстной слюнной железы и печеночные клетки-предшественники были выделены по оптимизированной методике и затем культивировались до 10 и 5 пассажей соответственно. Оценка культур проводилась в 2d (на пластике) и 3d (в коллагеновом геле) условиях на 1–2 пассажах. Было оценено время удвоения клеточной популяции, морфологические и иммуноцитохимические характеристики (наличие CD49f, цитокератинов 7, 14, 18, 19, ядерных белков HNF4-альфа, HNF3-бета, альбумина, альфафетопротеина, цитохромов P450), реакция клеток на воздействие деметилирующих агентов (5-азациитидина и вальпроевой кислоты). Также проводилась сравнительная оценка клеточных культур в 2d условиях на 5 пассаже.

Результаты. Выделенные клетки слюнной железы и печени проявляли иммунофенотипические свойства эпителиальных клеток эндодермального происхождения, обладали высокой пролиферативной активностью, способностью к спонтанной дифференцировке в крупные многоядерные клетки. В 3d условиях способность к дифференцировке увеличивалась. При воздействии деметилирующих агентов изменение профиля экспрессии клеток было различным: в клетках слюнной железы увеличивалась экспрессия ряда гепатоцитарных маркеров (альфафетопротеина, цитохрома P450, альбумина), в клетках-предшественниках печени повышалась экспрессия цитохрома P450, уровень экспрессии других маркеров не изменялся. К 5 пассажу происходила некоторая дедифференцировка клеток с частичной потерей экспрессии ряда цитокератинов (7, 18) и уменьшением способности к дифференцировке в крупные многоядерные клетки.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о значительном сходстве протоковых клеток слюнной железы мыши и печеночных клеток-предшественников. Данные клетки, по всей видимости, являются родственными по своему гистогенетическому происхождению и имеют общего энтодермального предшественника.

НОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ МОРФОГЕНЕЗ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ У URODELA

© 2011 г. Е. А. Радугина

Лаборатория проблем регенерации

Взрослые тритоны *Pleurodeles waltl*, как и другие хвостатые амфибии, обладают уникальными регенерационными способностями, в частности, полностью восстанавливают хвост после ампутации. Молекулярные механизмы морфогенеза при регенерации имеют отличия от работающих в эмбриональном развитии и требуют собственных подходов для изучения. В процессе экспериментов по регенерации на борту российских спутников Фотон М2, М3 (2005, 2007 гг.) выяснилось, что у тритонов, содержащихся на субстрате, в отличие от животных в глубокой воде в аквариуме или на орбите в условиях невесомости, происходит изменение формы регенерирующего хвоста, а именно его изгиб в дорсовентральной плоскости. Оказалось, что этот феномен воспроизводим в лаборатории и имеет необратимый характер. Морфометрическими методами с помощью программ компьютера было показано статистически достоверное изменение формы хвоста при содержании на подложке, регистрирующееся с 21-го дня регенерации (III ст. по Iten, Bryant, 1976). Были показаны отличия в гистологическом строении таких регенератов в сравнении с контролем, обуславливающие изменение формы хвоста, а именно изгиб осевых структур (хорды и эпендимной трубки) и направленная конденсация клеток дорсальной бластемы. Более того, на стадиях, предшествующих внешнему проявлению обсуждаемого эффекта, гистологическими

методами была выявлена большая пролиферативная активность клеток эпидермиса на дорсальной стороне. Предварительные данные иммуногистохимии с использованием специфических маркеров пролиферации свидетельствуют о том, что уже на ранних стадиях регенерации в опыте наблюдается иной паттерн пролиферации, нежели в контроле, что, по-видимому, и обеспечивает изменение формы хвоста. Сигнальные пути, опосредующие влияние гравитации и субстрата на проявление морфогенетического эффекта у животных при содержании их на подложке, представляются чрезвычайно интересными для изучения. Предполагается, что они задействуют как ключевые морфогенетические *Shh*, *BMP* и *FGF* пути, так и эпигенетические регуляторы генной экспрессии. В качестве дополнительных кандидатов на роль посредников между воздействием условий регенерации и его эффектом рассматриваются белки теплового шока. В последнее время открываются новые аспекты их функционирования, а именно: регуляция соотношения апоптоза и пролиферации, участие в морфогенезе в раннем развитии. Это позволяет предполагать важную потенциальную роль белков теплового шока и в эпиморфной регенерации. Дальнейшие исследования с использованием разрабатываемой нами новой модели позволят внести вклад в понимание эпигенетических механизмов морфогенеза при регенерации органов и тканей.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ЭНДОКРИННОЙ ФУНКЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ МОЗГА У КРЫС В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

© 2011 г. Ю. Ю. Сайфетярова, А. Я. Сапронова, М. В. Угрюмов

Лаборатория гормональных регуляций

Работа посвящена проверке нашей гипотезы о том, что дофамин (ДА) в отсутствие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в перинатальном периоде развития у крыс поступает из мозга в кровь и оказывает влияние на развитие периферических мишеней и самого мозга.

Учитывая, что ДА синтезируется, и возможно, выделяется в общую систему циркуляции не только из мозга, но и из периферических органов (орган Цукеркандля, почки, надпочечники и др.) нам необходимо оценить вклад ДА, синтезирующегося именно в развивающемся мозгу, в его общее содержание в периферической крови.

С этой целью нами впервые была разработана специфическая фармакологическая модель максимального ингибирования синтеза ДА в мозгу при сохранении его уровня в периферических источниках с помощью α -метил-п-тирозина (α МПТ) – ингибитора ключевого фермента синтеза ДА – тирозингидроксилазы. В предварительных экспериментах по системному введению α МПТ (200, 100, 80 и 50 мкг) нами была выбрана доза 50 мкг, которая позволила исключить влияние ингибитора на метаболизм ДА в периферических органах. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с протоколом, утвержденным комитетом по охране животных Института биологии развития РАН, находящимся

ся в соответствии с национальными и международными законами и правилами. В последующих экспериментах 3-дневным крысам в латеральные желудочки мозга стереотаксически вводили 50 мкг α МПТ, после чего уровень катехоламинов оценивали с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией в мозгу, органе Цуккеркандля, надпочечниках, почках и плазме.

Показано, что через 4 часа после введения α МПТ в дозе 50 мкг происходит снижение уровня ДА в мозгу на 54% и в плазме на 74% при неизменном его уровне в периферических органах. Кроме того, происходит достоверное снижение концен-

трации норадреналина и дигидроксифенилуксусной кислоты в мозгу и плазме у животных, в то время как в органе Цуккеркандля, почках и надпочечниках их концентрация не меняется.

Таким образом, разработанная нами модель позволила получить прямые доказательства поступления дофамина из мозга в общую систему циркуляции до формирования ГЭБ. Полученные данные подтверждают нашу гипотезу о том, что в данном постнатальном периоде мозг функционирует как эндокринный орган, внося существенный вклад в поддержание высокой концентрации физиологически активных веществ в крови.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНЫХ И ТКАНЕВЫХ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАТОВ

© 2011 г. К. К. Сухинич

Лаборатория экспериментальной нейробиологии

Одной из важнейших задач современной нейробиологии является коррекция патологических состояний мозга. Это связано с тяжелыми последствиями при заболеваниях и травмах головного и спинного мозга. Одним из перспективных подходов является нейротрансплантация эмбриональной нервной ткани. Однако до сих пор не ясно, какой материал (клеточные суспензии, полученные путем диссоциации тканей эмбрионального мозга, или фрагменты эмбриональной нервной ткани) предпочтительнее использовать для нейротрансплантации. Целью данного исследования было проведение сравнительного анализа приживления и развития клеточных и тканевых аллотрансплантатов эмбриональной нервной ткани мозга мышей 14-дневного развития, в клетках которых синтезируется белок GFP.

Методика проведения эксперимента была следующей. Фрагмент либо клеточную суспензию неокортекса эмбриона мыши 14-дневного развития трансплантировали в стриатум взрослого животного. Животных фиксировали через 7 и 30 сут после трансплантации. Мозг извлекали и резали на микротоме с замораживающим столиком. Затем проводили иммуногистохимическое окрашивание срезов антителами против GFAP, NeuN, PCNA, Tyrosine Hydroxylase (TH).

Через 7 и 30 сут после трансплантации по флуоресценции GFP у экспериментальных животных удалось обнаружить трансплантаты. Тканевые трансплантаты, как правило, имели четкие границы и к 30-м суткам значительно увеличивались в размерах, тогда как клеточные трансплантаты не имели четких границ и изменение их размеров было менее выражено. Миграция клеток трансплантата происходила в обоих случаях.

Наиболее обширная миграция клеток была обнаружена вдоль нервных волокон мозолистого тела. Кроме того, было обнаружено, что отростки клеток тканевых трансплантатов прорастали в контралатеральное полушарие вдоль волокон мозолистого тела. Окраска антителами против GFAP – маркера астроцитов, выявила глиальную реакцию мозга реципиента, дифференцировку клеток тканевых и клеточных трансплантатов в глиальном направлении, а также миграцию астроцитов реципиента в трансплантат. С помощью окраски антителами против NeuN – маркера зрелых нейронов, было обнаружено, что часть клеток трансплантатов дифференцировалась в нейроны. Наблюдалось полное прекращение пролиферации как в клеточных, так и тканевых трансплантатах на 30-е сутки после операции, что было выявлено с помощью антител против PCNA – маркера пролиферирующих клеток. По окраске антителами против TH было обнаружено вращание отростков дофаминергических нейронов реципиента в трансплантат.

Таким образом, как тканевые, так и клеточные трансплантаты способны переживать не менее 30 суток без отторжения, при этом клетки в них дифференцируются в нейроны и глию. Однако тканевые трансплантаты демонстрируют большую способность к росту. Это, по-видимому, связано с более длительным сохранением эмбрионального микроокружения в тканевых трансплантатах в сравнении с трансплантатами диссоциированных клеток.

РАЗВИТИЕ *Mytilus trossilus* ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СОЛЕНОСТИ: ИЗМЕНЕНИЕ ТЕМПОВ РОСТА ЛИЧИНОК И УРОВНЯ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ

© 2011 г. Е. Г. Фофанова, М. Ю. Хабарова, Е. Г. Ивашкин

Лаборатория сравнительной физиологии

Известно, что у личинок пресноводных моллюсков серотонин (5-НТ), продуцируемый ранними нейронами, регулирует темпы развития, тогда как FMRFамид (FMRFa) вовлечен в процесс осморегуляции. Ранее нами было показано, что неомицин влияет на уровень FMRFa в ранних нейронах личинок гастропод. Мы исследовали темпы роста и изменение уровня FMRFa и 5-НТ в клетках личиночной нервной системы *Mytilus trossilus* при развитии в условиях различной солености (8, 33 и 40‰) со стадии трохофоры до стадии велигера в присутствии неомицина и без него. Для оценки ненейрального действия антибиотика был использован ампициллин.

Иммуноцитохимическое окрашивание показало более низкий уровень FMRFa в нейронах личиночной нервной системы в 8‰ по сравнению с 33 и 40‰. Инкубация в неомицине повышает общий уровень FMRFa во всех случаях, тогда как ампициллин не оказывает такого эффекта. Выживаемость в опыте отрицательно коррелировала

с уровнем 5-НТ в апикальных нейронах: была минимальной при солености 33‰ (максимальный уровень 5-НТ) и максимальной при 8‰ с неомицином (минимальный уровень 5-НТ). Сравнение средних размеров велигеров в разных вариантах опыта показало, что личинки достоверно крупнее при выращивании в воде с повышенной соленостью. Однако в 8‰ с неомицином 3.6% животных имели аномально крупную раковину.

Наши эксперименты показали, что темпы роста личинок *Mytilus trossilus* увеличиваются при возрастании уровня солености, а соответствующее повышение уровня FMRFa, скорее всего, связано с приспособлением личинок к этому фактору среды. Роль 5-НТ в регуляции роста в условиях переменной солености и его связь с FMRFамидной системой является одной из задач наших дальнейших исследований.

Работа была поддержана грантами РФФИ № 09-04-01326 и 10-04-10134.

СКОРОСТЬ СИНТЕЗА ДОФАМИНА В ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ И СТРИАТУМЕ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПАРКИНСОНИЗМА У МЫШЕЙ

© 2011 г. Г. Р. Хакимова, Е. А. Козина, А. Я. Сапронова, М. В. Угрюмов

Лаборатория гормональных регуляций

Считается, что одним из возможных компенсаторных механизмов, обеспечивающих длительный период бессимптомного течения болезни Паркинсона, является увеличение скорости синтеза дофамина (ДА) сохранившимися нейронами нигростриатной системы.

Цель: оценить скорость синтеза ДА в нигростриатной системе при моделировании паркинсонизма у мышей.

Задачи: определить активность тирозингидроксилазы – скорость-лимитирующего фермента в процессе синтеза ДА – в телах и терминалях аксонов ДА-ергических нейронов.

Материалы и методы: работа проведена на двух моделях паркинсонизма (досимптомной и ранней симптомной), получаемых путем системного введения по различным схемам самцам мышей 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП). Перед декапитацией животным внутривентриально вводили ингибитор декарбоксилазы ароматических аминокислот – 3-гидроксибензилгидразин дигидрохлорид (NSD-

1015). Содержание предшественника ДА – L-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА) в черной субстанции и стриатуме определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией.

Результаты: после введения МФТП и NSD-1015 в обеих моделях в черной субстанции уровень L-ДОФА остается без изменений. В стриатуме в досимптомной модели концентрация L-ДОФА снижается на 37%, ранней симптомной – на 51%. При пересчете полученных значений на количество выживших ДА-ергических нейронов в черной субстанции как в досимптомной, так и в ранней симптомной моделях болезни Паркинсона активность тирозингидроксилазы в сохранившихся телах ДА-ергических нейронов увеличивается. В терминалях ДА-ергических аксонов стриатума в досимптомной модели также активность тирозингидроксилазы увеличивается, тогда как в ранней симптомной активности фермента не изменяется.

Выводы: деградация нигростриатной системы на досимптомной стадии паркинсонизма сопровождается увеличением скорости синтеза ДА в сохранившихся телах и терминалях аксонов ДА-ергических нейронов. На ранней симптом-

ной стадии также наблюдается увеличение синтеза ДА в сохранившихся телах ДА-ергических нейронов, однако, на скорости синтеза отсутствуют, что, вероятно, является одной из причин появления симптомов болезни Паркинсона.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum* L.) АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫМ СПОСОБОМ

© 2011 г. Н. Ю. Хозьбаба

Лаборатория генетических основ морфогенеза

Агробактериальная трансформация и биологическая баллистика — два самых широко используемых метода для генетической трансформации растений.

Возможность введения гетерологичных генов в двудольные растения путем использования *Agrobacterium tumefaciens* была впервые показана в 1983 году тремя группами исследователей одновременно (Mary-Dell Chilton et al., 1983; J. Schell et al., 1983; Horsch et al., 1983). Ранее считалось, что однодольные растения, включая важнейшие зерновые культуры, устойчивы к агробактериальному переносу генов, но в течение 17 лет эти проблемы были преодолены. Агробактериальная трансформация показана на рисе (Chan et al., 1992, 1993), кукурузе (Ishida et al., 1996; Komari et al., 1996) и ячмене (Tingay et al., 1997). Большинство исследователей трансформации пшеницы использовали биологическую баллистику и другие методы трансформации до первой публикации Cheng et al. (1997), доложивших об успешной агробактериальной трансформации пшеницы. Авторы использовали незрелые зародыши и эмбриогенный каллус для производства фертильных трансгенных растений.

В настоящее время генетическая трансформация посредством *Agrobacterium tumefaciens* используется чаще, чем биологическая баллистика. Этот метод обладает несколькими преимуществами перед другими формами трансформации, включая способность переносить большие сегменты ДНК с минимальными перестройками, низкое число трансгенных копий, более стабильное наследование трансгенов с меньшим умолканием и более низкая стоимость.

На данном этапе процесс создания трансгенных растений мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) методом агробактериальной трансформации некоторыми авторами объявлен рутинным, однако эффективность трансформации пшеницы не превышает 0.1–4% и показана для нескольких высокоотзывчивых генотипов, в том числе и для

модельного сорта Bobwhite и его производных. Поэтому, основываясь на фундаментальных знаниях о трансформации посредством агробактерии, мы оптимизируем параметры агробактериальной трансформации мягкой пшеницы для широко возделываемых сортов.

Нами исследуются следующие факторы, влияющие на эффективность агробактериальной трансформации: выбор экспланта (зрелые и незрелые зародыши), генотип растения (сорта Злата и Эстер), штаммы агробактерии (LBA4404, AGL0, ENA105), векторные конструкции (pVec035, pCAMBIA1304), срок прекультивации культуры (0, 6, 12, 24 дней), длительность инокуляции (20, 40, 60 минут), плотность суспензии агробактерии для инокуляции ($OD_{600} = 0.3; 0.6$) и условия сокультивации (десикация — высушивание растительных тканей).

Оптимизация всех перечисленных процессов имеет существенное значение для увеличения эффективности системы трансформации (повышения частоты трансформации и уменьшения трудоемкости).

На данный момент нами исследовано влияние десикации и были получены следующие данные: зарост эксплантов агробактерией через 14 дней после сокультивации без воздействия десикации — $19.44 \pm 1.82\%$, с воздействием десикации — $0.57 \pm 0.37\%$.

Полученные данные позволяют предположить, что десикация растительных тканей после инокуляции значительно подавляет рост агробактерии, что увеличивает выживаемость растительных клеток, таким образом, увеличивается количество стабильных трансформантов и эффективность трансформации пшеницы в целом.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ТРАНСКРИПТОВ ГЕННОГО КОМПЛЕКСА *lawc/Trf2* У *Drosophila melanogaster*

© 2011 г. Р. О. Черезов

Лаборатория генетических основ морфогенеза

Ген *Trf2* кодирует фактор базовой транскрипции, участвующий в процессах морфогенеза у дрозофилы. Нами было показано, что ген *Trf2* перекрывается с другим геном — *leg-arista-wing complex (lawc)*, и зона перекрытия двух генов входит в состав 9 разнонаправленных транскриптов, два из которых принадлежат гену *lawc*. Мы решили использовать модельную систему *lawc/Trf2* для исследования особенностей экспрессии перекрывающихся генов *in vivo*.

Анализ картины экспрессии генов *lawc* и *Trf2* в развитии проводили с помощью Нозерн-блот гибридизации и ПЦР в реальном времени. Оказалось, что экспрессия этих генов не является убиквитарной, т.е. количество транскриптов и их уровень экспрессии меняется в зависимости от стадии развития. Самый высокий уровень экспрессии обоих генов наблюдается в эмбрионах. Далее мы провели гибридизацию *in situ* на целых эмбрионах и показали, что транскрипты *Trf2* и *lawc* экспрессируются практически во всех тканях, но с разной интенсивностью. Исследование того, как сочетается экспрессия двух разнонаправленных перекрывающихся генов в одной клетке, станет нашей дальнейшей задачей.

Нозерн-блот анализ мутантов *lawc^{p1}* показал, что в состав некоторых транскриптов входит Р-элемент, который встроился в район перекрытия генов *lawc* и *Trf2*. Результаты генетического анализа по взаимодействию *lawc^{p1}* с мутациями генов семейства *Argonaute*, ответственного за деградацию РНК-мишени по механизму РНК-интерференции, показал, что падению экспрессии TRF2 в линии *lawc^{p1}* способствует эндорибонуклеаза AGO2, которая активирует РНК-интерференционное подавление Р-элемент-содержащих

транскриптов. Более того, в этих экспериментах мы показали, что TRF2 может контролировать процесс РНК-интерференции во время созревания яйца, участвуя в регуляции экспрессии *aubergine* — другого гена семейства *Argonaute*. Самки линии *lawc^{u3}* стерильны из-за нарушения самовоспроизведения стволовых клеток яичников. Нозерн-блот гибридизация не выявила у них ни одного транскрипта *Trf2* (у самцов они были). ПЦР-РВ показал, что экспрессия *Trf2* у самок этой линии есть, но сильно снижена. Мы предполагаем, что стерильность самок *lawc^{u3}* вызвана нарушением регуляторной зоны, специфически контролирующей экспрессию *Trf2* в оогенезе, поскольку тотальное снижение экспрессии *Trf2* приводило бы к гибели особей. Возможно, эта зона находится в районе второго интрона *Trf2*, так как в этом районе нами обнаружены хромосомные перестройки. Линия *lawc⁵²⁰* характеризуется летальностью на эмбриональной стадии. Результат Нозерн-блот анализа показал наличие в этой линии укороченного транскрипта *Trf2*.

Очевидно, что функционирование регуляторной зоны генов *lawc/Trf2* и взаимодействие перекрывающихся транскриптов этих генов требуют дальнейшего изучения. Для этого мы планируем анализ экспрессии генов *lawc/Trf2* в других мутантных линиях и исследование возможности образования дуплексов между перекрывающимися транскриптами *in vivo*.

Работа финансировалась грантами РФФИ № 10-04-01120-а и 08-04-01768-а и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН “Биологическое разнообразие” (Подпрограмма “Генофонды и генетическое разнообразие”).

КАК ВИМЕНТИНОВЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ РЕГУЛИРУЮТ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ?

© 2011 г. И. С. Черноиваненко

Лаборатория экспериментальной эмбриологии

Митохондрии играют центральную роль в различных важнейших клеточных процессах, таких как синтез АТФ и снабжение клетки энергией, продукция активных форм кислорода, регуляция концентрации Ca^{+2} в цитоплазме и запрограммированная клеточная смерть — апоптоз. Многие функции митохондрий связаны с их способностью генерировать и поддерживать потенциал на внутренней мембране при помощи аэробного дыхания. Уровень потенциала митохондрий контро-

лируется различными внешними и внутренними факторами, механизмы действия которых изучены недостаточно. Важную роль в функционировании митохондрий играет их внутриклеточное распределение, которое достигается в результате их взаимодействия с различными структурами цитоскелета.

При помощи потенциал-зависимого красителя нами обнаружено, что потенциал стационар-

ных митохондрий, прикрепленных к цитоскелету, выше, чем потенциал подвижных митохондрий, транспортируемых вдоль микротрубочек. Однако ни увеличение подвижности митохондрий при разрушении фибриллярного актина, ни ее уменьшение при разборке микротрубочек не влияет на потенциал митохондрий. Наши данные показывают, что уровень потенциала митохондрий определяется их взаимодействием с виментиновыми промежуточными филаментами. Настоящее исследование посвящено изучению регуляции потенциала митохондрий малой ГТФазой Rac1. При экспрессии в безвиментиновых клетках мутантного виментина с заменой Ser56 на Ala

регуляция потенциала митохондрий с участием ГТФазы Rac1 не наблюдается. Наши результаты показывают, что в результате активации ГТФазы Rac1 и ее эффектора p21-активируемой киназы (PAK1) происходит фосфорилирование остатка Ser56 виментина, а это, в свою очередь, приводит к нарушению связи митохондрий с виментиновыми промежуточными филаментами и снижению их мембранного потенциала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук, РФФИ (грант № 10-04-00414-а).

ЦИТОКИНЫ ВОСПАЛЕНИЯ В МИГРАЦИИ НЕЙРОНОВ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ ГОНАДОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ ГОРМОН

© 2011 г. В. С. Шарова

Лаборатория гистогенеза

Известно, что бактериальная инфекция у матери индуцирует продукцию цитокинов воспаления, вызывающую нарушения развития мозга у плода. Введение бактериального эндотоксина липополисахарида (ЛПС) беременной самке приводит к повышению в крови уровня таких цитокинов, как фактор некроза опухоли (ФНО α), интерлейкин 1 (ИЛ-1 β) и лейкоemia ингибирующий фактор (ЛИФ), которые наряду с ЛПС, в свою очередь, стимулируют секрецию провоспалительных цитокинов плодной частью плаценты. Ранее нами было показано, что введение ЛПС беременной самке приводит к подавлению миграции нейронов, синтезирующих гонадотропин-релизинг гормон (ГРГ-нейронов) у плодов крыс. Мы предположили, что провоспалительные цитокины являются связующим звеном между внутриматочной инфекцией матери и последующим нарушением миграции и дифференцировки ГРГ-нейронов. Целью данной работы являлось исследование уровня цитокинов воспаления в сыворотке крови матери и плода, а также в цереброспинальной (ЦСЖ) и амниотической жидко-

сти (АЖ) плода, после инфицирования матери ЛПС. Уровень цитокинов: ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ФНО α , интерферона (ИФ γ), ЛИФ и белка хемотаксиса моноцитов (MCP-1), оценивали при помощи проточной цитометрии и иммуноферментного анализа у мышей через 1.5 часа после внутрибрюшинного введения ЛПС (45 μ g/kg). Анализ полученных данных показал, что после введения ЛПС в крови матери уровень цитокинов достоверно повышается: ЛИФ в 38 раз, ИЛ-6 в 23 раза, MCP-1 в 12 раз, ФНО α в 4 раза, ИЛ-10 в 5 раз. В крови и ЦСЖ плода также отмечено достоверное повышение MCP-1 в 2–2.5 раза, ИЛ-6 в 7 раз и 3 раза, соответственно. Кроме того, в АЖ наблюдалось возрастание уровня MCP-1 в 1.5 раза и ЛИФ в 3 раза. Уровень других цитокинов через 1.5 часа после введения ЛПС не изменялся. Таким образом, воспаление, вызванное ЛПС, индуцирует повышение уровня провоспалительных цитокинов в крови беременной самки, а затем в организме плода, что в конечном итоге приводит, по-видимому, к нарушению интраназальной миграции ГРГ-нейронов в мозг.

МИОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК ИЗ ЗАРОДЫШЕВОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

© 2011 г. О. Н. Шевелева, О. В. Паюшина, Н. Н. Буторина, В. И. Старостин

Лаборатория гистогенеза

В последние годы особое развитие получили исследования, связанные с поиском альтернативных источников миогенеза в немышечных тканях. Большой интерес представляют работы по исследованию эктопических миогенных предшественников и индуцированной миогенной дифференцировки плюрипотентных и мультипотент-

ных стволовых и родоначальных клеток, например, мезенхимных стромальных клеток (МСК). В связи с этим объектом данного исследования была выбрана зародышевая печень, которая содержит как эктопические миогенные клетки, что было показано нами ранее, так и МСК. Основными задачами работы было изучить миогенные потен-

ции клеток из зародышевой печени в зависимости от стадии онтогенеза и сроков культивирования, соотнести обнаруженные в нативной печени миогенные предшественники с гистогенетическим рядом нормальных скелетных мышц и получить индуцированную миогенную дифференцировку пассированных клеток из зародышевой печени. Было показано, что в первичных культурах стромальных клеток из печени 15-, 17- и 20-суточных зародышей, в отличие от 14-суточных, наблюдается спонтанное образование миосимпласмов. На криостатных срезах печени этих сроков развития были обнаружены единичные клетки, экспрессирующие миогенный маркер *MyoD*. Анализ антигенного профиля миогенных элементов в первичных культурах клеток из зародышевой печени методами иммуноцитохимии и ПЦР однозначно свидетельствует об их принадлежности к скелетным мышцам. Сравнительное изучение экспрессии генов, кодирующих маркеры основных этапов миогенеза (*Pax3*, *MyoD*, *Myf5*, *Myf6*, *m-кадгерина*), показало зависимость миогенных потенциалов клеток из печени от срока развития зародыша и длительности культивирова-

ния и позволило обнаружить корреляцию между миогенными потенциалами и активностью гемопоеза в печени. Отсутствие экспрессии *Pax7* в культурах клеток из печени и присутствие в нативной печени клеток, экспрессирующих *MyoD*, позволяет предположить, что спонтанно образующиеся в первичной культуре мышечные структуры развиваются не из сателлитоподобных клеток, а из клеток, по-видимому, соответствующих покоящимся миообластам. В экспериментах по направленной миогенной дифференцировке клеток в составе популяции МСК зародышевой печени показано образование немногочисленных миотуб в индукционной среде, содержащей 5-азацидин. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о присутствии в строме зародышевой печени как предсуществующих, так, видимо, и индуцибельных скелетных миогенных предшественников.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 09-04-00002).

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ АССОРТАТИВНОГО СКРЕЩИВАНИЯ В ГРУППЕ *Drosophila virilis*

© 2011 г. Д. М. Щепетов

Лаборатория экспериментальной эмбриологии

Этология размножения плодовых мушек рода *Drosophila* достаточно хорошо изучена, однако генетические основы механизмов распознавания представителей своего вида и гены, лежащие в основе реализации механизма распознавания “своей-чужой” при конспецифическом спаривании остаются практически неизвестны. Для *D. melanogaster* ранее была показана роль при спаривании вкусового рецептора *Gr68a*, ген, кодирующий который экспрессируется в нескольких хемочувствительных щетинках передних лапок самца. Секвенирование генов, гомологичных *Gr68a* *D. melanogaster* у группы видов *D. virilis*, а также сплайс-формы, гомологичной гену *Gr32a* у *D. melanogaster*, показало чрезвычайно высокий уровень аминокислотных замен в экстраклеточных доменах рецептора. Основываясь на приведенных фактах, мы предположили, что на близкородственных видах группы *D. virilis* различия в последовательности гена *Gr32a/Gr68a* будут отражать способность самцов отличать самок своего вида от всех прочих, обеспечивая таким образом репродуктивную изоляцию. Проведенный нами анализ не выявил значимой корреляции между формой рецептора у F2 гибридных (*virilis* × *lumeii*) самцов и предпочтения F2 самца к самке одного из двух родительских видов. По-

лученные результаты свидетельствуют, что, по всей видимости, в группе видов *D. virilis* соответствующую функцию на себя берет другой/другие рецепторы. Для поиска кандидата на роль гена, создающего репродуктивную изоляцию, мы провели QTL анализ с использованием микросателлитных локусов выбором самцом самки для спаривания у самцов второго поколения межвидовых гибридов *Drosophila virilis* и *Drosophila lumii*. На данный момент по данным QTL анализа не было выявлено значительной связи ни одного локуса с выбором гибридным самцом чистого вида. С целью расширить панель генетических маркеров для проведения QTL анализа, а также для оценки роли имеющегося репертуара вкусовых рецепторов в видообразовании, нами проводится секвенирование большого числа вкусовых рецепторов. Полученные данные позволяют идентифицировать как минимум еще два гена, находившихся под строгим движущим отбором в процессе видообразования, что косвенно указывает на то, что эти рецепторы могут отвечать за видоспецифичное предпочтение к субстрату питания или субстрату для откладки яиц, либо являются кандидатными при изучении ассортативного скрещивания.

УДК 575.21

ПРИОНЫ ДРОЖЖЕЙ КАК МОДЕЛЬ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ АМИЛОИДОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2011 г. С. Г. Инге-Вечтомов

Санкт-Петербургский государственный университет,
СПб Филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9,
E-mail: ingevectomov@gmail.com

Поступила в редакцию 21.09.2010 г.
Окончательный вариант получен 14.10.2010 г.

Ряд нейродегенеративных заболеваний человека (т.н. болезней зрелого возраста) связан с образованием белковых агрегатов — амилоидов. Прионные заболевания: куру, болезни Кройтцфельда-Якоба, Гершмана-Штрасслера-Шайнкера, смертельная семейная бессонница и др. — примеры инфекционных амилоидозов. Благодаря открытию прионов у дрожжей, разработана модельная система для изучения механизмов амилоидогенеза и его инфекционной природы. Существование прионных сетей, т.е. взаимодействия между разными прионами, обнаруженное у дрожжей, находит в последнее время подтверждение и в форме взаимодействия различных амилоидов у человека. Потенциальная опасность амилоидозов заложена в самой структуре практически любых белков в виде участков, образующих β -слои, которые будучи экспонированными приводят к агрегации белков. Вместе с тем известно несколько ярких примеров адаптивной ценности амилоидных агрегатов: фактор цитоплазматической несовместимости *Podospora anserina*, паутина пауков, цитоплазматическая стресс-гранулы в клетках млекопитающих, прионная форма белка *СРЕВ Aplisia*, ответственная за регуляцию активности нейронов и др. Все эти факты следует учитывать при поисках антиамилоидных препаратов. Открытие белковой наследственности у низших эукариот изменяет наши представления о роли матричного принципа в биологии, дополняя его идеей конформационных матриц (матриц II рода), вовлеченных в воспроизведение пространственной структуры надмолекулярных комплексов клетки.

Ключевые слова: амилоиды, прионы, нейродегенеративные заболевания, дрожжи, белковая наследственность.

1. Амилоиды и амилоидозы

Многие нейродегенеративные заболевания человека и других млекопитающих сопровождается образованием внутриклеточных и внеклеточных амилоидных тяжей и бляшек, представляющих собой агрегаты различных белков. Предшественниками амилоидов служат нормальные клеточные белки или их фрагменты (Prusiner, 2001). Амилоидозы и соответственно амилоиды подразделяют на инфекционные и неинфекционные (см. табл. 1). К инфекционным амилоидозам относят: куру, болезнь Кройтцфельда-Якоба (СJD), болезнь Гершмана-Штрасслера-Шайнкера, смертельную семейную бессонницу у человека, а также бычью губчатую энцефалопатию (“Коровье бешенство”), скрэпи (овец,

коз, оленей) и аналогичные заболевания других животных. Все остальные амилоидозы считаются неинфекционными.

Открытие инфекционных амилоидов вызвало сенсацию в свое время. Впервые инфекционность экстрактов мозга овец, больных скрэпи была показана в 1962 г. (Parry, 1962). Позже С. Прузинер разработал концепцию “protein only”, подразумевавшую, что именно белок-прион представляет собой инфекционное начало в случае прионных заболеваний (они же инфекционные амилоидозы). За эти работы в 1997 г. С. Прузинер был удостоен Нобелевской Премии (Prusiner, 1998). Вскоре были опубликованы данные нескольких лабораторий, осуществивших белковую трансформацию, в результате которой обычный клеточный белок был превращен в прион. Этот результат получен с использованием модельного объекта — дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, у которых также обнаружены белки-прионы (см.: Fink, 2005).

¹ Работа получила финансовую поддержку программы Президиума РАН “Происхождение и эволюция биосферы”, грантов НШ-6455.2010.4, ГК 02.740.11.0 698. НИР проводили в рамках реализации ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009 – 2013 годы (П799).

Таблица 1. Наиболее распространенные инфекционные и неинфекционные амилоидозы человека и др. млекопитающих (по: Prusiner, 2001)

Неинфекционные:

Болезнь Альцгеймера
Болезнь Паркинсона
Болезнь Хантингтона и спиноцеребральная атаксия (поли Q)
Фронтотемпоральная деменция
Болезнь Пика
Прогрессирующий супрануклеарный паралич
Амиотрофный латеральный склероз

Инфекционные:

Куру
Болезнь Кройцфельда-Якоба (CJD)
Болезнь Гершмана-Штрасслера-Шайнкера
Смертельная семейная бессонница
Бычья губчатая энцефалопатия (“Коровье бешенство”)
Скрэпи (овцы, козы, олени)

До сих пор нет четкого представления о том, чем отличаются инфекционные и неинфекционные амилоиды. В обоих случаях структурную основу амилоидов представляют собой белки, обогащенные β-слоями, посредством которых происходит их взаимодействие, приводящее к образованию амилоидных агрегатов (Prusiner, 1998, 2001). Для прионов млекопитающих показано, что прионизация белка PrP сопровождается обогащением молекулы β-слоями, которые образуются из неорганизованной части полипептидной цепи, а, возможно, также из α-спиральных участков (см. рис. 1). Некоторые исследователи высказывают точку зрения, согласно которой неинфекционные амилоиды могут превращаться в прионы, т.е. в инфекционные амилоиды (Riek, 2006; см также: Brundin, 2010).

“Сенсация” о возможности репликации белков как инфекционных агентов просуществовала недолго. Вскоре был идентифицирован эволюционно-консервативный ген млекопитающих *PRNP* – структурный ген белка PrP – предшественника прионов (рис. 2). Функция белка – предшественника приона начинает проясняться только сейчас. В 2009 г. А. Агуцци и его коллеги показали, что этот белок нужен для образования миелиновых оболочек периферических нейронов. Делеция соответствующего гена у мышей приводила к проявлению болезни, известной как полиневропатия хронической демиелинизации (Bremer et al., 2010).

2. Прионы грибов

Серьезный прогресс в изучении амилоидов и амилоидогенеза достигнут благодаря открытию прионов у низших эукариот, преимущественно у дрожжей-сахаромицетов – модельного объекта с хорошо разработанной частной и молекулярной генетикой, геномикой. Жизненный цикл дрожжей представлен на рис. 3. Особую роль в этих исследованиях сыграло то, что у дрожжей прионы представляют собой нехромосомные наследственные факторы белковой природы, что позволяет применять логику генетического анализа к их исследованию. К 2010 г. было известно 9 прионов у дрожжей-сахаромицетов и 1 у гриба *Podospora anserina* (табл. 2).

Подробнее других разработана система: ген *SUP35* – прион [*PSI*⁺]. *SUP35* (Инге-Вечтомов, 1964, Инге-Вечтомов, Андрианова, 1970) кодирует фактор терминации трансляции eRF3 (Zhouravleva et al. 1995), способный переходить в прионное состояние – цитоплазматический детерминант [*PSI*⁺], описанный Б. Коксом еще в 1965 г. (Cox, 1965). Гипотеза о его прионной природе была высказана Р. Викнером в 1994 г. (Wickner, 1994). Структурно-функциональная организация гена *SUP35* и кодируемого им белка представлены на рис. 4. Мутации в

Таблица 2. Прионы грибов

[Прион] (фенотип, продукт)	Структурный ген	Вид	Источник
[<i>PSI</i> ⁺] (нонсенс-супрессия)	<i>SUP35</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cox, 1965; Wickner, 1994
[<i>URE3</i>] (усвоение уреидо-сукцината)	<i>URE2</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Wickner, 1994
[<i>PIN</i> ⁺] (инициация [<i>PSI</i>])	<i>RNQ1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Derkatch et al., 2001
[<i>Het-s</i>] (фактор несовместимости)	<i>HET-s</i>	<i>Podospora anserina</i>	Coustou et al., 1997
[<i>ISP</i> ⁺] (фактор транскрипции Sfp1)	<i>SFP1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Rogoza et al., 2010
[<i>SWT</i> ⁺] (регуляция хроматина)	<i>SWI1/SNF5</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Du et al., 2008
[<i>OCT</i> ⁺] (фактор транскрипции)	<i>CYC8/SSN6</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Patel et al., 2009
[<i>MCA</i>] (метакаспаза)	<i>MCA1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Nemecek et al., 2009
[<i>MOT3</i>] (фактор транскрипции)	<i>MOT3</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Alberly et al., 2009
[<i>GAR</i> ⁺] (устойчивость к глюкозной репрессии)	<i>PMA1, STD1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Brown, Lindquist, 2009

Превращение PrP^C → PrP^{Sc}

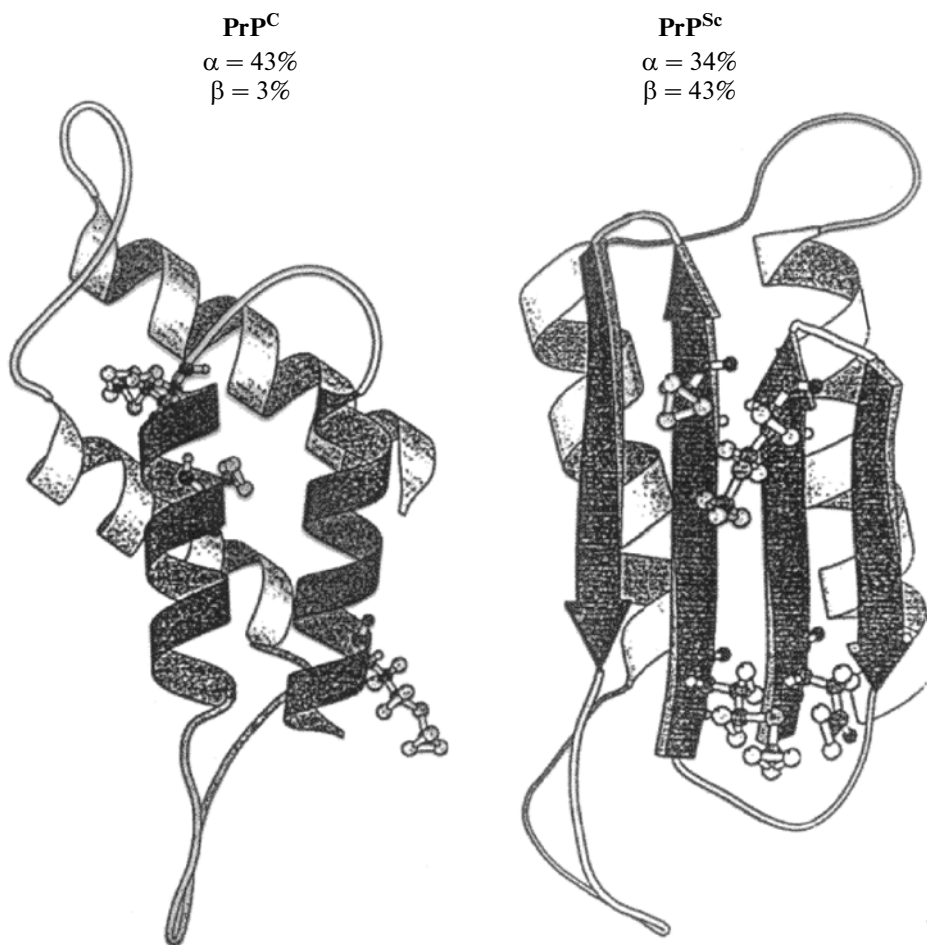


Рис. 1. Превращение PrP^C → PrP^{Sc} (Prusiner, 1998).
 PrP^C – клеточный (C – cellular) белок. PrP^{Sc} – белок в прионной форме (Sc – от Scrapy).

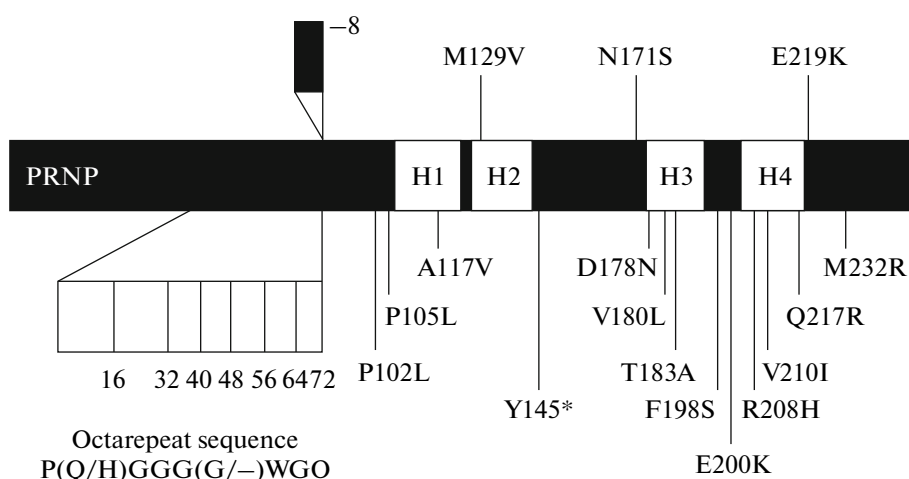


Рис. 2. Схематическое изображение гена *PRNP* человека (по: Prusiner, 1998).
 Сверху – примеры нормального полиморфизма PrP^C; буквы – обозначения аминокислотных остатков, цифры – положение в полипептидной цепи. Снизу – мутационные изменения в первичной структуре белка, приводящие к нейродегенеративным заболеваниям. В левой нижней части аминокислотная последовательность, повторяющаяся в N-терминальной части белка.

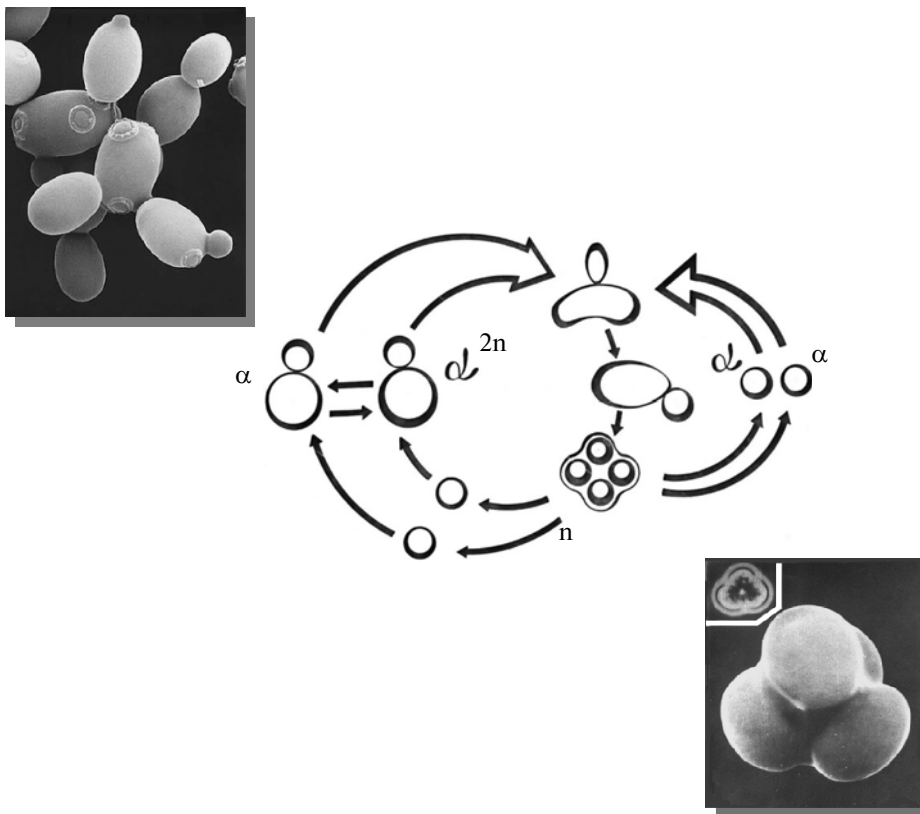


Рис. 3. Жизненный цикл дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

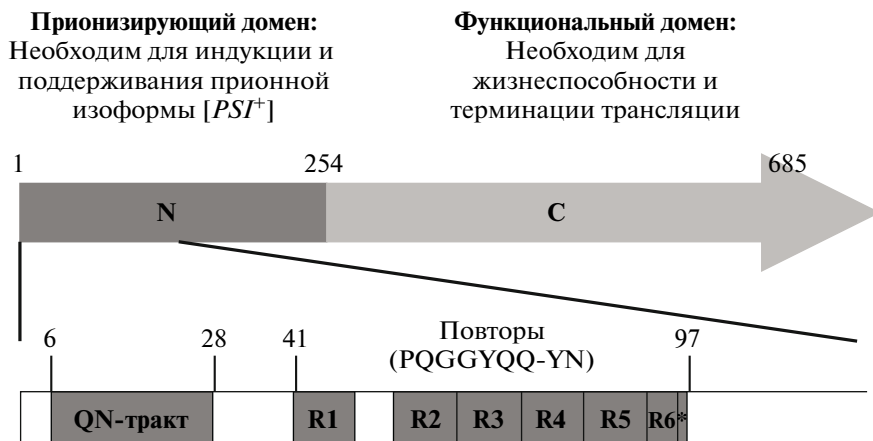


Рис. 4. Структурно-функциональная организация белка Sup35 (фактора терминации трансляции eRF3).

этом гене приводят к так называемой omnipotentной нонсенс-супрессии, т.е. к осмыслению всех трех стоп-кодонов. К такому же эффекту приводит и прионизация белка eRF3 (его инактивация вследствие включения в нерастворимые агрегаты-амилоиды) с той лишь разницей, что в первом случае эффект рецессивен, а во втором – доминантен. Ампли-

фикация *SUP35* или усиление его экспрессии приводит к индукции фактора $[PSI^+]$, о чем можно судить по проявлению нонсенс-супрессии, имея соответствующие нонсенс-аллели в других генах (Чернов и др., 1988, Chernoff et al., 1993). Сходство фенотипического проявления мутации структурного гена и усиления синтеза кодируемого им белка служит

одним из критериев при идентификации новых прионов (Wickner, 1994).

N-терминальный фрагмент белка Sup35 (eRF3), включающий повторяющиеся аминокислотные последовательности, обогащенные аспарагином и глутамином (и соответствующий участок структурного гена), необходим для прионизации белка. Это — прионизирующий пептид. Усиление экспрессии только этого участка гена при наличии в геноме полноразмерной копии *SUP35* индуцирует прион [*PSI*⁺] с большей эффективностью, чем усиление экспрессии всего гена (Ter-Avanesyan et al., 1993). Прионизирующий пептид и кодирующий его участок гена могут быть делетированы без ущерба для жизнеспособности клетки. При этом терминация трансляции происходит с повышенной эффективностью (Volkov et al., 2007). С-терминальная (большая) часть гена и соответственно белка Sup35 обеспечивают терминацию трансляции. Делеция этой части гена летальна (см. рис. 4).

Образование дрожжевого приона может происходить вне клетки — в бесклеточном растворе (Glover J.R. et al., 1997). М.Д. Тер-Аванесян и др. показали, что, если в экстракт из клеток, не содержащих фактора [*PSI*⁺], добавить очень небольшое количество экстракта из клеток, содержащих этот дрожжевой прион, то количество белка-приона быстро нарастает. Далее в качестве затравки можно взять немного материала из этой смеси и вновь добавить его в экстракт из клеток без [*PSI*]-фактора. Результат будет тем же самым. И это можно повторять бесконечно (Paushkin et al., 1997).

Для прионизации и поддержания приона вне клетки достаточно только фрагмента белка, содержащего упоминавшийся уже прионизирующий пептид (King et al., 1997). Характерная черта этого пептида — обогащенность глутамином и аспарагином — стала основой для поиска потенциально прионогенных белков с использованием компьютерных баз данных. Так появился знаменитый “список Вейсмана”, содержащий 107 белков, что составляет около 2% дрожжевого протеома. У дрозофилы таких белков 472 (3.5% протеома) (Michelitsch, Weissman, 2000). Для некоторых белков из “списка Вейсмана” уже показано, что их прионизирующий пептид, присоединенный к eRF3 вместо собственного N-домена, обеспечивает прионизацию химерного белка. Число потенциальных прионов, видимо, не исчерпывается “списком Вейсмана”. К прионизации могут быть способны и белки иного аминокислотного состава.

Пространственная структура амилоидов, в частности, прионов, не до конца расшифрована. Тем не менее, начиная с работы Перутца и др., проводивших рентгеноструктурный анализ прионизованного белка Sup35, очевидно, что это линейные олигомеры, состоящие из отдельных белковых молекул, взаимо-

действующих своими прионизирующими пептидами. В результате образуются полые трубки, внутрь и наружу которых направлены функциональные С-домены (Perutz et al., 2002). В дальнейшем эта структура была детализирована в виде модели сверхскладчатых бета слоев (superpleeted beta sheets) (Kajava et al., 2004).

Значение белок-белковых взаимодействий исследовали в системе ген *SUP35*—прион [*PSI*] у дрожжей *S. cerevisiae*, используя простоту регистрации фенотипического проявления прионизации фактора терминации трансляции eRF-3. Используя нонсенс-мутацию *ade1-14* (UGA), приводящую к накоплению красного пигмента в клетках, легко регистрировать возникающую при этом нонсенс-супрессию и следить за эффективностью этого процесса, как по интенсивности окраски колоний на полноценной среде, так и по скорости их роста на среде без аденина, а также по способности возникающего фактора [*PSI*⁺] супрессировать нонсенсы (читать стоп-кодона как значащие) в других генах. Кроме того, использование конструкции, кодирующей прионизирующий фрагмент белка Sup35, слитый с зеленым флуоресцирующим белком (GFP), позволяет следить за формой и локализацией в клетке возникающих амилоидных агрегатов (Инге-Вечтомов и др., 2004). Удобно также и то, что прион [*PSI*⁺] просто “изгнать” из дрожжей, выращивая их на среде с хлоридом гуанидина (Tuite et al., 1981).

Получены конструкции, кодирующие химерные белки, в которых прионизирующий пептид Sup35, слит с белками, имеющими четвертичную структуру: *LACZ Escherichia coli*, *ADE2 S. cerevisiae* и др. При введении их в клетки дрожжей с нормальным *SUP35* в хромосоме наблюдали повышенную эффективность и расширение спектра нонсенс-супрессии, отражающие повышение эффективности прионизации. Этот результат объясняется появлением в молекулах белков, образующих агрегаты, дополнительных участков взаимодействия, ответственных за образование субъединичной структуры этих ферментов. Это облегчало олигомеризацию химерных полипептидов. Теперь они могли взаимодействовать не только своими N-, но и С-участками. Такой эффект не наблюдали, если в качестве С-замещающего фрагмента использовали фермент, кодируемый геном *ADE1*. Этот белок не имеет четвертичной структуры (Инге-Вечтомов и др. 2004).

Наряду с С-замещенными аналогами приона [*PSI*] сконструированы и N-замещенные аналоги, в которых вместо прионизирующего фрагмента Sup35 использовали белок PrP мышей или A_β пептид человека, олигомеризация которого сопровождается болезнью Альцгеймера. Введение соответствующих конструкций на плаزمиде в клетки дрожжей сопровождалось образованием амилоидов. При этом ока-

зальсь, что свойство инфекционности (производные PrP) и неинфекционности (производные A_β – пептида) амилоидов также проявляется и в дрожжах, то есть оказывается эволюционно-консервативным (Галкин, не опубликованные данные). Кроме того, разработка таких химерных конструкций создает основу для поиска антиамилоидных препаратов с использованием дрожжей.

На базе этой же модели *SUP35*-[PSI⁺] обнаружен феномен прионных сетей. Оказалось, что инициация образования приона [PSI] зависит от другого приона [PIN⁺], предшественник которого кодирует ген *RNQ1*, функция которого еще не выяснена (Derkatch et al., 2001; Osherovich, Weissman, 2001). Более того, прион [PIN] могут замещать некоторые другие прионы, предшественники которых содержат домены, обогащенные аспарагином и глутамином (Osherovich, Weissman, 2001). Известные дрожжевые прионы могут вступать в различные отношения, как стимулируя, так и подавляя проявление друг-друга. Эти факты закономерно ставят вопрос о существовании аналогичных прионных, или протеомных сетей у человека и других млекопитающих (Галкин и др., 2006). Действительно, недавно показано, что болезнь Альцгеймера и прионные заболевания человека взаимодействуют, усугубляя проявление той и другой болезни (Morales et al., 2010).

3. Почему это важно?

Возможность моделирования амилоидозов млекопитающих с использованием дрожжей открыла новые перспективы в изучении механизмов этих заболеваний и в поисках способов лечения больных. До сих пор соответствующий диагноз равнозначен смертному приговору. Каждый третий человек после 85 лет страдает болезнью Альцгеймера. Более подробно статистику распространения амилоидозов см. (Prusiner, 2001). Прионное заболевание, известное как коровье бешенство (губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота), передается человеку и проявляется как нетипичная форма болезни Кройтцфельда-Якоба также с летальным исходом (Will et al., 1999).

До сих пор не утихают споры о том, является ли амилоидогенез исключительно патологическим явлением или он (или сходный с ним механизм) вовлечен и в некоторые адаптивные реакции клетки и организма. Правильное решение этой проблемы важно для выработки стратегии терапии амилоидогенезов. Известно, что в принципе любые белки при повышенной концентрации и чаще всего в нефизиологических условиях способны образовать амилоиды. Более того, в большинстве белков присутствуют пептиды, образующие β-слои или потенциально способные их образовать и тем самым спо-

собные к амилоидогенезу. Попутно отметим, что понимание механизмов амилоидогенеза необходимо и для развития такой области биотехнологии как белковая инженерия при конструировании и последующем производстве искусственных полипептидов (Vendruscolo, Dobson, 2007).

Эволюционный процесс предотвращает эту опасность, по меньшей мере, двумя способами. Такие пептиды обычно “хорошо спрятаны” в третичной структуре сформированной молекулы белка. С возрастом амилоидогенные пептиды чаще оказываются экспонированными, видимо в связи с ослабленной работой шаперонов (см. Schnabel, 2010). Другой способ предотвращения вредных последствий амилоидогенеза – существование специальных шаперонов, разрушающих эти агрегаты. Так при несбалансированном перепроизводстве α-цепей гемоглобина (талассемии) последние могут образовать агрегаты – т.н. тельца включения. Для предотвращения этого эффекта существует шаперон AHSP, разрушающий избыточные α-цепи (Luzatto, Notaro, 2002).

Вместе с тем накапливается все больше сведений о том, что амилоиды могут иметь и адаптивное значение. Достаточно напомнить о прионном механизме цитоплазматической несовместимости у *P. anserina* (см. табл. 2). Взаимодействие β-слоев, как и при образовании амилоидов, вовлечено в формирование паутины пауков (Hagn et al., 2010). Недавно показано, что у моллюска *Aplisia* белок CPЕВ (Cytoplasmic polyadenylation element binding protein), связывающийся с фактором полиаденилирования вовлечен в регуляцию активности нейронов посредством прионизации (Si et al., 2010), как это предположили ранее Си, Линдквист и Кандел (Si et al., 2003). Образование цитоплазматических стресс-гранул в клетках млекопитающих представляет собой объединение многих преинициаторных комплексов трансляции, что приводит к временной инактивации синтеза белка (Anderson, Kedersha, 2002). Этот процесс осуществляет белок TIA-1, N-терминальная часть которого обладает свойствами прионизирующего пептида. Если этот пептид удалить, стресс-гранулы не образуются. Если на место этого пептида поместить прионизирующий пептид Sup35 *S. cerevisiae*, образование стресс-гранул восстанавливается (Gilks et al., 2004). Некоторые пептидные гормоны млекопитающих запасаются в гипофизе (питуитарной железе) в виде амилоидных агрегатов (Maji et al., 2009).

Существование протеомных сетей и в ряде случаев адаптивную роль амилоидогенеза необходимо учитывать при поисках антиприонных и антиамилоидных препаратов. Как бы не навредить!

Наконец, исследование прионообразования у дрожжей привело к формулированию концепции “белковой наследственности”, поскольку прионы

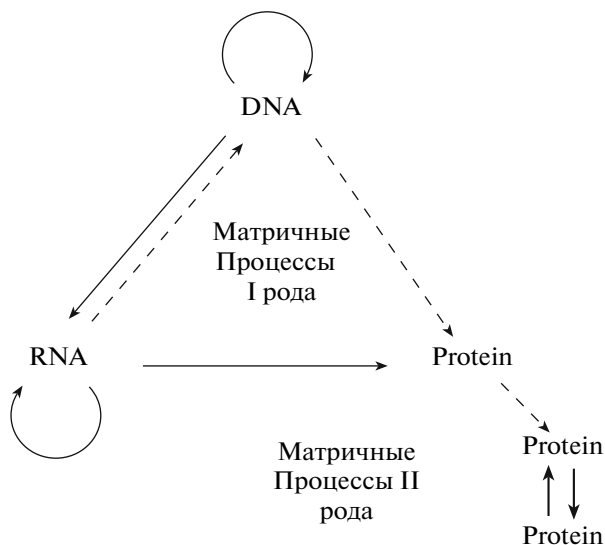


Рис. 5. Центральная догма (матричный принцип) молекулярной биологии (Crick, 1958, 1970, с дополнениями).

дрожжей представляют собой нехромосомные наследственные детерминанты, которые могут быть локализованы как в цитоплазме, так и в ядре (см. табл. 2). Это заставляет нас по новому рассматривать матричный принцип в биологии, который восходит к гипотезе Н.К. Кольцова (Кольцов, 1928) и в современном виде воплощен в Центральной догме молекулярной биологии Ф. Крика (Crick, 1958, 1970). Мы привыкли рассматривать матричные процессы (репликацию, транскрипцию, трансляцию), в которых последовательность элементов одного полимера (матрицы) определяют последовательность элементов другого – дочернего полимера. Назовем их матричными процессами I рода. Как мы убедились, есть еще и матричные процессы II рода. Существуют конформационные (пространственные) матрицы (Инге-Вечтомов, 2000; Инге-Вечтомов и др., 2004). На их основе воспроизводится измененная пространственная структура белков-прионов и прочих амилоидов. При этом не происходит репликации в общепринятом смысле. Белки при этом синтезируются в процессе трансляции (матричный процесс I рода) и могут приобретать необычную пространственную структуру, изменяя в дальнейшем “по своему образу и подобию” укладку вновь синтезируемых гомологичных и гетерологичных полипептидов (матричный процесс II рода). Это заставляет нас внести небольшую, но существенную модификацию в схему Центральной догмы (рис. 5). О матричных процессах второго рода мы знаем гораздо меньше, хотя, по-видимому, они широко распространены в природе и лежат в основе воспроизведения трехмерной организации надмолекулярных структур клетки.

Автор признателен проф. Журавлевой Г.А. и проф. Мироновой Л.Н. (кафедра генетики и селекции С.-Петербургского государственного университета) за прочтение и обсуждение рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Галкин А.П., Миронова Л.Н., Журавлева Г.А., Инге-Вечтомов С.Г. Прионы дрожжей, амилоидозы млекопитающих и проблема протеомных сетей // Генетика. 2006. Т. 42. С. 1558–1570.

Инге-Вечтомов С.Г. Реверсии к прототрофности у дрожжей, нуждающихся в аденине // Вестник Лен. Университета. Сер. 3: Биол. 1964. № 2. С. 112–116.

Инге-Вечтомов С.Г. Прионы дрожжей и центральная догма молекулярной биологии // Вестник РАН. 2000. Т. 70. С. 195–202.

Инге-Вечтомов С.Г., Андрианова В.М. Рецессивные суперсупрессоры у дрожжей // Генетика. 1970. Т. 6. С. 103–116.

Инге-Вечтомов С.Г., Борхсениус А.С., Задорский С.П. Белковая наследственность: конформационные матрицы и эпигенетика // Информационный вестник ВОГиС. 2004. Т. 8. № 2. С. 60–66.

Кольцов Н.К. Наследственные молекулы. 1928 // Цит. по: “Организация клетки”. 1936. Гос. изд. биол. и мед. лит. М.-Л. С. 585–622.

Чернов Ю.О., Деркач И.Л., Дагжесаманская А.Р., Тихомирова В.Л., Тер-Аванесян М.Д., Инге-Вечтомов С.Г. Нонсенс-супрессия при амплификации гена, кодирующего белковый фактор трансляции // ДАН СССР. 1988. Т. 301. С. 1227–1229.

Alberti S., Halfman R., King O., Kapila A., Lindquist S. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins // Cell. 2009. V. 137. P. 146–158.

Anderson P., Kedersha N. Stressful initiations // J. Cell Sci. 2002. Vol. 115. P. 3227–3234.

Bremer J., Baumann F., Tiberi C., Wessig C., Fischer H., Schwarz P., Steele A.D., Toyka K.V., Nave K.-A., Weis J., Aguzzi A. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance // Nature Neuroscience. 2010. V. 13. P. 310–318.

Brown J.C.S., Lindquist S. A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion // Genes and development. 2009. V. 23. P. 2320–2332.

Brundin P., Melki R., Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases // Nature Revs. 2010. V. 11. P. 301–307.

Chernoff Yu.O., Derkach I.L., Inge-Vechtomov S.G. Multi-copy SUP35 gene induces de-novo appearance of psi-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Curr. Genet. 1993. V. 24. P. 268–270.

Coustou V., Deleu C., Saupe S., Begueret J. The protein product of the *het-s* heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 9773–9778.

Cox B.S. ψ , a cytoplasmic suppressor of super-suppression in yeast // Heredity. 1965. V. 20. P. 505–521.

- Crick F.H.C. On protein synthesis // Symp. Soc. Exptl. Biol. 1958. Vol.12. P. 138–163.
- Crick F. Central dogma of molecular biology // Nature. 1970. V. 227. P. 561–563.
- Derkatch I.L., Bradeley M.E., Hong J.Y., Liebman S.W. Prions affect the appearance of other prions: The story of [PIN⁺] // Cell. 2001. V. 106. P. 171–182.
- Du Z., Park K.W., Yu H., Fan Q., Li L. Newly identified prion linked to the chromatin remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae* // Nature Genetics. 2008. V. 40. P. 460–465.
- Fink G.R. A transforming principle // Cell. 2005. V. 120. P. 153–154.
- Gilks N., Kedersha N., Ayodele M. et al. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1 // Mol. Biol. Cell. 2004. Vol. 15. P. 5383–5398.
- Glover J.R., Kowal A.S., Schirmer E.C., Patino M.M., Liu J.J., Lindquist S. Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae* // Cell. 1997. V. 89. P. 811–819.
- Hagn F., Eisolt L., Hardy J.G., Vendrely C., Coles M., Scheibel T., Kessler H. A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fiber assembly // Nature. 2010. V. 465. P. 239–242.
- Kajava A.V., Baxa L.D., Wickner R.B., Steven A.C. A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated beta-structure // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 7885–7890.
- King C.-Y., Tittman P., Gross H., Geber R., Aebi M., Wuthrich K. Prion-inducing domain 2-114 of yeast Sup35 protein transforms *in vitro* into amyloid-like filaments // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 6618–6622.
- Luzatto L., Notaro R. Haemoglobin's chaperone // Nature. 2002. V. 417. P. 704–705.
- Maji S.K., Perrin M.H., Sawaya M.R., Jessberger S., Vadoria K., Rissman R.A., Singru P.S., Nilsson K.P.R., Simon R., Schubert D., Eisenberg D., Rivier J., Sawchenko P., Vale W., Riek R. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules // Science. 2009. V. 325. P. 328–332.
- Michelitsch M.D., Weissman J.S. A census of glutamine/asparagine-rich regions: Implications for their conserved function and the prediction of novel prions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 11910–11915.
- Morales R., Estrada L.D., Diaz-Espinoza R., Morales-Scheihing D., Jara M.C., Castilla J., Soto C. Molecular cross-talk between misfolded proteins in animal models of Alzheimer's and prion diseases // J. Neurosci. 2010. V. 30. P. 4528–4535.
- Nemecek J., Nakayashiki T., Wickner R.B. A prion of yeast metacaspase homolog (Mca1p) detected by a genetic screen // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2009. V. 106. P. 1892–1896.
- Osherovich L.Z., Weissman J.S. Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [PSI⁺] prion // Cell. 2001. V. 106. P. 183–194.
- Parry H.B. Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep // Heredity. 1962. V. 17. P. 75–105.
- Patel B.K., Gavin-Smyth J., Liebman S.W. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as prion // Nature Cell Biology. 2009. V. 11. P. 344–349.
- Paushkin S.V., Kushnirov V.V., Smirnov V.N., Ter-Avanesyan M.D. *In vitro* propagation of the prion-like state of yeast Sup35 protein // Science. 1997. V. 277. P. 381–383.
- Perutz M.F., Finch J.T., Berriman J., Lesk A. Amyloid fibers are water-filled nanotubes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 5591–5595.
- Prusiner S.B. Prions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13363–13383.
- Prusiner S.B. Shattuck lecture – Neurodegenerative diseases and prions // N. Engl. J. Med. 2001. V. 344. P. 1516–1526.
- Riek R. Infectious Alzheimer's disease? // Nature. 2006. V. 444. P. 429–431.
- Rogoza T., Goginashwili A., Rodionova S., Ivanov M., Viktorovskaya O., Rubel A., Volkov K., Mironova L. Non-Mendelian determinant [ISP⁺] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 10573–10577.
- Schnabel J. The dark side of proteins // Nature. 2010. V. 464. P. 828–829.
- Si K., Lindquist S., Kandel E.R. A neuronal isoform of the *Aplysia* CPEB has prion-like properties // Cell. 2003. V. 115. P. 879–891.
- Si K., Choi Y.-B., White-Grindley E., Majumdar A., Kandel E.R. *Aplysia* CPEB can form prion-like multimers in sensory neurons that contribute to long-term facilitation // Cell. 2010. V. 140. P. 421–435.
- Ter-Avanesyan M.D., Kushnirov V.V., Dagkesamanskaya A.R., Didichenko S.A., Chernoff Yu.O., Inge-Vechtomov S.G., Smirnov V.N. Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two nonoverlapping functional regions in the encoded protein // Molec. Microbiol. 1993. V. 7. P. 683–692.
- Tuite M.F., Mundy C.R., Cox B.S. Agents that cause a high frequency of genetic change from [PSI⁺] to [PSI⁻] in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 1981. V. 98. P. 691–711.
- Vendruscolo M., Dobson C. More charges against aggregation // Nature. 2007. V. 449. P. 555.
- Volkov K., Osipov K., Valouev I., Inge-Vechtomov S., Mironova L. N-terminal extension of *Saccharomyces cerevisiae* translation termination factor eRF3 influences the suppression efficiency of sup35 mutations // FEMS Yeast Res. 2007. V. 7. P. 357–365.
- Wickner R.B. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* // Science. 1994. V. 264. P. 566–569.
- Will R.G., Alpers M.P., Dormont D., Schonberger L.B., Tateishi J. Infectious and sporadic prion diseases In: Prusiner S.B., ed. Prion biology and diseases. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1999. P. 465–507.
- Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guillec R., Inge-Vechtomov S.G., Kisselev L., Philippe M. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors eRF1 and eRF3 // The EMBO J. 1995. V. 14. P. 4065–4072.

Yeast Prions as a Model of Neurodegenerative Infectious Amyloidoses in Humans

S. G. Inge-Vechtomov

*St. Petersburg State University, Vavilov Institute of General Genetics, St. Petersburg Branch, St. Petersburg, 199034 Russia
e-mail: ingevechtomov@gmail.com*

Abstract—Several neurodegenerative diseases (so-called age-related diseases) in humans are associated with development of protein aggregates—amyloids. Prion diseases—kuru, Kreutzfeldt–Jakob and Gerstmann–Straussler–Sheinker diseases, fatal familial insomnia, etc.—are examples of infectious amyloidoses. A model system for investigation of mechanisms of amyloidogenesis and of its infectious nature had been developed as a result of yeast prion discovery. The existence of a prion network as an interaction of different prions identified in yeast is being confirmed recently as an interaction of different amyloids in humans. The potential danger of amyloidoses is conditioned by the very structure of almost all proteins containing fragments capable to be organized as β -sheets, which lead to their aggregation being exposed. Meanwhile, there are several well-defined examples of the adaptive value of amyloid aggregates: cytoplasmic incompatibility factor in *Podospora anserina*, spider silk, cytoplasmic stress granules in mammals, prion form of CPEB protein responsible for the neuron activity in *Aplysia*, etc. These facts should be taken into consideration when seeking anti-amyloid drugs. Discovery of protein inheritance in lower eukaryotes modifies our knowledge of the template principle significance in biology and adds a concept of conformational templates (II order templates) involved in reproduction of the three-dimensional structure of the supramolecular complexes in the cell.

Keywords: amyloids, prions, neurodegenerative diseases, yeast, protein inheritance

УДК 591

СТАТИСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЫСТРЫХ МЕХАНОЗАВИСИМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ДВИЖЕНИЙ В ДЕФОРМИРОВАННЫХ ЭКСПЛАНТАТАХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

© 2011 г. Т. Г. Трошина, Н. С. Глаголева, Л. В. Белоусов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

E-mail: morphogenesis@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.03.2011 г.

Окончательный вариант получен 28.03.2011 г.

Используя кадры цейтраферной микрокиносъемки, проводили компьютерный анализ искусственно деформированных (растянутых или сжатых) двойных эксплантатов (сэндвичей) крыши бластоцеля (КБс) и супраластопоральной области (СБОс) ранней гаструлы шпорцевой лягушки. На контрольных и деформированных образцах в течение первых 14 мин после вырезания измеряли скорости и углы смещений нескольких сотен клеток друг относительно друга, а также относительно неподвижных точек и осей растяжения. Обнаружено, что деформации образцов приводят к быстрой переориентации и возрастанию скоростей движений обширных клеточных масс по направлениям растяжения или перпендикулярно направлениям сжатия. Кроме того, у растянутых КБс наблюдали возрастание скоростей взаимных клеточных смещений и конвергентное схождение клеток к осям растяжения. При сравнении различных угловых секторов отмечена достоверная положительная корреляция между средними скоростями клеточных движений и количеством клеток, движущихся внутри данного сектора. Это указывает на кооперативность механозависимых клеточных движений. В целом, полученные данные указывают на важную роль механических факторов в регуляции коллективных клеточных движений.

Ключевые слова: клеточные движения, механические напряжения, кооперативность, гаструла шпорцевой лягушки.

ВВЕДЕНИЕ

Первостепенное значение для эмбриональных морфогенезов позвоночных животных имеют так называемые коллективные движения клеток — согласованные двух- и трехмерные перемещения обширных клеточных масс. Наиболее ярким примером таких движений является так называемая конвергентная интеркаляция клеток, лежащая в основе формирования осевых органов позвоночных (Keller et al., 2000, 2008). Несмотря на исследования молекулярных основ этих движений (Wallingford et al., 2002; Tahinci, Symes, 2003), факторы, определяющие их пространственную организацию, остаются неясными. Участие хемотактических механизмов, в ряде случаев эффективных для векторизации отдельных клеток, в данном случае представляется маловероятным по крайней мере по следующим причинам: (1) при коллективных движениях отсутствуют неподвижные точки, к которым могли бы быть привязаны источники хемотакторов; (2) поскольку эти движения, как уже говорилось, более чем одномерны, хемотактическая схема их регуляции выглядела бы весьма громоздкой. С другой стороны, участие механических факторов в регуляции коллективных движений выглядит, по тем же основаниям, более вероятным

(Kornikova et al., 2009). Действительно, движение клеточных пластов, обладающих упругостью, будет неизбежно и регулярным образом изменять в них поля механических напряжений, что может влиять на последующие деформации пластов. При этом механические напряжения будут автоматически порождать двух- и трехмерные деформации типа Пуассоновых (растяжение вдоль и сжатие поперек действия силы).

Ранее (Belousov et al., 2000) было показано, что эмбриональные клетки могут двигаться вверх по направлению градиентов механических напряжений (тензотаксис). Данная работа развивает и уточняет эти данные, переводя их на количественную основу. В ней использована оригинальная компьютерная программа, позволившая анализировать быстрые реакции нескольких десятков клеток каждого образца на его деформацию внешней силой. При этом были исследованы образцы с различными презумптивными значениями и потенциалами к клеточной дифференцировке.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изготовление экспериментальных образцов. На стадии 10 по Nieuwkoop & Faber (1956) изготавливали

сэндвичи (двойные эксплантаты, сращенные внутренними сторонами) из квадратных участков крыши бластоцеля (КБс) и из супрабластопоральной области (СБОс). Сэндвичи имели примерно 900 мкм в поперечнике. Сэндвичи помещали на агарозный субстрат и вводили в их противоположные края по одной (СБОс) или по две (КБс) стеклянные иглы толщиной 40–50 микрон. После этого иглу или пару игл с одной стороны сдвигали, растягивая или, напротив, сжимая сэндвич. СБОс растягивали или сжимали в направлении, поперечном переднезадней оси зародыша. КБс только растягивали, причем в произвольном относительно оси зародыша направлении (как показано Глаголевой с соавт. (2003), реакции КБс на растяжение не зависели от его направления). Растяжение проводили в два приема (подробности см. Velousov et al., 2000), после чего положение игл фиксировали. В результате растяжения расстояние между иглами увеличивалось на 110–130% для КБс и на 60–95% для СБОс. При сжатии СБОс их поперечник уменьшался на 5–10%. В качестве контролей брали сэндвичи, в которые иглы вводили, но оставляли неподвижными. Все операции проводили в растворе MMR (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4).

Микрокиносъемка. Немедленно после прекращения деформации начинали цейтраферную микрокиносъемку опытных и контрольных образцов при фокусировке на поверхности сэндвичей (эпифлюоресценция). Использовали установку Digital Camera for microscope DCM130, съемка велась под бинокулярным микроскопом Olympus SZX16, частота кадров: 1 кадр в минуту, длительность непрерывной съемки 14 мин. Всего было заснято и обработано 8 контрольных и 8 растянутых КБс, 10 контрольных, 7 растянутых и 7 сжатых СБОс. На основе микрокиносъемки составляли карты движения избранных клеток, на которых откладывали векторы их движений за два последовательных временных периода: 0–5 мин и 5–14 мин после прекращения деформаций образцов.

Обработка изображений и типы измерений. Серии изображений обрабатывали с помощью программ на языке Python для Windows XP OS. Первичное прослеживание движения клеток осуществляли с использованием алгоритма rугamid Lucas-Kanade optical flow библиотеки компьютерного зрения OpenCV. Составляли векторные карты клеточных движений и измеряли следующие показатели:

1. Скорости и углы смещений некоторого произвольного набора клеток относительно другой клетки данного образца. Эти величины обозначали как взаимные смещения клеток ($V_{вз}$). Увеличение расстояний между клетками называли дивергенцией, а уменьшение расстояний – конвергенцией. Результаты для отдельных пар клеток

представляли в виде точек на круговых диаграммах (в пределах 0–180°), где линейная координата представляла собой $V_{вз}$ (μm/мин), а угловая – угол (градусы), под которым смещались клетки, причем дивергентные движения считались положительными, а конвергентные – отрицательными.

2. Векторы смещений клеток деформированных и контрольных образцов относительно неподвижных точек (скорости направленных движений – $V_{напр}$). Составляли векторные карты клеточных движений и представляли результаты в виде круговых диаграмм в диапазоне 0–360°, причем ось растяжения/сжатия образца соответствовала направлению 0–180° (0° был обращен к сдвигаемым иглам), тогда как направление 90–270° совпадало с передне-задней осью зародыша (270° – его задний полюс).

2. Показатели “массопереноса” клеток в пределах данного углового сектора, т.е. произведение количества N клеток, движущихся внутри сектора, на их средние скорости. Таким образом, массоперенос $M = N \times V_{напр}$. Его также представляли в круговых диаграммах. Особое внимание обращали на корреляции между N и $V_{напр}$.

Следующие показатели измеряли только на КБс:

3. Проекция $V_{напр}$ на перпендикуляры к оси растяжения образца или соответствующей ей оси контрольных образцов. Этот показатель оценивает конвергенцию клеток к оси образца.

4. Скорости движения клеток вдоль оси растяжения в зависимости от расстояния данной клетки до основания растягивающей иглы или до средней точки между двумя растягивающими иглами. Движение клетки в сторону источника растяжения считали положительным, удаление от него – отрицательным.

5. Зависимости абсолютных значений $V_{напр}$ от растяжения d образцов, принимая $d = (L_1 - L_0)/L_0$, где L_0 – исходное расстояние между иглами, а L_1 – окончательное расстояние между иглами того же образца. Их определяли отдельно для периодов 0–5 мин и 5–14 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Обзор векторных карт клеточных движений

Уже беглый взгляд на карты (рис. 1А–1Е) позволяет обнаружить качественные различия между механозависимыми движениями клеток КБс и СБОс. Тогда как в контрольных КБс все клетки малоподвижны (рис. 1А), в контрольных СБОс наблюдается их массовое смещение к заднему концу образца, т.е. в направлении нормальных гастрюляционных движений. Кроме того, обращает на себя внимание “обтекание” клетками одной из неподвижных игл (рис. 1В).

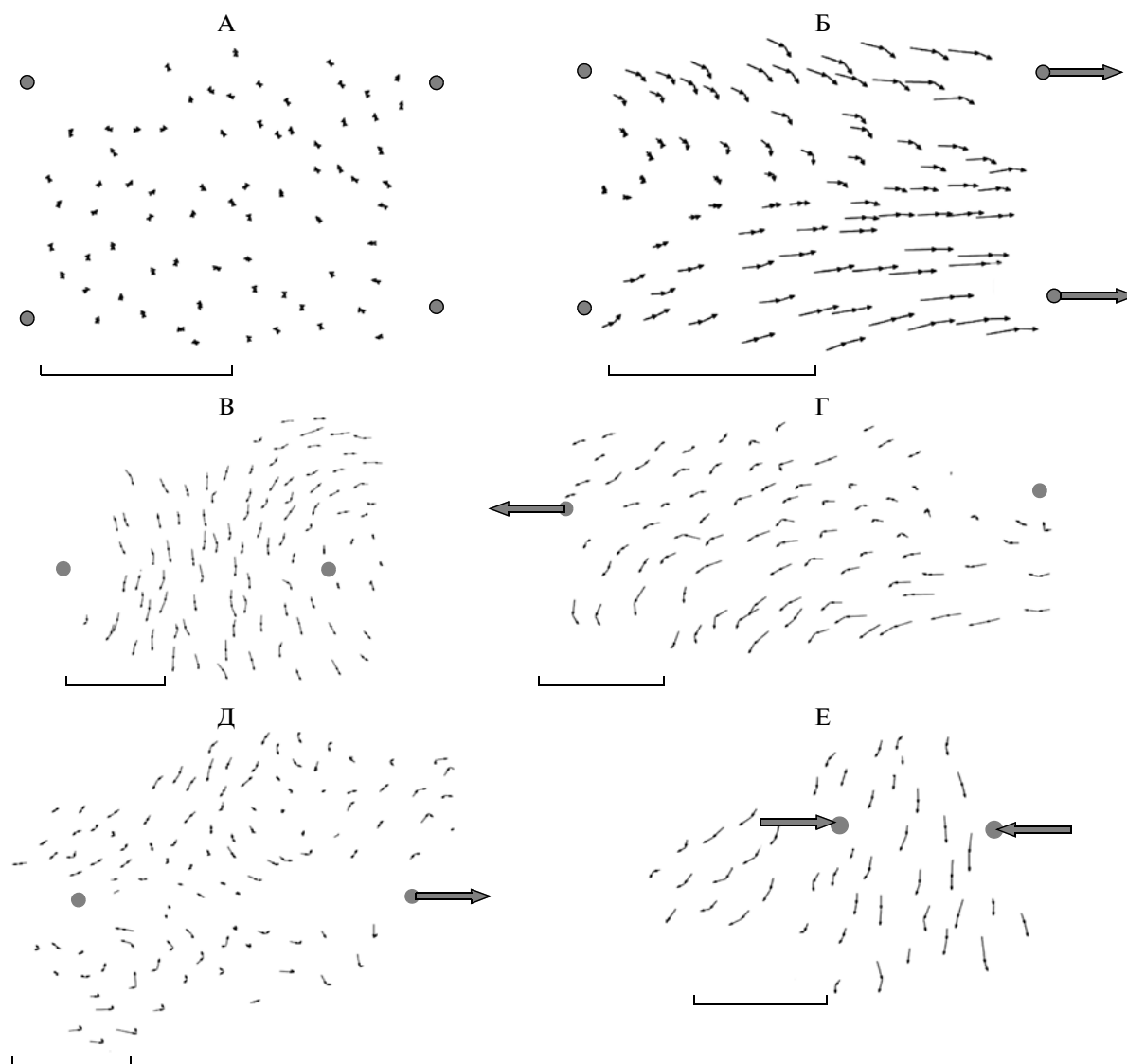


Рис. 1. Векторы движений клеток эпидермиса контрольных (А, В), растянутых (Б, Г, Д) и сжатого (Е) образца. А, Б: эксплантаты крыши бластоцеля (КБс). В–Е: эксплантаты супраластополярной области (СБО). Кружки обозначают иглы, стрелки – направления растяжения (Б, Г) или сжатия (Е). Масштабные линейки на А, Б – 500 μm ; на В–Е – 250 μm . На В–Е передне-заднее относительно оси зародыша направление – сверху вниз.

На растянутых образцах эти различия более отчетливы. В КБс четко выделяются два клеточных потока: один – к источнику растягивающей силы, другой – перпендикулярный к первому потоку и направленный в его сторону (рис. 1Б). Между тем, в растянутых СБОс либо сохраняется, хотя и в ослабленной форме, тенденция движения к заднему полюсу (рис. 1Г), либо возникают сложные вихри (рис. 1Д). В сжатых образцах почти все клетки двигались к заднему полюсу перпендикулярно направлению сжатия (рис. 1Е).

2. Взаимные смещения клеток (табл. 1)

Как видно из табл. 1, в контрольных КБс средние значения скоростей дивергентных и конвергентных взаимных смещений клеток приблизи-

тельно равны между собой и существенно ниже средних скоростей соответственных смещений во всех остальных группах образцов. Растяжение КБс повышало средние $V_{\text{вз}}$ более чем вдвое и уменьшало средние углы между ними, т.е. делало клеточные движения более параллельными (табл. 1; ср. рис. 2А и 2Б). Последнее наблюдалось и в сжатых образцах СБОс (рис. 2Д). С другой стороны, в растянутых СБОс существенно возрастал процент клеток, расходящихся под углами, большими 60° (ср. рис. 2В и 2Г). Во всех типах образцов средние скорости дивергентных смещений были выше, чем у конвергентных, т.е. расстояния между клетками в основном возрастали, кроме того, во всех сериях, кроме растянутых КБс, выше была и доля расходящихся клеток.

Таблица 1. Средние скорости (μм/мин) и средние углы α дивергентных и конвергентных взаимных смещений клеток в разных группах образцов. В скобках – число измерений

	Дивергентные смещения		Конвергентные смещения	
	Ср. скорости	Ср. углы, °	Ср. скорости	Ср. углы, °
КБс контрольные	0.13 ± 0.11 (577)	21	0.12 ± 0.10 (476)	21
КБс растянутые	0.31 ± 0.24 (642)	10	0.25 ± 0.19 (709)	10
СБО контрольные	0.33 ± 0.28 (1416)	21	0.20 ± 0.22 (712)	15
СБО растянутые	0.32 ± 0.24 (882)	22	0.21 ± 0.25 (494)	20
СБО сжатые	0.33 ± 0.26 (804)	12.7	0.19 ± 0.22 (286)	14.5

Таблица 2. Средние скорости клеточных движений относительно неподвижных точек за первые 5 мин в растянутых и контрольных образцах внутри 20-градусных секторов, совпадающих с направлением растяжения и перпендикулярных им. Выделены значения скоростей внутри секторов, соответствующих направлениям растяжения

Границы секторов	СБОс растянутые	СБОс контроли	КБс растянутые	КБс контроли
350–10°	6.07 ± 3.14 (n = 48)	4.40 ± 2.27 (n = 13)	6.91 ± 3.28 (n = 184)	1.62 ± 1.16 (n = 24)
80–100°	2.07 ± 1.13 (n = 9)	1.80 ± 0.42 (n = 10)	2.11 ± 1.07 (n = 7)	0.70 ± 0.24 (n = 17)
170–190°	6.13 ± 3.13 (n = 67)	3.44 ± 1.22 (n = 28)	7.67 ± 3.30 (n = 17)	1.06 ± 0.62 (n = 15)
260–280°	1.71 ± 0.88 (n = 5)	4.05 ± 1.34 (n = 84)	4.58 ± 1.51 (n = 14)	1.72 ± 0.62 (n = 33)

3. Движения клеток относительно неподвижных точек

3.1. Угловые распределения V_{напр} для СБОс и КБс

Как видно из рис. 3, деформации образцов обоих типов приводили к быстрому и резкому перераспределению максимальных скоростей V_{напр} в направлениях растяжения или перпендикулярно

направлениям сжатия (ср. А, Б с В, Г, Е, Ж с З, И с К, Л). Разности по V_{напр} между секторами, близкими к осям растяжения, и перпендикулярными к ним секторами высоко достоверны (табл. 2). Между тем, в контрольных образцах разности V_{напр} между взаимно перпендикулярными секторами различались между собой недостоверно и были достоверно меньше таковых в растянутых или сжа-

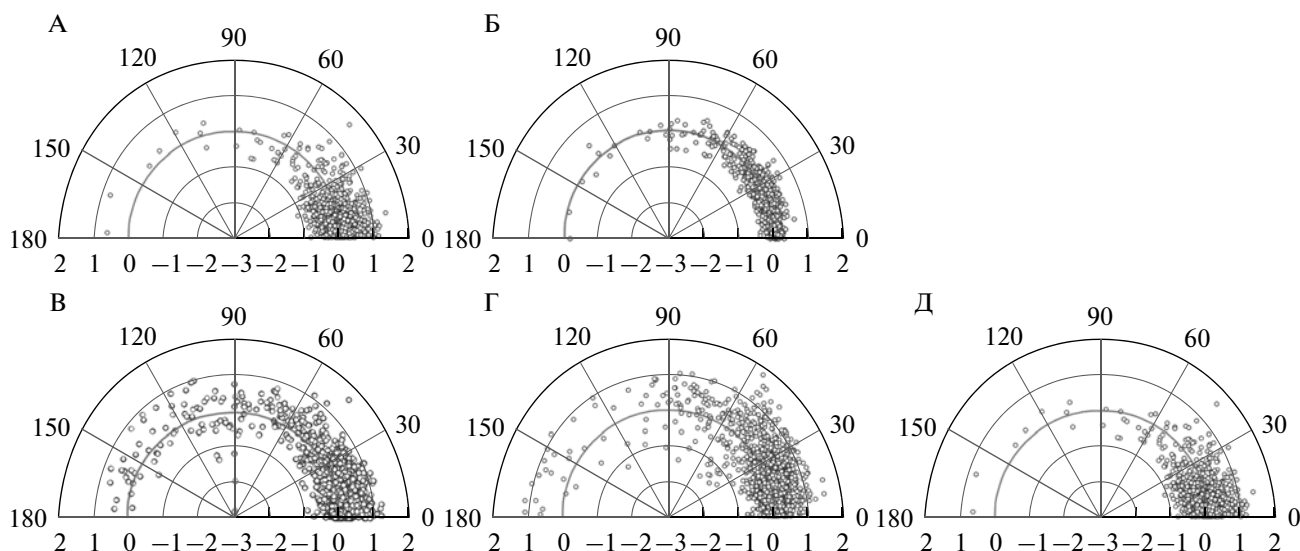


Рис. 2. Круговые диаграммы взаимных смещений клеток. А, Б: данные соответственно по контрольным и растянутым образцам КБс. В: растянутые, Г: контрольные, Д: сжатые образцы СБОс. Положительные радиальные координаты соответствуют дивергентным, отрицательные координаты – конвергентным взаимным смещениям клеток.

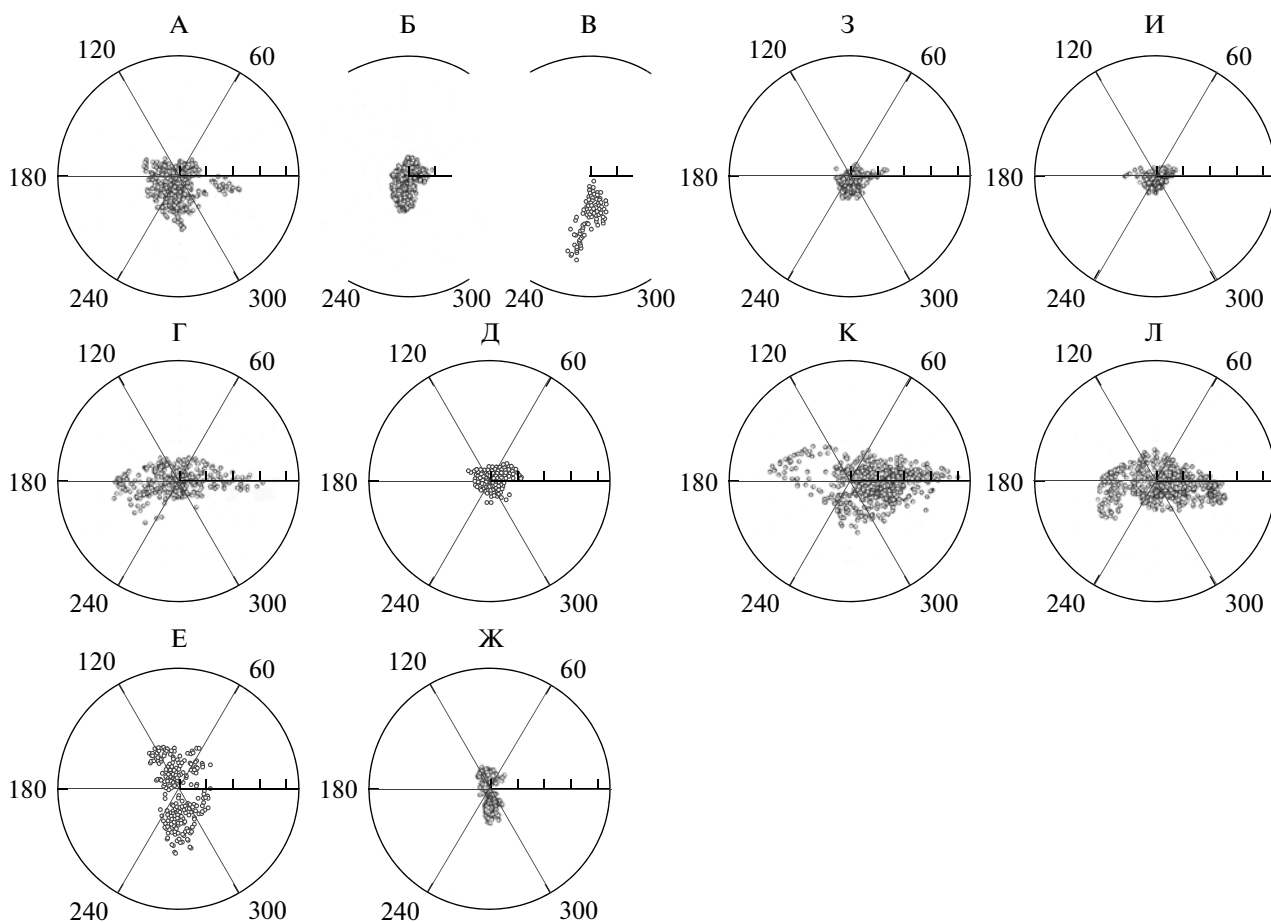


Рис. 3. Угловые диаграммы $V_{\text{напр}}$. Направление растяжения или сжатия горизонтальное, тянущие иглы справа. А, Б – контрольные, В – интактные, Г, Д – растянутые, Е, Ж – сжатые СБОс, З, И – контрольные, К, Л – растянутые КБс. Кадры А, Г, Е, З, К соответствуют периодам 0–5 мин, кадры Б, Д, Ж, И, Л – периодам 6–15 мин для образцов, представленных слева.

тых образцах. Проводили также оценку различий между контрольными и опытными СБОс, сравнивая разности Δ между $V_{\text{напр}}$ внутри суммы секторов ($0-20^\circ + 180-200^\circ$) (направления оси тяги) с $V_{\text{напр}}$ внутри сектора $260-300^\circ$ (характерное направление движений клеток контрольных СБОс к заднему полюсу). Получили

$$\Delta (\text{контрольные образцы}) = -85 \pm 402 (n = 29)$$

$$\Delta (\text{растянутые образцы}) = 229 \pm 508 (n = 20)$$

$$\Delta (\text{сжатые образцы}) = -158 \pm 318 (n = 21)$$

Различия между Δ контрольных и растянутых образцов, а также между Δ контрольных и сжатых образцов были высоко достоверны.

3.2. Зависимость $V_{\text{напр}}$ от степени растяжения образцов

Средние значения $V_{\text{напр}}$, измеренные на КБс, четко коррелировали с величиной растяжения образцов ($r = 0.78$ для периода 0–6 мин и $r = 0.57$ для

периода 6–15 мин). Однако наблюдался достаточно высокий порог реакции на растяжение: $V_{\text{напр}}$ достоверно возросло лишь при растяжении в два раза для периода 0–6 мин и при еще более сильном растяжении для последующего периода (рис. 4А, 4Б). Зависимости скоростей от растяжения лучше всего аппроксимировались не линейной или показательной, а степенной (параболической) функцией.

3.3. Угловые распределения массопереносов клеток

Угловые распределения массопереносов M в общем соответствуют угловым распределениям $V_{\text{напр}}$, однако имеются и некоторые различия (рис. 5). А именно, в КБс массоперенос в сторону сдвинутых игл (на рис. 3 направо) значительно превышает массоперенос в противоположную сторону, хотя различие между $V_{\text{напр}}$ по этим двум направлениям незначительно. В сжатых СБОс, в отличие от $V_{\text{напр}}$, резко преобладает массоперенос к

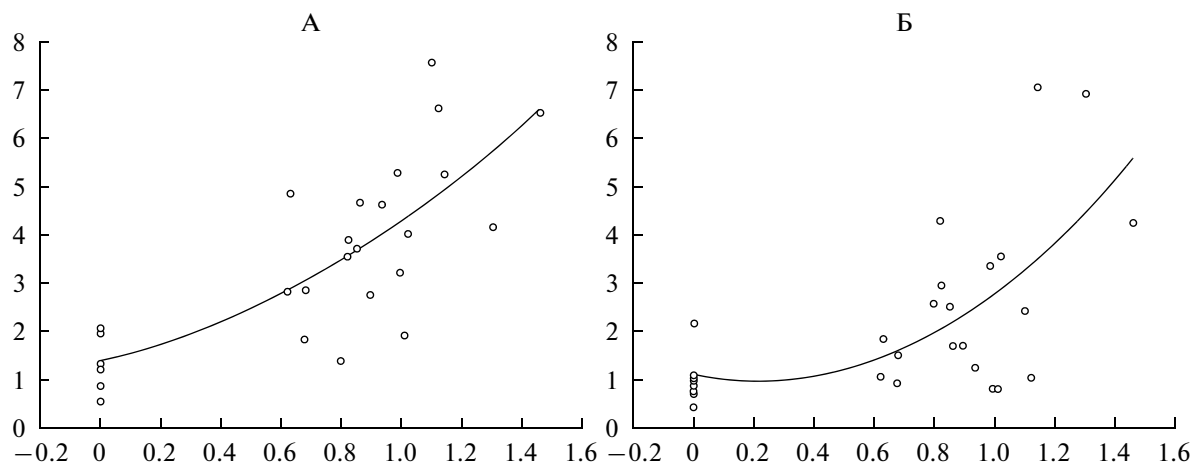


Рис. 4. Зависимости $V_{\text{напр}}$ от степени растяжения КБс за период 0–6 мин (А) и 6–15 мин (Б). Абсцисса: растяжение, %. Ордината: средние значения $V_{\text{напр}}$ для данного образца, $\mu\text{м}/\text{мин}$.

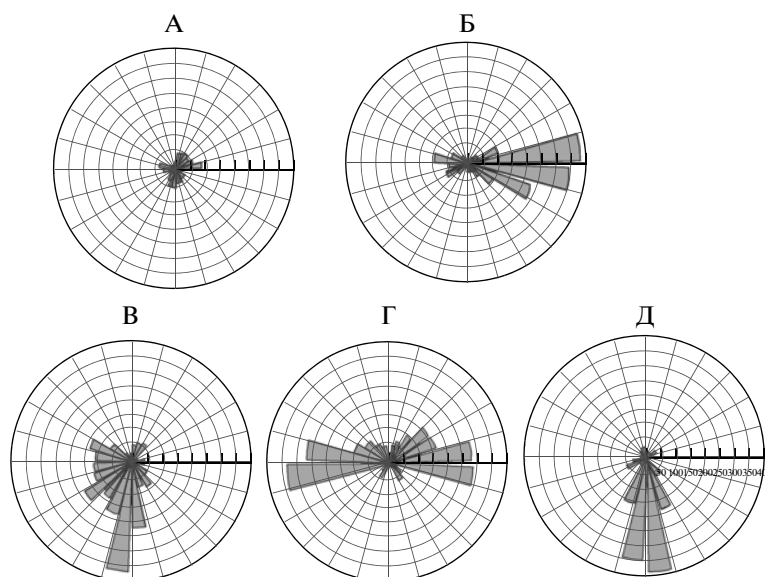


Рис. 5. Угловые диаграммы массопереносов клеток внутри секторов по 15° для периодов 0–15 мин после фиксации образцов. А: в контрольных, Б: в растянутых КБс; В: в контрольных, Г: в растянутых; Д: в сжатых СБОс. Масштаб диаграммы А в 3 раза крупнее, нежели Б, диаграммы Д в 2 раза крупнее, нежели В, Г. У диаграмм В, Г масштабы одинаковые.

заднему полюсу. Отметим, что по признаку массопереноса угловая поляризация в растянутых и сжатых образцах значительно превышает таковую по признаку средних скоростей. Например, если в растянутых образцах обоих типов $V_{\text{напр}}$ в направлении растяжения превышает таковую в перпендикулярном направлении в 3–3.5 раза (табл. 2), то по признаку массопереноса аналогичные отношения для СБОс составляют 6.8–7.7 раза, а для КБс превышают 33! Это обстоятельство связано с наличием достоверных корреляций между величинами N и $V_{\text{напр}}$, что не тривиально (см. Обсуждение). Если

брать для измерений узкие угловые секторы внутри областей с мощными клеточными потоками, то достоверные корреляции между величинами N и $V_{\text{напр}}$ обнаруживаются во всех типах образцов за исключением контрольных КБс (табл. 3).

Особенно наглядны эти корреляции на угловых развертках (рис. 6). Видно, что в областях с более редким расположением движущихся клеток их скорости существенно ниже, тогда как при переходе к областям с более густым расположением они постепенно возрастают.

Таблица 3. Корреляции $N/V_{\text{напр}}$ внутри 10-градусных угловых секторов, соответствующих угловым диапазонам доминирующих клеточных потоков. В измерения включены все образцы данных серий. Все корреляции достоверны

Типы образцов и угловые диапазоны	Коэффициенты корреляций $N/V_{\text{напр}}$
СБОс контроля, 240–300°	+0.84
СБОс растянутые, 0–60°	+0.83
СБОс сжатые, 240–300°	+0.87
КБс контроля, 0–200°	+0.58
КБс растянутые, 0–200°	+0.86

Таблица 4. Дивергенция и конвергенция клеток (средние скорости за 15 мин, $\mu\text{м}/\text{мин}$) в различных сериях СБОс

	Дивергенция	Конвергенция
СБОс контроль	22.9 ± 21.7 ($n=229$)	25.4 ± 21.0 ($n=234$)
СБОс растянутые	12.6 ± 9.1 ($n=171$)	13.2 ± 9.1 ($n=201$)
СБОс сжатые	35.4 ± 21.3 ($n=136$)	24.6 ± 17.8 ($n=151$)

4. Оценка конвергенции клеток к оси растяжения образцов

В растянутых КБс наблюдается высоко достоверная конвергенция клеток к оси растяжения (среднее расстояние, пройденное клетками в данном направлении, за 14 мин составляет $20.89 \pm$

$\pm 17.63 \mu\text{м}$; $n = 639$), тогда как в контрольных образцах соответственная величина недостоверно отличается от нулевой ($0.96 \pm -9.17 \mu\text{м}$; $n = 384$). Средняя скорость конвергенции в растянутых КБс составляет $1.4 \mu\text{м}/\text{мин}$. В растянутых образцах СБОс конвергенции к оси растяжения не наблюдается, однако скорость потока клеток, перпендикулярного оси растяжения, у них достоверно меньше (примерно вдвое), нежели в контрольных и особенно в сжатых эксплантатах. Кроме того, в сжатых образцах дивергенция (уход клеток от оси сжатия) достоверно превышает соответствующие величины в двух других сериях (табл. 4).

5. Зависимости скоростей смещений клеток КБс от их расстояний до средней точки между двумя растягивающими иглами (условно: до точки приложения силы)

В большинстве растянутых КБс (в противоположность контрольным образцам) наблюдали четкую обратную корреляцию между величиной сдвига данной клетки к точке приложения силы и расстоянием клетки до этой точки: чем меньше расстояние, тем больше сдвиг. Кроме того, наблюдали корреляцию между графиками сдвигов за оба временных периода (табл. 5). Вместе с тем, сдвиги за второй период были меньшими, чем за первый, и часто были сдвинуты в область отрицательных значений (клетки двигались прочь от точки приложения силы) (рис. 7).

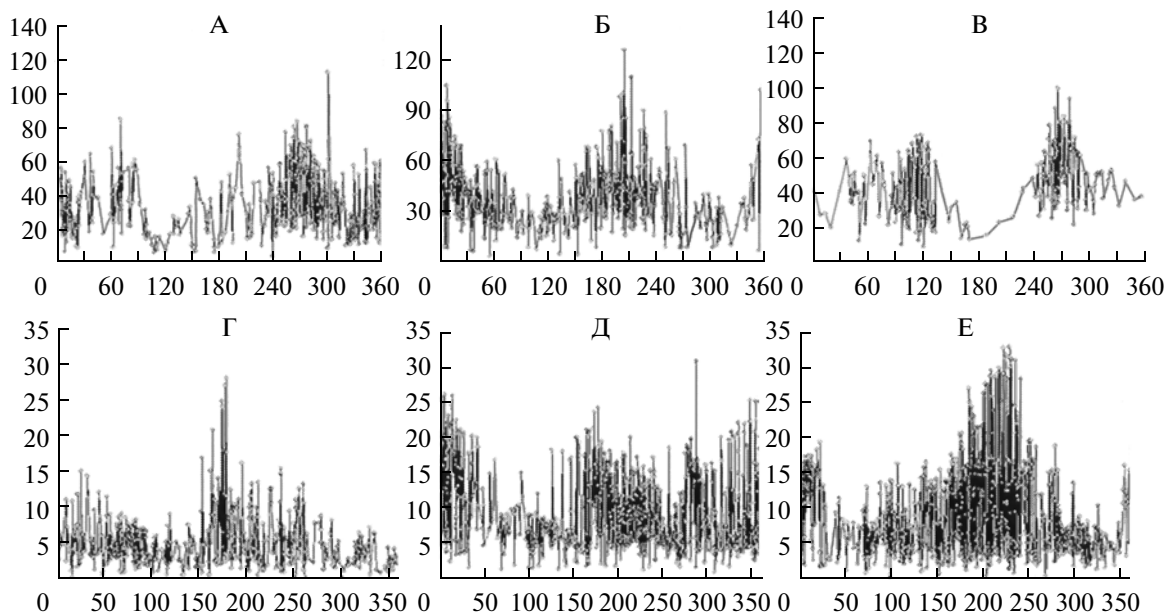


Рис. 6. Угловые развертки по полному набору образцов данных серий опытов, демонстрирующие массопереносы клеток. Абсциссы: углы в диапазоне 0–360°. Ординаты: $V_{\text{напр}}$. А: контрольные, Б: растянутые, В: сжатые СБОс, Г: контрольные, Д: растянутые в течение 5 мин, Е: растянутые в течение 16 мин КБс.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной результат данной работы, относящийся к образцам обоих типов, состоит в том, что сразу же после закрепления эксплантата эмбриональной ткани в растянутом состоянии клетки эпизектодермы начинают двигаться вдоль направления приложенной силы (или — при растяжении двумя иглами — вдоль равнодействующей этих сил) с достоверно более высокими скоростями, нежели во всех других направлениях. Кроме того, регистрируется практически линейная прямая корреляция между средней скоростью и количеством клеток, движущихся внутри некоторого углового сектора. Это соотношение не тривиально и заслуживает специального обсуждения. Чисто феноменологически оно выражается простой формулой

$$M = kN,$$

где M — средняя скорость клеток, N — их число. Поскольку по определению

$$M = \Sigma (V_{\text{напр}})/N,$$

где $\Sigma (V_{\text{напр}})$ — сумма скоростей всех клеток, движущихся внутри данного сектора,

$$\Sigma (V_{\text{напр}}) = kN^2.$$

Мы получаем, что сумма скоростей пропорциональна не количеству клеток (что было бы при независимых клеточных движениях), а квадрату их

Таблица 5. Коэффициенты корреляции между скоростями смещения клеток опытных и контрольных образцов за указанные периоды времени и их расстояниями до ближайшей точки приложения силы и между графиками скоростей смещения клеток одних и тех же образцов в последовательные периоды времени

	1–5 мин	6–15 мин	(1–5)/(6–15)
КБс растян (n = 8)	-0.67 ± 0.14	-0.74 ± 0.17	0.67 ± 0.42
КБс контр (n = 8)	0.17 ± 0.48	0.01 ± 0.65	0.34 ± 0.33

количества. Такая нелинейность свидетельствует о том, что движения клеток *кооперативны*: клетки, движущиеся под малыми углами, как бы “помогают” друг другу.

Кооперативность обеспечивает чрезвычайно мощные переносы клеточных масс в направлении растяжения (или в направлении, перпендикулярном сжатию) образцов: как уже говорилось выше, соотношения массопереносов в направлении растяжения к таковым в перпендикулярном направлении превышают аналогичные соотношения для

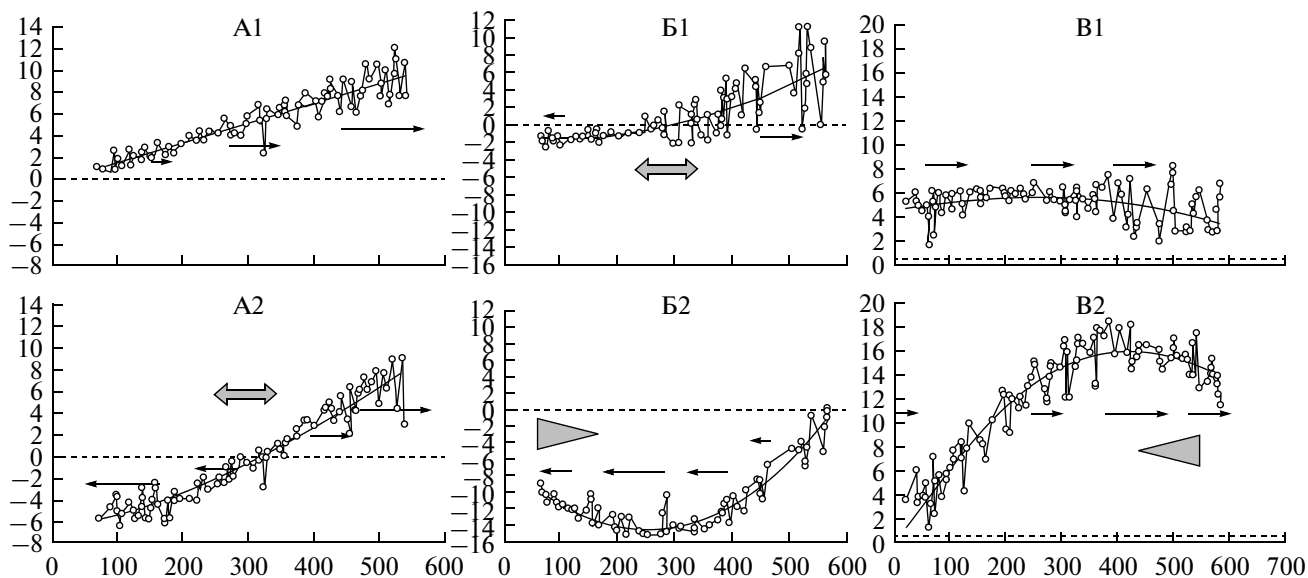


Рис. 7. Сдвиги клеток трех образцов КБс вдоль оси растяжения (ординаты) как функции их расстояний до точки приложения силы (расположена справа). Кадры А1–В1 относятся к периоду 1–5 мин, кадры А2–Е2 — для тех же образцов в период 6–15 мин. Горизонтальная линия соответствует нулевому сдвигу: значения выше этой линии (положительные) — сдвиги клеток к точке приложения силы, ниже линии (отрицательные) — сдвиги в обратную сторону. Односторонние стрелки показывают относительные величины смещений клеток, двусторонние стрелки на Б1 и А2 — зоны расхождения клеток в противоположных направлениях, треугольники на Б2, В2 указывают своими основаниями на зоны уплотнений клеточного расположения.

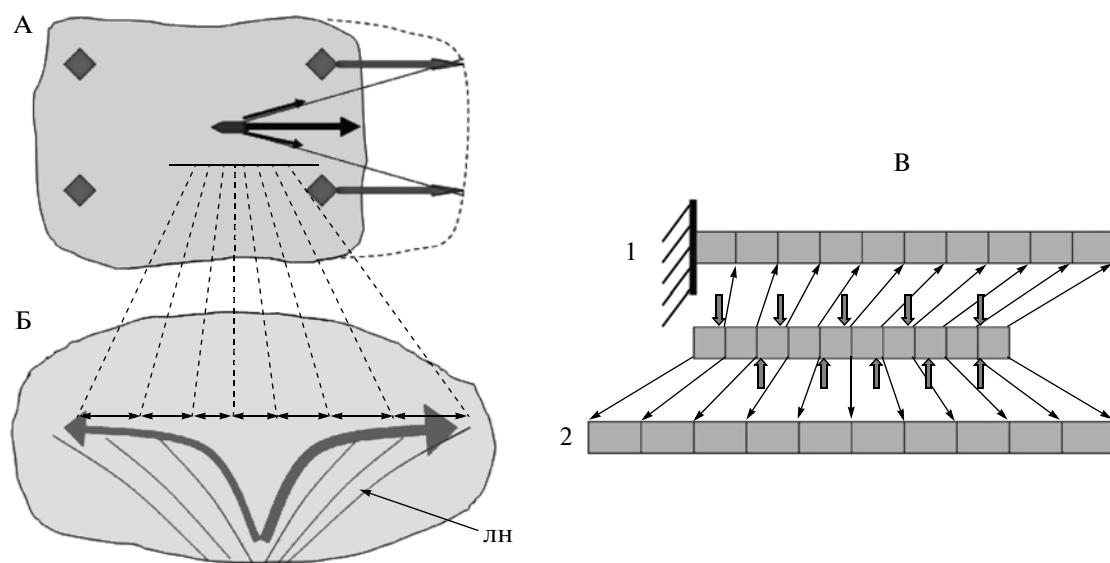


Рис. 8. Схема конвергентной интеркаляции в КБс, растянутом двумя иглами. А: схема растяжения, ромбы обозначают неподвижные иглы (слева) и сдвинутые (справа). Клетки смещаются под действием равнодействующей силы. Б: большие изогнутые стрелки – конвергенция клеток и встраивание их в осевой ряд. Двусторонние стрелки – растяжение осевого ряда клеток в результате встраивания; лн – линии натяжения. В: удлинение осевого ряда в результате встраивания при наличии жесткой опоры справа (1) и в отсутствии такой опоры (2).

контрольных образцов СБОс в 7 раз, а для КБс – в 33 раза. Из приведенных выше данных следует, что длина образцов в направлении их растяжения возрастает не более, чем в 2.5 раза (обычно – в 1.5–2 раза), и значит в отсутствие массопереносов примерно во столько же раз должна уменьшиться клеточная плотность в этом направлении. Мы видим, что при самых грубых оценках массопереносы существенно перекрывают это уменьшение, то есть заметно повышают клеточную плотность в направлении растяжения по сравнению с исходной.

Дальнейшее уточнение этой оценки проведем на образцах КБс, у которых реакции на растяжение вообще более сильные и определенные, нежели у СБОс (рис. 8).

Как уже говорилось, у КБс регистрируется достоверная конвергенция клеток к оси растяжения. Конвергенция, несомненно, является одной из основных компонент реакции на растяжение и в большой степени ответственна за массопереносы вдоль оси тяги (рис. 8Б). Последние создают поля натяжений (рис. 8Б, лн), вовлекающие в конвергенцию новый клеточный материал. Рассмотрим связь конвергенции с растяжением образца вдоль оси его растяжения. Как уже говорилось, между скоростью V смещения данной клетки вдоль оси растяжения и ее расстоянием L до точки приложения силы существует достоверная обратная корреляция, которая в большинстве случаев близка к

линейной (рис. 7, А1, А2), хотя наблюдаются и существенные отклонения (рис. 7, Б2, В2), а также движение прочь от ближайшего источника силы (рис. 7, часть графика А2, Б2). Как можно согласовать эти соотношения с процессом конвергенции клеток к осевой линии?

Прежде всего заметим, что обратная пропорциональность между значениями V и L вовсе не означает, что клетки активно мигрируют к ближайшему источнику силы – такому предположению противоречат упоминавшиеся выше движения клеток от источника. Напротив, все описанные типы движений клеток относительно источников силы можно объяснить, если принять, что плотно упакованные клетки осевого ряда расталкиваются благодаря конвергентной интеркаляции более латеральных клеток в этот ряд. Тогда, если на конце ряда, удаленном от источника силы, имеется жесткая точка опоры, весь ряд будет смещаться в сторону источника силы, что проявится в линейной корреляции в положительной области, то есть все клетки будут двигаться в сторону ближайшего источника (рис. 7, А1, рис. 8, В1). Если такой опоры нет, возможно смещение как в сторону ближайшего источника, так и от него (рис. 7, А2, Б1, двусторонние стрелки; рис. 8, Б2), причем нулевой точкой будет та, где конвергентная интеркаляция начинается и/или протекает более интенсивно. Приблизительно постоянные значения V вдоль L

(рис. 6, В1) указывают на то, что встраивание клеток произошло только в крайне левом участке ряда. Более сложные, нелинейные зависимости V от L отражают неоднородные распределения интенсивностей встраивания, в результате чего могут возникнуть зоны более плотного клеточного расположения (рис. 6, Б2, В2, треугольники). Следует обратить внимание также на более локальные неравномерности по V (например, правые части графиков Б1 и В1), которые тоже могут приводить к неоднородной плотности клеточного расположения.

Дадим следующую грубую оценку растяжения осевого ряда клеток под действием конвергентной интеркаляции. Принимая площадь клетки равной $10 \times 10 \mu\text{m}$, получаем, что при скорости конвергенции $\approx 20 \mu\text{m}/14$ мин в каждом месте ряда, где конвергенция происходит, за этот период времени встраивается несколько более одной клетки. Если (что следует из приведенных данных) в большинстве случаев конвергентная интеркаляция происходит по всей длине ряда, то последний за этот период времени удлинится более, чем вдвое, т.е. примерно настолько, насколько был растянут образец под действием внешней силы. Мы видим, что интенсивность конвергентной интеркаляции по порядку величин достаточна, чтобы восстановить исходные значения клеточной плотности.

Другие важные особенности реакции КБс на растяжение таковы: (1) более чем двукратное повышение $V_{\text{вз}}$, т.е. ускорение не только направленных клеточных движений, но и ненаправленного “перемешивания” клеток; (2) нелинейное (параболическое) возрастание $V_{\text{напр}}$. Возможно, что обе реакции взаимосвязаны, указывая на существенные изменения нормы реакций ткани под действием внешней силы.

Обращаясь теперь к СБОс, нетрудно видеть, что основные механозависимые реакции (возрастание скоростей клеточных смещений, массоперенос по направлению тяги) хотя и присутствуют, но выражены существенно слабее, нежели в КБс. В частности, отсутствует конвергенция клеток к оси растяжения. Мы это объясняем тем, что в противоположность КБс, которые сами по себе лишены определенных кинетических тенденций, СБОс обладают выраженными и весьма устойчивыми тенденциями к движению клеток в передне-заднем направлении и их конвергенции к исходной продольной оси образцов (а не к оси их растяжения). Поперечное растяжение ослабляет эти тенденции, но очевидно не достаточно, чтобы заменить их на прямо противоположные. Ослабление выражается

в том, что в растянутых образцах передне-задний клеточный поток достоверно (вдвое) замедляется (табл. 5).

В противоположность КБс, растяжение СБОс не приводит к возрастанию $V_{\text{вз}}$. Это можно связать с тем, что уже в контрольных образцах данная величина равна таковой для растянутых КБс. Таким образом, высокий “коэффициент перемешивания” клеток для образцов СБО является конститутивным, тогда как в образцах КБ он индуцируется растяжением. Можно думать, что это связано с более широкими морфогенетическими и дифференцировочными потенциями СБОс, требующими клеточных перегруппировок.

В целом можно сделать вывод, что реакции эмбриональных тканей на деформации не сводятся к движениям отдельных клеток вдоль линий растяжения (или перпендикулярно сжатию), а представляют собой коллективные процессы, вовлекающие в себя практически все клетки образцов и проявляющие признаки кооперативности (нелинейности).

Работа поддержана грантом РФФИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Глаголева Н.С., Белоусов Л.В., Штейн А.А., Лучинская Н.Н. Количественное исследование региональных и стадийспецифичных реакций эмбриональных тканей шпорцевой лягушки на механическую нагрузку // Онтогенез. 2003. Т. 34. С. 292–300.
- Belousov L.V., Louchinskaia N.N., Stein A.A. Tension-dependent collective cell movements in the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos // Dev. Genes. Evol. 2000. V. 210. P. 92–104.
- Keller R.L., Davidson A., Edlund T., Elul M., Shook D., Skoglund P. Mechanisms of convergence and extension by cellintercalation // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2000. V. 355. P. 897–922.
- Kornikova E.S., Korvin-Pavlovskaya E.G., Belousov L.V. Relocations of cell convergence sites and formation of pharyngula-like shapes in mechanically relaxed *Xenopus embryos* // Development, Genes and Evolution. 2009. V. 219. P. 1–10.
- Keller R., Shook D., Skoglund P. The forces that shape embryos: physical aspects of convergent extension by cell intercalation // Phys Biol. 2008. Apr 10. 5(1). P. 015007.
- Nieuwkoop P.D., Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland Publ. 1956.
- Wallingford J.B., Fraser S.E., Harland R.M. Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development // Dev. Cell. 2002. 2(6). P. 695–706.
- Tahinci E., Symes K. Distinct functions of Rho and Rac are required for convergent extension during *Xenopus gastrulation* // Dev. Biol. 2003. № 15. V. 259(2). P. 318–35.

Statistical Study of Rapid Mechanodependent Cell Movements in Deformed Explants of African Clawed Frog *Xenopus laevis* Embryonic Tissues

T. G. Troshina, N. S. Glagoleva, and L. V. Belousov

Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: morphogenesis@yandex.ru

Abstract—Computer analysis of artificially deformed (stretched or compressed) double explants (sandwiches) of the blastocoel roof (BRs) and suprablastoporal region (SBRs) of African clawed frog *Xenopus laevis* early gastrula has been performed using frames of time-lapse microfilming. During the first 14 min after cutting off, the velocities and displacement angles of several hundreds of cells relative to one another, as well as to fixed points and the extension axis, were measured in the control and deformed samples. It has been found that the deformation of samples leads to a rapid reorientation of large cell masses and increase in the velocities of movements along the extension axes or perpendicularly to the compression axes. In addition, an increase in the velocities of mutual cell displacements in the stretched BRs and cell convergence to the extension axes have been observed. Comparison of different angular sectors demonstrates a statistically significant positive correlation between the mean velocities of cell movements and the number of cells moving within an individual sector. This suggests cooperativity of mechanodependent cell movements. In general, these results demonstrate an important role of mechanical factors in regulation of collective cell movements.

Keywords: cell movements, mechanical tensions, cooperativity, *Xenopus laevis* gastrula

УДК 581

СТИМУЛЯЦИЯ ДЕЛЕНИЙ КЛЕТОК ПОКОЯЩЕГОСЯ ЦЕНТРА В ОТРЕЗАННЫХ КОНЧИКАХ КОРНЕЙ

© 2011 г. В. Б. Иванов, Е. И. Быстрова, М. М. Месенко, Л. М. Котова, А. А. Котов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

117276, Москва, ул. Ботаническая, д. 33

E-mail: ivanov_yb@mail.ru

Поступила в редакцию 13.12.2010 г.

Окончательный вариант получен 11.02.2011 г.

В статье описана активация делений клеток покоящегося центра в отрезанных кончиках корней, выдерживаемых на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Это явление наблюдалось у корней 8 из 14 изученных сортов кукурузы и не наблюдалось в отрезках корней арабидопсиса. Характер распределения делений в меристеме существенно варьирует в корнях разных проростков в одной и той же партии проростков и в корнях проростков разных сортов кукурузы. Открывание меристемы наблюдалось при отрезании как маленьких кусочков корней (до 3 мм), так и целых корней. ИУК (10^{-6} – 10^{-8} М) и сахароза (2%) не предотвращали открывание меристемы. Полученные данные показывают, что покоящееся состояние клеток покоящегося центра поддерживается системой межклеточных и межорганых взаимодействий.

Ключевые слова: корень, меристема, покоящийся центр, ствольные клетки.

Растущая часть корня состоит из меристемы, где сосредоточены деления клеток, и зоны растяжения, где они за счет быстрого роста достигают окончательной длины. Небольшая апикальная группа клеток меристемы резко отличается от остальных клеток. Они делятся примерно в 8–10 раз реже большинства клеток, слабо базофильны, у них мелкие ядрышки, замедлены синтезы белков и РНК. По этим признакам эта группа клеток была названа Clowes (1956) “покоящимся центром”. Он найден во всех корнях, за исключением корней с очень коротким периодом роста, например, некоторых кактусов (Rodriguez-Rodriguez et al., 2003). Изучению покоящегося центра посвящена большая литература, которую невозможно даже кратко рассмотреть в рамках этой статьи. Однако до сих пор неясно, какое функциональное значение имеют клетки покоящегося центра и какие механизмы определяют его образование на ранних стадиях развития корня и дальнейшее поддержание.

Одним из подходов к решению этой проблемы является анализ изменения клеток покоящегося центра и окружающих его клеток при разных воздействиях. Clowes (1963) показал, что после радиоактивного облучения корней в не слишком высоких дозах клетки покоящегося центра начинают активно делиться, тогда как деления большинства в норме активно делящихся клеток меристемы блокируются. Деления клеток покояще-

гося центра приводят к восстановлению меристемы и возобновлению нормального роста корня. Аналогичное явление наблюдалось после выдерживания корней проростков кукурузы при низких положительных температурах (Clowes, Stewart, 1967; Barlow, Rathfelder, 1985). После переноса корней в нормальные условия деления клеток покоящегося центра активизировались, а деления большинства меристематических клеток тормозились. В наших опытах (Нестерова, 1989; Кожевникова и др., 2007) мы наблюдали активацию делений клеток покоящегося центра при выдерживании корней на растворах ряда токсикантов, например $Pb(NO_3)_2$, которая приводила к образованию нового чехлика взамен слущающегося после погружения корней в раствор токсиканта.

В ходе роста корней в нормальных условиях или при повышенной температуре также описаны случаи активации делений клеток покоящегося центра, что приводило к изменению структуры меристемы из закрытой в открытую (Clowes, Wadekar, 1989). Эти два типа меристемы отличаются наличием общих или отдельных инициальных клеток у разных тканей. Тип меристемы является одним из систематических признаков (Heimsch, Seago, 2008).

В этой статье описывается активация делений клеток покоящегося центра в отрезанных кончиках главных корней проростков ряда сортов кукурузы, помещенных в разные условия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проводилась с проростками кукурузы и арабидопсиса. Были изучены 13 сортов и гибридов кукурузы: Интеркрас-375, полученный из ГНУ Краснодарский НИИСХ Россельхозакадемии, и Харьковский-295 МВ, Кабардино-балкарская 38/12, Институтская, Сахарная белая K9615 и K23265, Сахарная желтая K20589 и K10828, Зубовидная белая K451 и K21518, Зубовидная желтая K18968 и 23215, Б272, Аргентина КОС, полученными из ВИР им. Н.И. Вавилова (номера указаны по коллекции ВИР). Семена трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* были получены от профессора Ben Scheres (Утрехтский университет, Голландия). Они содержали химерный ген, в котором промотор гена *WOX-5* слит с репортерным геном *GFP*. Ген *WOX-5* экспрессируется в клетках покоящегося центра и является одним из генов, активность которого необходима для формирования и поддержания покоящегося центра (Sarkar et al., 2007). В использованной конструкции экспрессия этого гена определялась по флуоресценции белка GFP, что позволяло выявлять места экспрессии гена *WOX-5*, которая наблюдается только в клетках покоящегося центра. Таким образом, по распределению флуоресценции можно выявить изменение размеров покоящегося центра и числа клеток, входящих в его состав.

Семена кукурузы стерилизовали 1% формалином в течение 20 минут и проращивали в кюветах на влажной фильтровальной бумаге в термостате при 27°C. У 2–3-дневных проростков отрезали в большинстве опытов 1-см кончики корней; в ряде опытов – целые корни или кончики длиной 5 и 3 миллиметра. Отрезанные кончики помещали на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой или растворами разных соединений в дистиллированной воде. Через 24 часа кончики корней фиксировали по Бродскому (формалин–96% спирт–ледяная уксусная кислота: 10 : 3 : 1).

Фиксированные корни заключали в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 10 микрон окрашивали двумя методами: 1) ШИК реакция с последующим подкрашиванием срезов 0.15% раствором проционового яркоголубого 4RS в 0.2% растворе Na₂CO₃ в течение 40 минут при комнатной температуре, 2) ШИК реакция, затем реакция Фельгена с последующим подкрашиванием 0.1% раствором алцианового синего 8GS в 3% уксусной кислоте в течение 30 минут при комнатной температуре.

Проростки арабидопсиса выращивали в конструкции типа “сэндвич” с предварительной стерилизацией семян смесью перекиси водорода и этилового спирта (1 : 1), стратификацией 72 ч при 4°C и с последующим проращиванием в течение 7 дней в фитотроне при +22°C с освещением 10–15 тыс. лк и режимом день/ночь: 16/8 часов.

У корней семидневных проростков отрезали 5-мм кончики, которые помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой на 24 часа. Затем корни фиксировали свежеприготовленным 4% формалином с последующей проводкой через 5 растворов с возрастающей концентрацией глицерина по 5 минут до 50% глицерина, а затем просветлялись по методу Malamy и Benfey (1997). Корни просматривали на флуоресцентном микроскопе Olympus CX41. Совмещение нескольких фотографий разных оптических срезов для получения большей глубины резкости производили с помощью программы HeliconFocus 3.10 или на конфокальном микроскопе Leica TSC SPE (Германия) при длине волны 405 нм.

Все опыты были повторены не менее двух раз. В таблице указано число центральных срезов корней, на которых обсуждаемое явление отчетливо может быть установлено.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Отрезанные кончики корней, помещенные в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу, практически прекращают рост. Их длина возрастала за 24 часа не более, чем на 2–3 мм, тогда как контрольные корни в этих условиях удлинялись на 3–40 мм. Однако в отрезанных корнях не прекращалась закладка боковых корней, примордии которых были видны уже на расстоянии 4–5 мм от кончика корня. В нормальных корнях они находятся гораздо дальше (Дубровский, Иванов, 1984). Это приближение закладок боковых корней к кончику корня обусловлено прекращением роста и наблюдалось у всех сортов. Деления клеток в основной части меристемы и в чехлике практически прекращались. В отрезанных корнях проростков сорта Интеркрас-375 делений не было уже через 12 ч. В отрезанных целиком корнях деления клеток не прекращались после 24 ч, но число их было меньше, чем в контрольных корнях.

Однако уже в первых опытах с отрезанными кончиками корней проростков кукурузы гибрида Интеркрас-375 длиной 1 см наблюдались деления клеток покоящегося центра, и в особенности самого внешнего слоя клеток, с образованием выростов, состоящих из большого числа клеток в сторону чехлика (рис. 1). У некоторых корней открывание меристемы и образование таких “выростов” в сторону чехлика наблюдалось уже через 12 ч. Степень выраженности пролиферации клеток покоящегося центра сильно варьировала в разных корнях. Аналогичное явление наблюдалось в отрезках как меньшей длины (3 и 5 мм), так и в целых корнях длиной 10–12 см, отрезанных около семени. Подобное открывание меристемы и заметное образование протуберанцев клеток из покоящегося центра в сторону чехлика не наблю-

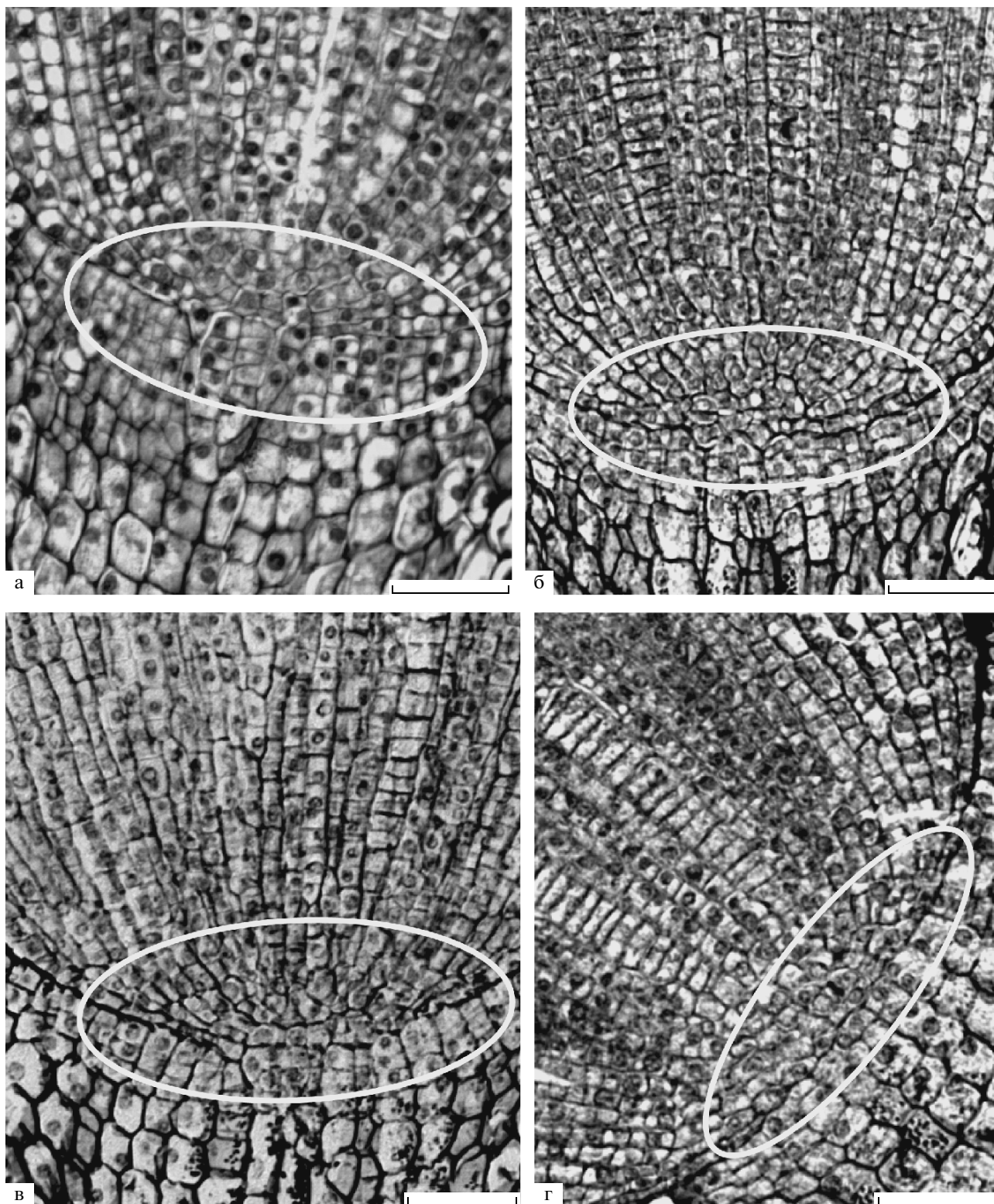
Перестройка меристемы из закрытой в открытую через 24 часа после изоляции корней (в скобках указано число корней с открытой меристемой от общего числа корней)

Сорт кукурузы	Меристема открыта			Меристема закрыта практически у всех корней
	Практически у всех корней	Не у всех корней		
	Активация делений многих клеток покоящегося центра (образование "выростов" в сторону чехлика)	Активация делений единичных клеток покоящегося центра		
Интеркрас-375	(18 из 18)			
Харьковский 295МВ		(6 из 13)		
Сахарная белая К9615		(7 из 13)		
Зубовидная белая К21518		(8 из 10)		
Зубовидная желтая К18968			(8 из 12)	
Сахарная белая К23265			(4 из 5)	
Зубовидная белая К451			(11 из 16)	
Институтская				(19 из 21)
Кабардино-балкарская 38/12				(24 из 26)
Сахарная желтая К10828				(5 из 5)
Зубовидная желтая 23215.Б272				(7 из 7)
Аргентина КОС				(11 из 11)

далось нами у интактных корней. Чтобы проверить, происходит ли такое открывание меристемы у отрезанных кончиков корней проростков других сортов кукурузы, мы изучили корни проростков 12 сортов. Полученные данные представлены в табл. 1. Оказалось, что подобное открывание меристемы наблюдалось в большей или меньшей степени не у всех изученных сортов, а у корней проростков ряда сортов мы его не наблюдали. Степень выраженности активации делений покоящегося центра заметно варьировала в разных корнях из одной и той же партии проростков, выращенных в одной и той же кювете и после отрезания помещенных в одну и ту же чашку. В некоторых случаях наблюдались большие комплексы клеток, а в других деления небольшого числа клеток один-два раза в сторону чехлика, однако при этом четкая граница (слой клеток дерматогена) между чехликом и основным телом корня прерывалась (рис. 1). Причины такой вариабельности неясны, однако они отмечались и другими авторами, которые описывали открывание меристемы в корнях кукурузы в других случаях (например, Clowes, Wadekar, 1989). Они наблюдали активацию делений клеток покоящегося центра с образованием протуберанцев в сторону чехлика у ряда корней целых проростков с возрастом, что особенно проявлялось при температуре 30°C. Аналогичное явление описано у некоторых интактных корней при более низких температурах, которое чаще наблюдалось у корней большей длины.

На корнях арабидопсиса, в которых покоящийся центр четко выявлялся по свечению *GFP*, мы не наблюдали подобного явления и размер покоящегося центра не менялся за 24 часа выдерживания изолированных кончиков корней на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри. Таким образом, в отрезанных корнях арабидопсиса не происходит активация делений клеток покоящегося центра, которая наблюдалась нами у корней ряда (но не всех) сортов кукурузы.

Таким образом, у корней проростков ряда сортов кукурузы отрезание корня и его выдерживание во влажной среде на бумаге, смоченной фильтровальной водой, вызывает активацию делений клеток покоящегося центра, что приводит к изменению структуры меристемы из закрытой в открытую. Сходные изменения наблюдались ранее у корней проростков кукурузы с возрастом особенно при выращивании корней при высоких температурах (Clowes, Wadekar, 1989) и как реакция на охлаждение корней, облучение или обработку токсикантами, о чем мы упоминали выше. "Открывание" меристемы наблюдалось Демченко и др. (2010) у отдельных контрольных и выращиваемых в растворе нитрата никеля корней проростков пшеницы. Интересно отметить, что все авторы наблюдали большое разнообразие реакции отдельных корней в одной и той же партии проростков. Эта вариация наблюдается при отрезании кончика корня на большом расстоянии от покоящегося центра или всего корня у семени. Поэтому такая вариабельность не может быть



Продольные срезы кончиков корней разных сортов кукурузы после однодневной инкубации на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри.

а – сахарная белая K9615, б – зубовидная белая K18968, в – Интеркрас-375, г – Кабардино-Балкарская 38/12. а, б, в – меристемы открываются, г – закрытая меристема. Белым овалом обведен центр меристемы, в котором видно прерывание наружного слоя клеток ризодермы производными клетками покоящегося центра, возникающими после их делений. Бар – 50 мкм.

обусловлена случайными причинами при отрезании корня.

Несомненно, что отрезание корня и прекращение притока в корень соединений является сильным стрессирующим фактором. Почему это приводит в ряде случаев к активации делений клеток покоящегося центра, неясно. В опытах, поставленных с отрезками корней Интеркрас-375, открывание меристемы не останавливалось при помещении отрезанных корней на 2% раствор сахарозы, которая является основным углеводом, притекающим в корень сверху. ИУК (10^{-6} – 10^{-8} М) также не предотвращала открывания меристемы. Оно наблюдалось также при помещении отрезанных кончиков корней кукурузы на среду Стрита без или с 2% сахарозы в стерильных условиях (Быстрова и др., 2008), хотя корни заметно удлинялись в среде с сахарозой и практически не росли без нее.

Какие процессы вызывают активацию делений клеток покоящегося центра после отрезания корня, пока неясно. Возможно, что это связано с выделением этилена, которое неоднократно наблюдалось на разных объектах после механических или других повреждений (Abeles et al., 1992). Корни разных сортов кукурузы могут отличаться по степени выделения этилена. Ortega-Martinez et al. (2007) наблюдали активацию делений клеток покоящегося центра в корнях арабидопсиса этиленом. Однако в отрезанных корнях арабидопсиса мы не наблюдали активации делений клеток покоящегося центра. Роль этилена в активации делений клеток в корнях проростков кукурузы пока не изучена и ее изучение представляет большой интерес.

Таким образом, наблюдения, описанные в настоящей статье, показывают, что функциональное состояние клеток покоящегося центра может резко меняться при нарушении связей кончика корня с основной частью растения. Механизмы этого явления пока неясны. Интересно, что это явление наблюдается как при отрезании очень малых кусочков корня, так и целых корней.

Клетки покоящегося центра при обычных условиях находятся в покоящемся состоянии. Данные этой статьи показывают, что оно зависит от целостности корня и, возможно, притока к покоящемуся центру сверху каких-то соединений, природа которых пока неясна. Описанная реакция клеток покоящегося центра в корнях ряда сортов кукурузы показывает, что хотя функциональное значение ствольных клеток у растений и животных в принципе одинаково, но в растениях ствольные клетки имеют свою специфику, состоящую в том, что они поддерживаются системой взаимосвязей, а не являются заложенной в раннем онтогенезе популяцией клеток.

Авторы благодарят проф. Бен Шереса (университет Утрехта) за семена трансгенных растений арабидопсиса.

Работа проведена при частичной поддержке РФФИ (Грант № 09-04-00919а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Быстрова Е.И., Месенко М.М., Грачева В.В., Иванов В.Б. Активация делений клеток покоящегося центра после отрезания корня // Тезисы докладов Международной научной конференции “Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений”. Екатеринбург: Изд. Уральского унив., 2008. С. 102–103.
- Демченко Н.П., Калимова И.Б., Демченко К.Н. Влияние никеля при высокой концентрации на пролиферацию клеток покоящегося центра и инициацию примордиев боковых корней в корнях проростков пшеницы // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 467–477.
- Дубровский И.Г., Иванов В.Б. Некоторые закономерности закладки боковых корней в корнях кукурузы при прорастании // Физиология и биохимия культурных растений. 1984. Т. 16. № 3. С. 279–284.
- Иванов В.Б. Особенности организации пролиферации клеток в растениях в связи с проблемой ствольных клеток // Цитология. 1986. Т. 28. С. 295–302.
- Иванов В.Б. Проблема ствольных клеток у растений // Онтогенез. 2002. Т. 34. С. 253–261.
- Иванов В.Б. Меристема как самоорганизующаяся система: поддержание и ограничение пролиферации клеток // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 926–941.
- Кожевникова А.Д., Серегин И.В., Быстрова Е.И. и др. Влияние тяжелых металлов и стронция на деление клеток корневого чехлика и структурную организацию меристемы // Физиология растений. 2007. Т. 54.
- Нестерова А.Н. Воздействие ионов свинца, кадмия и цинка на клеточную организацию меристемы и рост проростков кукурузы // Дисс. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 1989. 194 с.
- Abeles F., Morgan P., Saltveit M. Ethylene in Plant Biology. San Diego, California: Academic Press, 1992. 414 p.
- Barlow P.W. The Concept of the Stem Cell in the Context of Plant Growth and Development // Stem Cells and Tissue Homeostasis / Eds. B.I. Lorel, C.S. Potten and R.J. Cole. Cambridge: Cambridge. Univ., 1978. P. 87–113.
- Barlow P.W., Rathfelder E.L. Cell division and regeneration in primary root meristems of *Zea mays* recovering from cold treatment // Environ. and Exp. Bot. 1985. V. 25. P. 303–314.
- Baum S.F., Dubrovsky J.G., Rost T.L. Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots // Am. J. Bot. 2002. V. 89. P. 908–920.
- Clowes F.A.L. Nucleic acid in root apical meristems of *Zea* // New Phytologist. 1956. V. 55. P. 29–35.

- Clowes F.A.L. The quiescent center in meristems and its behaviour after irradiation // *Meristems and Differentiation / Brookhaven Symp. Biol.* 1963. V. 16. P. 46–58.
- Clowes F.A.L., Stewart H.E. Recovery from dormancy in roots // *New Phytologist*. 1967. V. 66. P. 115–125.
- Clowes F.A.L., Wadekar R. Instability in the Root Meristem of *Zea mays* during growth // *New Phytol.* 1989. V. 111. № 1. P. 19–24.
- Jiang K., Feldman L.J. Regulation of root apical meristem development // *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* 2005. V. 21. P. 485–509.
- Rodriguez-Rodriguez J.F., Shishkova S., Napsucialy-Mendivil S., Dubrovsky J. Apical meristem organization and lack of establishment of the quiescent center in cactaceae roots with determinate growth // *Planta*. 2003. V. 217. P. 849–857.
- Heimsch C., Seago J.L. Jr. Organization of the root apical meristem in angiosperm // *Am. J. Bot.* 2008. V. 95. P. 1–21.
- Laux T. The Stem cells concept in plants: A matter of debate // *Cell*. 2003. V. 113. P. 261–263.
- Malamy J.E., Benfey P.N. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana* // *Development*. 1997. V. 124. 33–44.
- Ortega-Martinez O., Pernas M., Rachel R.J. et al. Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root // *Science*. 2007. V. 317. P. 507–510.
- Sarkar A.K., Luiten M., Miyashima S. et al. Conserved factors regulate signaling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem organizers // *Nature*. 2007. V. 446. P. 811–814.
- Scheres B. Stem cells: a plant biologic perspective // *Cell*. 2005. V. 122. P. 499–504.

Activation of Cell Division in the Quiescent Center of Excised Maize Root Tip

V. B. Ivanov, E. I. Bystrova, M. M. Mesenko, L. M. Kotova, and A. A. Kotov

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, ul. Botanicheskaya 33, Moscow, 117276 Russia
e-mail: ivanov_yb@mail.ru

Abstract—The phenomenon of activation of cell proliferation in the quiescent center of excised maize roots is described. The root tips were grown on wet filter paper in Petri dishes. This phenomenon was observed in 8 to 14 maize cultivars and was absent in excised *Arabidopsis* root tips. The distribution of mitoses in meristems greatly varied in roots of individual seedlings from the same seed lot and seedlings of different cultivars. Meristem opening was observed after the removal of small root tips not longer than 3 mm and intact seminal roots. Sucrose (2%) and 10^{-6} – 10^{-8} M indole-3-acetic acid did not prevent meristem opening. These findings indicate that the state of quiescent center is maintained by a system of intercellular and interorgan relations, which are to be clarified.

Keywords: root, meristem, quiescent center, stem cells

УДК 597.828:591.471.32

СВОЙСТВА НОРМЫ И ИЗМЕНЧИВОСТИ

© 2011 г. Е. Е. Коваленко

Санкт-Петербургский государственный университет, Биолого-почвенный факультет, 199034 Санкт-Петербург
E-mail: kovalenko_i@mail.ru

Поступила в редакцию 11.06.2010 г.
Окончательный вариант получен 23.07.2010 г.

В статье обобщены многолетние данные автора по двум способам развития группы потомков бесхвостых амфибий – развитию с эффектом нормы признаков и развитию с эффектом массовых аномалий ряда признаков. Массовые аномалии конечностей получены в лаборатории у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (без применения специальных воздействий). Они представляют собой синдром, при котором коррелятивно меняется строение конечностей и их поясов, а также строение крестцового отдела позвоночника. Синдром имеет несколько стадий проявления (по степени усиления отклонений от нормы). При максимальном проявлении синдрома происходит смена нормы строения крестцового отдела. Показано, что смене нормы строения крестца предшествует изменение правила его изменчивости. Не имея возможности прямо наблюдать процесс эволюции (смену норм в крупном масштабе времени), мы вынуждены использовать любые данные (пусть даже косвенные), которые могут дать информацию о том, как происходит смена нормы и что происходит с изменчивостью в это время.

Биологическую эволюцию в самом общем виде можно определить как изменяемость (или непостоянство) биологических объектов в масштабах геологического времени. Ныне реальность самого явления эволюции уже не вызывает сомнений. Благодаря успехам палеонтологии явление постоянной изменяемости живого признано научным фактом и не нуждается в специальной аргументации.

Фактические данные палеонтологической летописи показывают и то, что изменяемость организмов не абсолютна (виды меняются не в каждый момент времени, не все виды одновременно, а изменения идут не во всех возможных направлениях). Кроме того, изменяемость регистрируется в крупном масштабе времени, тогда как на более мелких отрезках времени наблюдается относительное постоянство отдельных видов и даже их комплексов. Иными словами, кроме изменчивости наблюдается явление нормы – достаточно длительное воспроизведение одного и того же варианта с большей частотой, чем все остальные возможные для данного объекта варианты строения (см. подробнее Коваленко, 2003). Причем одна и та же норма воспроизводится так долго, что мы успеваем зарегистрировать ее существование по данным палеонтологической летописи, а в ней, как известно, остаются следы далеко не всех существ, живших на Земле. По законам тафономии наибольшую вероятность сохранения имеют самые многочисленные представители (и норма строения имеет значительно больше шансов сохраниться, чем отклонения от нее). То есть эволюцию мы регистрируем как смену норм строения

во времени и именно с этой позиции ее следует объяснять.

Первостепенной задачей эволюционного учения является установление механизмов постоянной изменяемости (смены норм) биологических объектов. Все остальные аспекты эволюции решаются относительно ответа на этот главный вопрос. Собственно, возникновение такой задачи и маркирует начало эволюционизма, и ставит границу между ним и предшествующим ему трансформизмом. Это легко видеть из контекста исторических обзоров на эту тему (см. например: История биологии, 1972; Чайковский, 2003; Воронцов, 2004; Назаров, 2005). Со времени возникновения первых эволюционных учений (Ламарк, 1809, цит. по 1955; Дарвин, 1859, цит. по 1907), было предложено множество версий, объясняющих (или описывающих) этот процесс. Пока не существует их общепринятой классификации – версии альтернативны по слишком многим позициям. К тому же, всякая классификация зависит от цели, ради которой она создается, и потому таких классификаций может быть несколько. Цель направления наших исследований – роль изменчивости в эволюции и возможные соотношения между нормой и изменчивостью. В связи с этим я предлагаю следующее деление известных объяснений смены норм биологических объектов во времени:

1. На основе идеи творения (креационизм и его производные).

Идея подразумевает создание новых норм из ничего, в результате актов творения Высшего Разума. Эта система объяснений лежит за рамками научных методов и подходов (см., например: В тени Дарви-

низма, 2005). Естественные механизмы, в том числе и закономерности соотношения нормы и изменчивости, в этой системе не имеют значения. Учитывая цель статьи, здесь не имеет смысла рассматривать эти версии.

2. Естественное происхождение новой нормы из имеющегося биологического материала (все версии в рамках эволюционизма).

а) Прямое превращение одной нормы в другую (ламаркизм и его производные).

Идея, как известно, принадлежит Жану Батисту Ламарку (1809, цит. по 1955). Она подразумевает, что организм может прямо сменять один вариант строения на другой в ходе индивидуальной жизни и передавать приобретенные свойства потомкам (закреплять их в следующих поколениях). Оставляя в стороне вопрос о принципиальной возможности таких явлений и их возможной роли в качестве основных механизмов изменчивости, заметим, что факт индивидуальной изменчивости в этой системе объяснений принципиального значения не имеет. Следовательно, привлекать эту систему к вопросу о соотношении между нормой и изменчивостью не имеет смысла.

б) Новая норма возникает из числа вариантов изменчивости.

Давно известно, что на ряду даже с ярко выраженной нормой вид всегда воспроизводит некоторое число вариантов изменчивости (вариантов, более редких по частоте). Эти варианты и являются источником новых норм. Идея, как известно, впервые независимо высказана двумя авторами – А. Уоллесом и Ч. Дарвиным (и опубликована в 1858 г.). Впоследствии она становится наиболее популярной среди версий о возможных механизмах эволюции. Ее используют не только в классическом дарвинизме и его производных (например, в СТЭ), но и в течениях, альтернативных дарвинизму по самым разным позициям. Можно с уверенностью сказать, что большинство известных версий о механизмах изменчивости полагает, что источником нового в эволюции является именно индивидуальная изменчивость.

Если это верно, то не может не удивлять, что вопросам о свойствах нормы (см. Коваленко, 2003), изменчивости (см. Коваленко, Попов, 1997) и их соотношению долгое время не уделялось должного внимания, во всяком случае, в теоретическом аспекте. Ранее было показано (Коваленко, Попов, 1997), что в отношении изменчивости тому были объективные исторические причины. Однако положение по сей день не изменилось. В связи с этим, цель данной статьи – обратить внимание на важность вопроса о свойствах нормы и изменчивости для анализа созданных или создания новых версий о механизмах эволюции. Задачей статьи является показать, что такие вопросы можно решать на современном материале (на модельных объектах). В

частности, в статье будут представлены уникальные данные по свойствам изменчивости в условиях смены нормы строения.

Основное внимание в статье уделено фактическим данным по строению крестца у лабораторной шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Внимание именно этому виду¹ объясняется тем, что в ходе его разведения был зарегистрирован эффект массовых аномалий конечностей, не спровоцированный никакими специальными воздействиями (см. подробнее Коваленко, Кружкова, 2000). Массовые аномалии – это явление, при котором резко падает частота бывшей нормы и возрастают частоты вариантов индивидуальной изменчивости; а в некоторых случаях один из вариантов изменчивости становится преобладающим по частоте встречаемости. То есть происходит существенное снижение частоты нормы строения для определенного вида и даже смена его нормы по ряду признаков. Специальный анализ литературы (Коваленко, 2000а) показал, что массовые аномалии, в частности, конечностей у бесхвостых амфибий, представляют собой хотя и редкое, но регулярное явление в природных популяциях. Но даже направленные и многолетние исследования этого явления в природе (см. Dubois, 1979) не дают такой подробной информации, как при исследовании его в условиях лаборатории, когда известны производители и их фенотип, их плодовитость, условия развития потомков, смертность во время развития, сроки прохождения метаморфоза и т. д.

Не имея возможности прямо наблюдать процесс эволюции (смену норм в крупном масштабе времени), мы вынуждены использовать любые данные (пусть даже косвенные), которые могут дать информацию о том, как происходит смена нормы и что происходит с изменчивостью в это время. Данные по “поведению” нормы и изменчивости в условиях массовых аномалий тем более актуальны, что часть концепций эволюции предполагает именно такой характер возникновения новых норм (краткое и бурное видообразование). Например, разные варианты сальтационизма (см. обзоры: Татаринов, 1987; Чайковский, 2003; Назаров, 2005; Шишкин, 2006 и др.), а также пунктуализм (Gould, Eldredge, 1993).

Материал, методы и терминология

Материал

Основным модельным объектом исследований служит посткраниальный скелет бесхвостых амфибий (*Amphibia*, *Anura*). Он оказался удобным сразу в нескольких отношениях: высокая межвидовая и

¹ Группа морфологов нашей кафедры в течение многих лет проводила размножение целого ряда видов бесхвостых амфибий для получения материала по развитию и индивидуальной изменчивости.

индивидуальная изменчивость, высокая плодовитость многих видов, легкость разведения и выращивания в лаборатории, значимость признаков скелета для систематики отряда. В связи с последним — большой объем литературных данных в виде описаний нормы строения и отклонений от нее. Начиная с 1979 г. на кафедре зоологии позвоночных СПбГУ усилиями автора и его студентов создавалась коллекция норм строения и индивидуальной изменчивости скелета *Apuia* (материалы из природных популяций и полученные в результате лабораторного выращивания); к настоящему моменту коллекция насчитывает более 10 тыс. экземпляров.

Кроме того, создана информационная база на основе собственных и литературных данных о нормах строения и индивидуальной изменчивости модельного объекта. Максимальный объем информации собран по строению крестцово-уростильного отдела (для краткости — крестца). Объединенная база включает данные по 260 видам (современным и вымершим), принадлежащим к 131 роду из 26 семейств (об источниках фактических данных см. подробнее Коваленко, Данилов, 2006). Этот материал послужил основой для расчета диапазона изменчивости крестца отряда в целом (см. ниже).

Материал по лабораторной шпорцевой лягушке

Индивидуальная изменчивость скелета исследована у личинок, проходящих метаморфоз и ранних сеголеток. Материал получен автором и его студентами при выращивании личинок в лаборатории. Для получения материала были использованы 28 внешне нормальных самцов и самок *X. laevis* (большинство — индивидуально меченые особи), проведено 28 спариваний с использованием производителей в разных сочетаниях. Размножение *X. laevis* и выращивание личинок проводилось (1989–1996 гг.) согласно стандартным рекомендациям (Детлаф, Руднева, 1975), без применения каких-либо экспериментальных воздействий на эти процессы. Оплодотворенные яйца, полученные в результате одного спаривания одной пары производителей, размещались в несколько кювет (объемом 8–12 л.) для создания оптимальной плотности личинок. Более подробная информация об условиях содержания и спаривания производителей, а также выращивания их потомства дана в предыдущих работах (Коваленко, 2000, 2000а; Коваленко, Кружкова, 2000). Выращивались все потомки, полученные от одной пары производителей. Так создавались следующие серии: 1) для анализа изменчивости (в этом случае все личинки доводились до стадии полного метаморфоза, после чего фиксировались); 2) для анализа хода развития (личинки фиксировались небольшими партиями по мере достижения определенных стадий онтогенеза). Строение скелета исследовано на тотальных препаратах, дифференцированно окрашенных на хрящ и кость и про-

Материал по шпорцевой лягушке

Типы серий	Число особей, исследованных на строение крестца		
	норма	изменчивость*	всего
NK	620**	60	680
AK	780***	237	1017
всего	1400	297	1697

NK — группа развивалась с эффектом нормы всех основных признаков;

AK — группа развивалась с эффектом массовых аномалий конечностей;

* — изменчивость крестца относительно его нормы для данной группы потомков;

** — норма крестца, обычная для *X. laevis*;

*** — норма крестца в условиях массовых аномалий конечностей (новая для вида норма крестца).

светленных в глицерине (Wassersug, 1976), а также на гистологических препаратах (см. подробнее Коваленко, 1992).

За несколько лет получено около 6000 потомков гладкой шпорцевой лягушки, из них (на настоящий момент) на строение конечностей исследовано — 3880, в том числе более 1150 особей с аномалиями конечностей (среди них и погибшие в ходе развития). На строение крестца исследовано: 12 серий с нормальным развитием конечностей и 29 серий с массовыми аномалиями конечностей и их поясов; всего 1700 экз., из них — 299 экз. с аномалиями крестца (таблица).

Терминология и метод спектров

Серия — группа потомков, полученных от одной пары производителей (от одного спаривания) и выращенных в одной кювете (в одинаковых условиях). *Норма* — вариант, преобладающий по частоте встречаемости в данной серии. *Изменчивость* — все остальные, возможные для данного вида варианты строения модельного объекта, более редкие по частоте, чем норма (синонимы — *аномалии*, *отклонения от нормы*).

Анализ полученных данных проводился методом спектров (Коваленко, 1996), суть которого сводится к анализу изменчивости относительно какой-то точки отсчета. Например, анализ реальной изменчивости группы относительно потенциальных возможностей данного таксона, или анализ потенциальных возможностей изменчивости данного таксона относительно теоретически ожидаемых его возможностей. Эта процедура позволяет устанавливать запреты на определенные комбинации признаков и выявлять закономерности изменчивости на межвидовом и внутривидовом уровне.

Алгоритм составления спектров следующий. Установить признаки строения (в данном случае

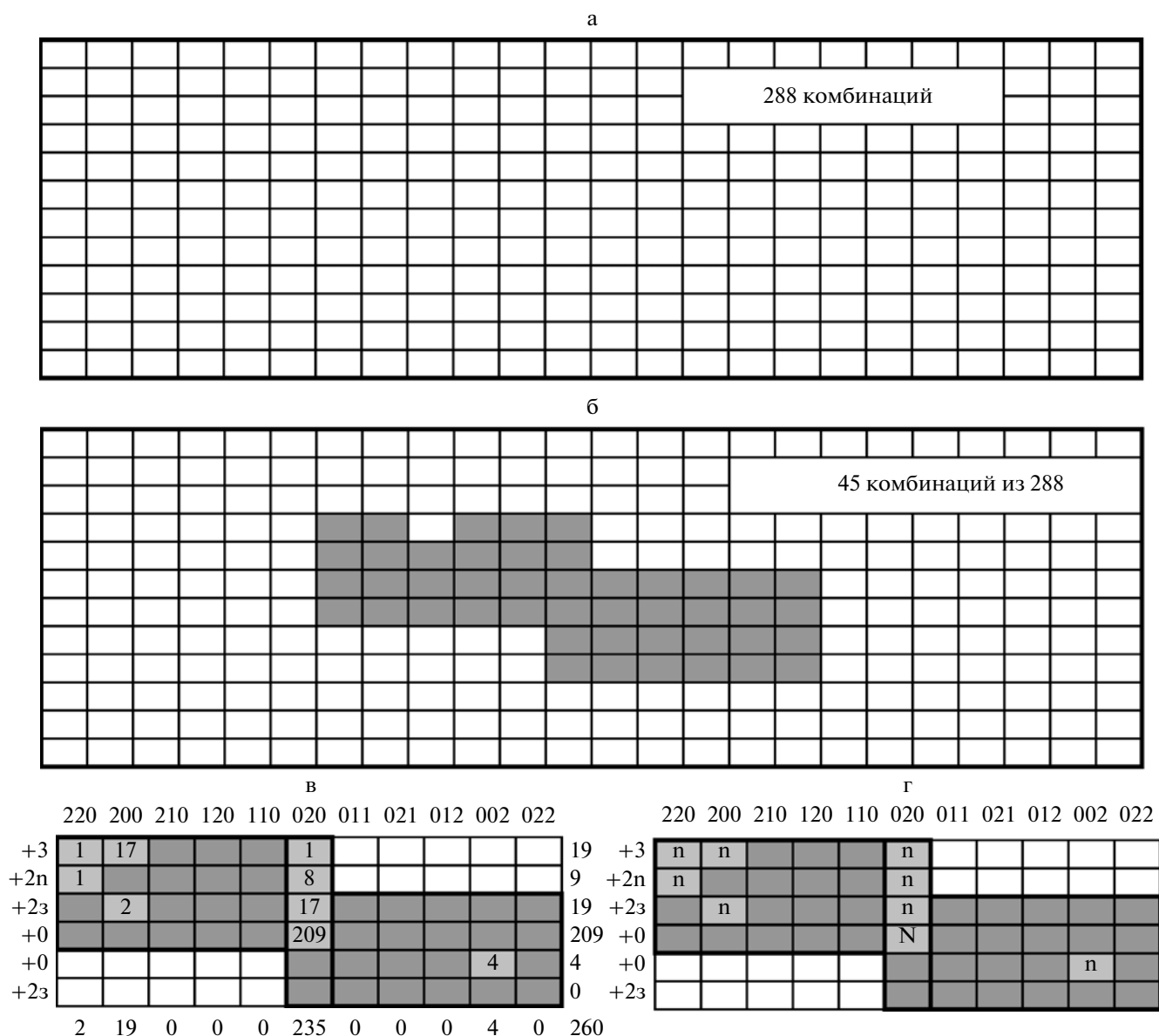


Рис. 1. Спектры изменчивости крестца Anura.

a – полный набор комбинаций или теоретически ожидаемый спектр (St Anura); *б* – комбинации, реально встреченные у представителей Anura (закрашены); Sr Anura в Sp (в спектре потенциальных возможностей Anura); *в* – спектр потенциальных возможностей крестца отряда (очерчен жирной линией) и в нем частоты известных норм строения крестца; *г* – положение редких (*n*) и наиболее частой (*N*) норм строения крестца в Sp Anura.

признаки крестца), варьирующие в межвидовой и индивидуальной изменчивости выбранного таксона (в данном случае – отряда). Установить возможные для таксона состояния каждого из этих признаков. Перекомбинировать состояния признаков между собой и получить максимально возможный набор вариантов строения, который можно представить в виде сетки, каждая ячейка которой представляет собой определенный вариант строения (определенное сочетание из состояний признаков). То есть получить максимально возможный набор вариантов строения. Так был получен спектр теоре-

тически ожидаемых вариантов изменчивости крестца отряда в целом (St Anura; рис. 1а), состоящий из 288 вариантов строения.

Затем следует внести в теоретически ожидаемый спектр те варианты, что реально встречены у всех исследованных представителей таксона, – совместить спектр реальной изменчивости (Sr) со спектром теоретически ожидаемой изменчивости (St). Для этого нужно заполнить ячейки спектра (например, просто отметить их в St; рис. 1б). Всего отмечено 45 таких вариантов. На основании характера заполнения St таксона реальными вариантами строе-

ния, выявить запреты (ограничения) на теоретически ожидаемые комбинации из числа незаполненных ячеек. В первую очередь исключению подлежат полностью незаполненные столбцы и строки, во вторую — крупные блоки столбцов или строк. Если со временем (скажем, при увеличении числа исследованных видов, увеличении объема выборок или других обстоятельствах) обнаружатся новые варьирующие признаки, или новые состояния уже известных признаков, или заполнится часть ранее пустых ячеек, то для дальнейшего анализа всегда можно увеличить, как теоретически ожидаемый спектр, так и спектр потенциальных возможностей.

Так или иначе, при совмещении St и Sr определяются ограничения — наименее вероятные для данного таксона комбинации. И в результате остается спектр потенциальных возможностей таксона — Sp таксона (или спектр его потенциальной изменчивости) — диапазон возможностей (Sp крестца Anura, рис. 1б). Этот спектр служит точкой отсчета для сравнения изменчивости таксонов более низкого ранга, анализа положения известных норм в диапазоне возможностей, связи между определенной нормой и характером изменчивости и др. вопросов.

На спектрах, представленных в статье, цифры в ячейках — это абсолютное число экземпляров (или видов), у которых встречена данная комбинация признаков; цифры слева и сверху от спектра — коды строк и столбцов (соответственно), которые вместе образуют код конкретного варианта; цифры справа и снизу от спектра — суммирование количественных данных по строкам и столбцам (соответственно), а цифра в правом нижнем углу — общее число исследованных экземпляров (объем выборки) или видов. По цифрам в ячейках легко определить преобладающий по частоте вариант строения — норму для данного вида (или наиболее часто встречающийся вариант нормы среди видов отряда). Поскольку задачи данной статьи ограничены анализом лишь самых общих тенденций изменчивости, то нет смысла здесь давать расшифровку кодов всех вариантов (см. о кодах Коваленко, 1996, 2000). В соответствующих местах текста будут даны необходимые комментарии к тому, что значат отдельные части спектра.

Анализ изменчивости методом спектров, прежде всего, позволяет установить закономерности ее проявления, которые формулируются в виде *правила спектра изменчивости* для данного таксона (правило изменчивости, правило спектра). Это правило устанавливает положение нормы (преобладающего по частоте варианта) в диапазоне возможностей таксона, а также соотношение между частотами остальных вариантов диапазона (какие комбинации более вероятны для данного таксона, а какие — менее вероятны). *Спектр (изменчивости) симметричен, асимметричен влево, асимметричен вправо* —

термины, описывающие какие части спектра наиболее вероятны для данного таксона.

Эффект падения нормы признаков (Коваленко, 2000) — термин, который обозначает редкую для таксона ситуацию, при которой в группе потомков резко падает частота бывшей нормы ряда признаков (признаков, коррелятивно связанных между собой в ходе развития). При падении частоты бывшей нормы резко возрастают частоты вариантов индивидуальной изменчивости (частоты аномалий), что, соответственно, ведет к увеличению в группе доли особей, отклоняющихся от нормы (*массовые аномалии*).

ОБЩИЕ ДАННЫЕ О СВОЙСТВАХ НОРМЫ И ИЗМЕНЧИВОСТИ

Нормы крестца Anura в диапазоне потенциальных возможностей отряда

Сама процедура выделения спектра потенциальных возможностей показывает, что в эволюции отряда реализованы далеко не все теоретически ожидаемые варианты (45 из 288). Причем реализованные варианты располагаются в теоретическом ожидаемом спектре не равномерно, а очень компактно — заполняют всего 2 сектора (рис. 1б, закрашенные ячейки в St). Если бы спектр был заполнен равномерно (пусть даже мозаично), то можно было бы предположить, что все варианты имеют примерно одинаковую вероятность реализации (т.е. состояния признаков комбинируются без ограничений), а для выявления всех реальных возможностей отряда нужен просто больший объем материала. Неполное, но компактное заполнение St говорит о том, что часть вариантов имеет большую вероятность реализации по сравнению с остальными, следовательно, существуют запреты (ограничения) на определенные комбинации признаков. Явно выраженные запреты и помогают очертить спектр потенциальных возможностей — Sp отряда.

Если в ячейки Sp Anura внести абсолютные частоты встречаемости вариантов нормы (рис. 1в), то мы не только получим картину положения известных норм строения в общем спектре возможностей отряда (рис. 1г), но сможем оценить соотношение между частотами встречаемости вариантов норм. Прежде всего, видно, что нормы распределены в Sp неравномерно. То есть далеко не все варианты из числа возможных для бесхвостых амфибий реализованы в виде норм строения (в спектре есть, например, полностью незаполненные столбцы или строки). Кроме того, видно, что ячейка спектра с высокой частотой встречаемости может быть окружена пустыми ячейками; например, ячейка с частотой 209 (вариант встречен у 209 видов), а соседние варианты в качестве нормы не встречены ни у одного вида (незаполненные ячейки). Между тем соседние ячейки в спектре означают, что соответствующим

щие им варианты отличаются по состоянию всего лишь одного из признаков, что еще раз подтверждает существование ограничений именно на комбинации признаков. Иными словами, дело не в недостатке исследованного нами материала, а в том, что комбинации имеют разные вероятности реализации.

Это означает, что потенциальная изменчивость ограничена и уже поэтому ее можно исследовать. Еще одно обстоятельство привлекает внимание — это существенное частотное преобладание одного из реальных вариантов норм над всеми остальными (ячейка с частотой 209). Это не самый примитивный и не самый продвинутый с точки зрения систематиков вариант строения крестца. Он появляется в эволюции бесхвостых амфибий очень рано, рано начинает частотно доминировать и доминирует до сих пор (см. подробнее Коваленко, Данилов, 2006а).

Более подробный анализ закономерностей межвидовой изменчивости не входит в задачи данной статьи, но приведенных данных достаточно, чтобы сделать вывод о ее ограничениях и наличии разрывов между известными нормами строения.

Два варианта развития группы потомков бесхвостых амфибий

Понятия “норма строения”, “нормальное развитие”, “нормальные условия развития” и др. столь давно и столь прочно вошли в обиход биологии, что обычно мы не утруждаем себя разъяснениями того, что это значит. Для модельных лабораторных видов они определены опытным путем (см., например, “Объекты биологии развития”, 1975) и считаются эталоном. Однако на практике все не так просто, особенно, если в задачи исследования входит анализ соотношения между нормой и изменчивостью, который подразумевает не выбор особей, соответствующих норме, а анализ состава группы (какое число особей из группы соответствует норме, а какое — отклоняется от нее).

Во-первых, всем, кто занимался размножением модельных животных, хорошо известно, что диапазон условий, при которых в группе успешно воспроизводится норма (по крайней мере, для определенных признаков), значительно шире диапазона “оптимального”. Во-вторых, границу между нормальным и ненормальным *развитием* группы данного вида тем более трудно провести, что существует “парадокс нормы” (Коваленко, 2003) — на уровне отдельных признаков норма выделяется легко, а на уровне комплекса признаков (строение всего организма, темпы развития группы особей и др.) выделить ее можно только теоретически. Ранее это было показано на фактическом материале по строению и развитию посткраниального скелета *Aneides* (Коваленко, 2003), здесь лишь кратко сформулируем основные тезисы.

Норму строения обычно понимают, как комбинацию из нормальных состояний всех признаков, привлеченных к анализу (диагностических признаков). Нередко полагают, что такой вариант должен количественно доминировать над остальными вариантами, за что он и называется нормой строения. Однако чем больше признаков мы возьмем в анализ, тем ниже будет частота встречаемости предполагаемой “нормы строения” в группе (в выборке). И это легко объяснимо — вероятность воспроизведения комбинации равна произведению вероятностей ее составляющих. Элементарный математический анализ показывает, что при увеличении числа анализируемых признаков вероятность комбинации из их нормальных состояний падает (Коваленко, 2003).

И, наконец, одно дело определить по критерию “нормальное развитие” отдельных особей, другое — определить по этому же критерию группу потомков одной пары производителей (даже если она развивалась одновременно в одинаковых условиях). В такой группе (если она достаточно велика) всегда будут особи, не соответствующие типовому описанию строения или отклоняющиеся по темпам развития. И чем больше объем группы (число исследованных особей из этой группы), тем больше будет *абсолютное число* особей, отклоняющихся от эталона.

А поскольку для анализа изменчивости всегда требуется именно группа (причем, лучше не случайная собранная, а развившаяся одновременно и в одинаковых условиях), то было предложено (Коваленко, 2000) различать два варианта развития такой группы особей.

1. Развитие группы с эффектом нормы признаков

Это вариант, когда при одновременном развитии группы особей одного вида в одинаковых условиях (например, потомков, полученных от одной пары производителей и выращенных в одной кювете), наблюдается “эффект нормы” для отдельных признаков (скажем, диагностических). Это означает, что каждый из анализируемых признаков у большинства особей этой группы демонстрирует одинаковое состояние (то есть одно состояние признака из числа возможных для вида существенно преобладает по частоте). Обычно норма признака столь ярко выражена, что не требуется никаких специальных статистических методов для ее установления — ее частота на 1–2 (и более) порядка превосходит частоту каждого из остальных возможных вариантов. Это можно видеть на спектре изменчивости крестца шпорцевой лягушки (рис. 2а). Столбцы спектра различаются между собой по признакам, на каком позвонке сформированы крестцовые отростки и сколько их. Столбец с кодом “020” означает, что такие отростки расположены на IX позвонке и только на нем, и их два. Суммарная частота вариантов этого столбца (623 из 680 исследованных) не оставляет

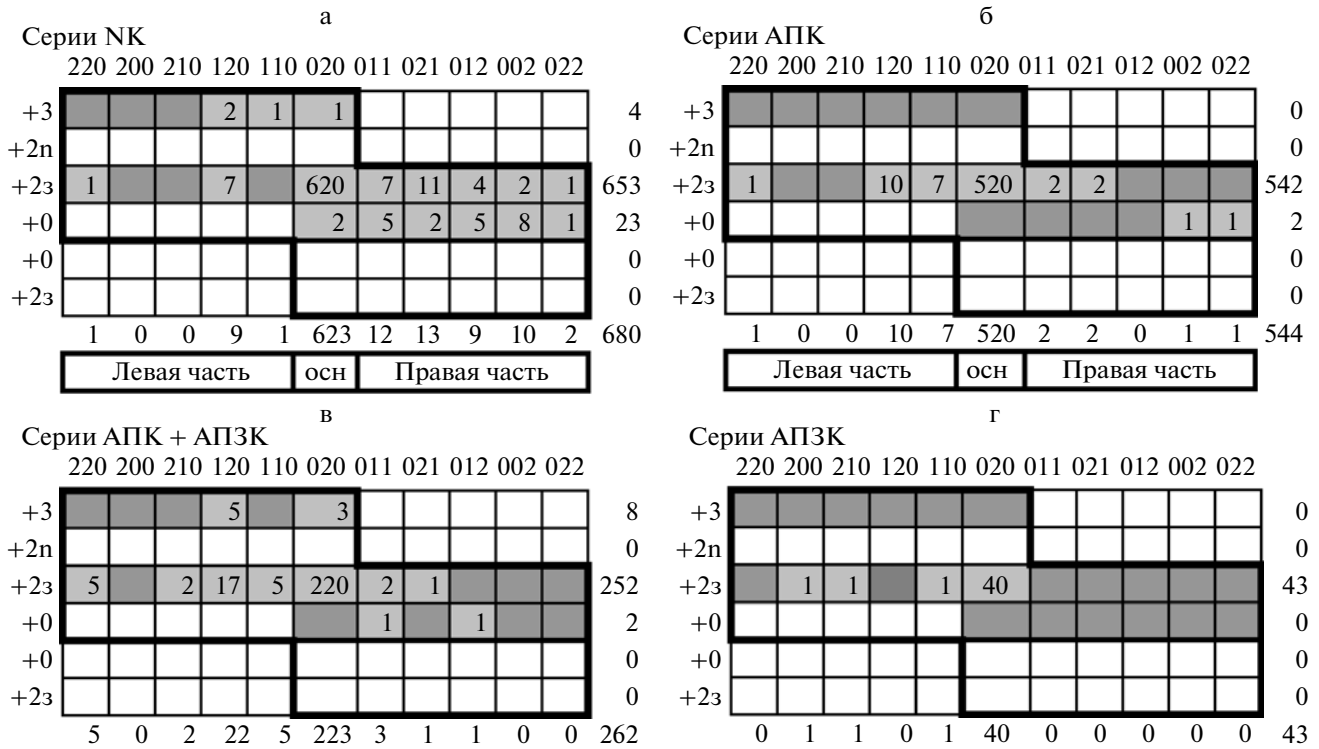


Рис. 2. Спектры изменчивости двухстороннего крестца *X. laevis* разных серий.

а–в, д – спектры составлены по данным всех исследованных в этих сериях особей; г – спектр составлен только по особям, имеющим двухсторонний крестец; е – спектр составлен только для внешне нормальных особей этих серий.

осн – основной столбец спектра (он содержит наиболее популярный вариант нормы строения крестца); справа и слева от него – правая и левая части спектра (соответственно). Объяснения других обозначений в спектрах даны в разделе “Материал и методы”.

сомнений в том, что именно это состояние признаков является нормой (наиболее часто встречающимся вариантом). Строки спектра (рис. 2а) различаются – по признаку, подвижно или неподвижно соединены между собой позвонки (какие именно и сколько позвонков слиты). Они показывают, что строка “+2з” (IX позвонок слит с уростилем) имеет существенно более высокую вероятность, по сравнению с другими вариантами (653 из 680 исследованных). Однако вероятность комбинации из нормальных состояний всех учтенных признаков уже имеет более низкую частоту, чем по каждому признаку в отдельности (620 из 680 исследованных).

Такой характер развития (с количественным преобладанием у потомков одного из возможных состояний *каждого признака*) мы предлагаем принимать как *нормальное развитие группы* особей данного вида (т.е. наиболее часто встречающийся характер развития). Из норм строения по каждому признаку в отдельности и составляется диагноз вида, который используется в систематике и филогенетических построениях. Аномалии (отклонения от нормы по каждому из признаков), проявляющиеся при нормальном развитии группы у части ее членов, были нами названы “фоновой изменчивостью”

(Коваленко, 2000; рис. 3б) – что означает эффект нормы признаков на фоне некоторого диапазона изменчивости. Частота каждого из вариантов фоновой изменчивости много ниже частоты нормы, но их частоты тоже не равны (рис. 2а) – одни варианты встречаются в несколько раз чаще, чем другие. Как оказалось, спектры изменчивости крестца разных видов при нормальном развитии группы различаются не только положением нормы строения и положением запретов в общем для отряда *Sr*, но и соотношением частот встречаемости вариантов из фоновой изменчивости (Коваленко, 2000). Соответственно, от объема исследованной выборки зависит, какова вероятность зарегистрировать тот или иной вариант изменчивости (чем ниже вероятность его встречаемости у данного вида, тем больший объем выборки нужно взять для анализа).

2. Развитие группы с эффектом потери нормы ряда признаков (или эффект массовых аномалий)

Во втором случае в результате одновременного развития группы потомков, полученных от внешне нормальных производителей и развивавшихся в одинаковых условиях, наблюдается исчезновение эффекта нормы по отдельным признакам (обычно

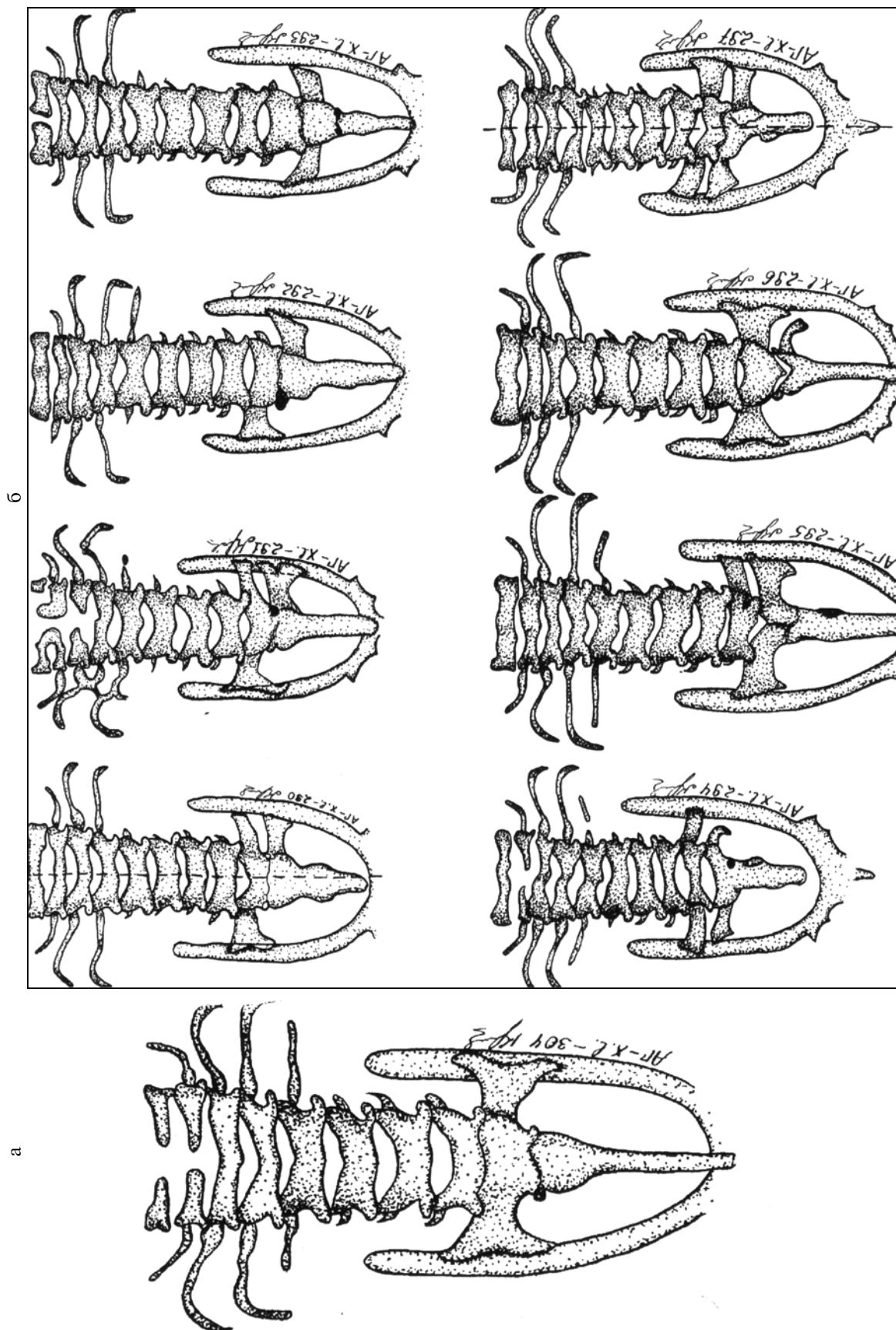


Рис. 3. Строение осевого скелета у постметаморфозных особей *X. laevis*.
 а – норма строения крестца; б – некоторые варианты индивидуальной изменчивости.

сразу по нескольким, коррелятивно изменяющимся в ходе развития). Прежняя норма этих признаков (характерная для вида) перестает быть доминирующим вариантом. Она встречается не чаще, чем другие возможные варианты, реже или вовсе не воспроизводится. Частота нормы падает и, одновременно, возрастает частота вариантов из фоновой изменчивости — варианты, ранее бывшие редкими, становятся настолько более частыми, что их легко зарегистрировать даже в небольшой выборке (см. подробнее, Коваленко, Кружкова, 2001).

Если норма у данного вида ранее исследовалась при эффекте нормы признаков, да еще и с помощью маленьких выборок, не позволяющих зарегистрировать низкочастотные комбинации, то резко повышение частот встречаемости последних создает впечатление, что они возникли ниоткуда (во всяком случае, якобы не из фоновой изменчивости). Возможно, именно такие случаи служат основанием для сальтационистских взглядов на механизмы эволюции.

Явление массовых аномалий в потомстве от внешне нормальных производителей обычно определяется, как “внезапное” и заставляет наблюдателей искать его внешнюю причину, которую чаще всего видят или в нарушении условий развития, или в том, что производители являлись скрытыми носителями порока генетической информации (см. обзоры Dubois, 1979, Коваленко, 2000). Но наши данные по анализу этого явления заставляют иначе взглянуть на этот вопрос.

Прежде всего, важно, что при явлении массовых аномалий никакой другой вариант (комбинация признаков) не замещает бывшую норму по частоте встречаемости, не достигает ее бывшей частоты (см. подробнее Коваленко, 2000; Коваленко, Кружкова, 2001). Мы предполагаем, что первопричиной этого является именно падение “эффекта нормы” (падение вероятности ее воспроизведения), вслед за которым немедленно возрастают частотные возможности сразу нескольких вариантов изменчивости. При анализе диапазона изменчивости такой группы иногда становится невозможным применить понятие *норма* ни к одному из встреченных вариантов строения.

Эффект “падения нормы” можно получить искусственно, намеренно создавая экстремальные (по отдельным параметрам) условия развития группы. Например, при создании высокой плотности личинок (Коваленко, Данилевская, 1991; Коваленко, 1996а), при температурном шоке на ранних стадиях их развития, а также путем создания экстремальных значений многих других внешних факторов (см. Fowler, 1970; Коваленко, 1992). Мы предполагаем, что такой эффект может возникать и спонтанно в диапазоне “оптимальных условий” развития, о чем косвенно говорят данные анализа собственного и литературного материала по массовым аномалиям

конечностей *Anura* (см. Коваленко, 2000). Такое соотношение между нормой и изменчивостью (аномалиями) в потомстве от одной пары производителей мы предлагаем называть “эффектом падения нормы признаков”. Это название подчеркивает, что дело не в возникновении аномалий (повышении их частоты), а именно в том, что прежняя норма может резко терять вероятность своего воспроизведения; все остальное (возрастание вероятности фоновых аномалий) — лишь следствия этого события.

Итак, в результате разведения ряда видов бесхвостых амфибий в лаборатории, в их числе и гладкой шпорцевой лягушки, мы получили два варианта развития последнего вида:

1) развитие с эффектом нормы строения диагностических признаков посткраниального скелета, в том числе парных конечностей и их поясов (серии НК — нормальные конечности);

2) развитие с эффектом массовых аномалий парных конечностей и их поясов (серии АК — синдром аномалий конечностей); в этом варианте развития на фоне массовых аномалий конечностей отмечена смена нормы строения крестца и изменение спектра его изменчивости.

Фактические данные по соотношению нормы и изменчивости посткраниального скелета у бесхвостых амфибий при развитии с эффектом нормы признаков

Правило изменчивости крестца при развитии с “эффектом нормы признаков”

Анализ проявления нормы и индивидуальной изменчивости крестца у разных видов *Anura* в условиях “эффекта нормы признаков” показал следующие закономерности (Коваленко, 2000).

1. Норма строения крестца ярко выражена у всех исследованных видов. У одних видов она имеет очень высокую вероятность — до 97% (например, у *Rana temporaria*; Коваленко, 1996а), а у других норма менее устойчива — от 75% (например, у *Xenopus laevis*, Коваленко, 2003а; рис. 3а). Оставшиеся 3–25% приходятся на долю всех остальных вариантов, диапазон которых специфичен для вида.

2. Специфика внутривидовой изменчивости выражается в следующем:

— вид имеет определенные ограничения на диапазон изменчивости из числа возможного для отряда в целом; во всяком случае, пока не найден ни один вид, способный реализовать в индивидуальной изменчивости все возможности отряда;

— диапазон потенциальных возможностей вида (число возможных вариантов индивидуальной изменчивости) не связан прямой корреляцией с устойчивостью нормы; например, не наблюдается связи — чем больше доля особей, отклоняющихся от

нормы, тем больше вариантов изменчивости допустимо для вида; или наоборот;

– для вида характерно определенное соотношение между частотами вариантов из его индивидуальной изменчивости, которое сохраняется до тех пор, пока эффект нормы признаков воспроизводится в его потомстве (= *правило спектра изменчивости*);

– правило спектра изменчивости проявляется в частности в том, что по мере увеличении объема исследованной выборки определенного вида, спектр изменчивости заполняется согласно правилу, характерному для этого вида (первыми проявляются высокочастотные варианты, далее – согласно убыванию вероятности воспроизведения вариантов).

В результате выявляется связь между устойчивостью нормы (ее частотой) и правилом спектра изменчивости (Коваленко, 2000). Иными словами, для того, чтобы установить минимальный объем выборки, необходимый для анализа именно свойств изменчивости, нужно учитывать правило изменчивости конкретного вида. То есть, для биологических объектов не может существовать выборки универсального объема (одинаковой для всех видов и всех структур), с помощью которой можно было бы анализировать закономерности проявления изменчивости у самых разных видов. Понятие “репрезентативная выборка”, с успехом применяющееся в биологии, годится только для установления варианта нормы строения (нормы функционирования и пр.) в том случае, если эта норма ярко выражена и не более того. Так, при ревизии вариантов строения крестца в семействе жаб (*Bufo*idae), мы столкнулись с описанием видов, у которых индивидуальная изменчивость так высока, что установить норму строения у этих видов пока не удалось, т.к. исследованные выборки были слишком малы (Коваленко, Данилов, 2006).

Приведенные данные в свое время поразили мое воображение – если изменчивость ограничена и закономерна настолько, что можно выделить правило ее проявления для вида (имеются даже определенные частотные соотношения между известными вариантами), то откуда тогда берутся новые варианты норм в эволюции, если их источником является изменчивость?

Возможный вариант ответа на этот вопрос дают наши данные по сравнительному анализу “поведения” нормы и изменчивости в условиях “эффекта нормы” и в условиях “массовых аномалий”.

Дальнейшее изложение фактических данных базируется на данных о норме и изменчивости посткраниального скелета у лабораторной гладкой шпорцевой лягушки.

Правило изменчивости крестца в сериях НК шпорцевой лягушки

Напомним, что серии НК (нормальные конечности) – пример развития группы особей с “эффектом нормы” основных признаков (в том числе, парных конечностей и их поясов). То есть общий характер органогенеза типичен для данного вида. В этих сериях отмечено (как будет показано далее) не только ярко выраженное нормальное строение крестца (рис. 3а), но и определенное правило его изменчивости; и оно одинаково для всех таких серий.

Это правило хорошо прорисовывается в суммарном спектре изменчивости крестца всех серий НК *X. laevis* (рис. 2а). Видно, что кроме нормы (620 экз. из 680-ти исследованных) в спектре заполнены еще 16 ячеек, представляющие варианты индивидуальной изменчивости и показывающие их частоты. То есть, несмотря на довольно высокую изменчивость по показателю “доля аномальных особей” (9%), потенциальные возможности (Sp) этого вида много меньше, чем таковые отряда (Sp X.l. = 23 вариантов, Sp Anura = 46 вариантов). Интересно, что потенциальная изменчивость этого вида существенно меньше, чем возможности других видов. Например, Sp R.t. (*Rana temporaria*) = 40 вариантов из тех же 46-ти возможных (Коваленко, 1996а, 2000). При этом показатель “доля аномальных особей” у травяной лягушки существенно ниже, чем у шпорцевой лягушки (3–4%).

Спектр потенциальных возможностей шпорцевой лягушки легко вычислить, так как хорошо выражены ограничения на заполнение целых строк или крупных блоков ячеек в правой и левой частях спектра (рис. 2а). Эти комбинации выводятся за рамки потенциальных возможностей изменчивости данного вида. “Пустые” ячейки, особенно во всей строке или во всем столбце, рассматриваются как запреты на комбинации (или как варианты с очень низкой вероятностью воспроизведения). Другие строки спектра заполнены в разной степени: одни полностью, другие частично. Не полностью заполненные строки или столбцы (ячейки закрашены, но в них не проставлены частоты) включаются в спектр потенциальной изменчивости вида. Предполагается, что эти варианты могут проявиться при увеличении выборки (это потенциальные возможности вида). Итак, пустые ячейки – запреты (ограничения), ячейки с цифрами – реально встреченные варианты, все закрашенные ячейки – потенциальные возможности вида.

Прежде всего, следует установить правило спектра изменчивости данного вида – правило заполнения спектра его потенциальной изменчивости реальными вариантами. Спектр показывает (рис. 2а), что его правая часть заполнена более полно, чем левая. Частоты встречаемости многих вариантов правой части существенно выше, чем вариантов левой части. Иными словами, спектр резко асимметричен

вправо. Для основной цели статьи этого определения достаточно, но можно эту информацию немного развернуть, чтобы показать, что это значит.

У этого вида ярко выражена тенденция к смещению крестца назад от обычного IX позвонка (тенденция к заполнению правой части спектра). При этом хорошо выражены запреты на подвижное сочленение каудальных элементов осевого скелета (две нижние строки правой части спектра совсем не заполнены). Варианты смещения крестца вперед (на VIII-ой позвонки и более передние позвонки) — редки (левая часть спектра). При этом хорошо выражены запреты на подвижное сочленение с уростилем (2 незаполненные строки левой части спектра). Более подробный анализ спектра дает и другую информацию (см. Коваленко, 2003а).

Итак, спектр реальной изменчивости крестца у этого вида в норме (серии НК) асимметричен вправо (рис. 2а). И что особенно важно — это правило сохраняется для всех исследованных серий НК (всего 10 серий; таблица). Исключение составляет всего один случай — серия № I-II-92 (рис. 2д), который показывает симметричный спектр изменчивости крестца. Интерпретация этого факта будет дана дальше. Более того, изменчивость крестца и у *других исследованных видов* при развитии группы с эффектом нормы признаков показывала стабильность правила спектра (Коваленко, 2000) — для потомства от разных производителей в лаборатории, для выборок из разных природных популяций, для разных возрастных групп.

По этим данным напрашивался вывод об ограниченности и даже постоянстве изменчивости в условиях нормального (самого распространенного) для вида хода развития. Но этот вывод противоречил одному из важнейших положений дарвинизма (и его более поздним производным) — о неограниченной и незакономерной изменчивости. Кроме того, возникал целый ряд вопросов, на которые теоретически ответить однозначно было нельзя. Как меняется норма, если изменчивость ограничена? Как при смене нормы ведет себя правило изменчивости? Что раньше меняется — норма или правило изменчивости? Но получение эмпирических данных для анализа этих вопросов казалось невозможным. Как зафиксировать момент перехода от одной нормы к другой? Да еще предусмотреть получение материала по фоновой изменчивости в этот момент? Ведь мы не можем прямо наблюдать процесс эволюции. А палеонтологическая летопись не может предоставить данные такой точности (в ней фиксируется в основном норма строения на данный момент времени). Данные для анализа поступили со стороны явления массовых аномалий (явление МА).

Фактические данные по соотношению нормы и изменчивости посткраниального скелета у бесхвостых амфибий при развитии группы с эффектом массовых аномалий

Правило изменчивости крестца в условиях массовых аномалий (абберрантного развития конечностей)

Само явление МА известно давно (и в природных популяциях, и как результат экспериментов), но долгое время оно интересовало ученых только в отношении его причин, в частности, его наследственной природы (см. Коваленко, 2000а). Мы, столкнувшись с таким явлением в лаборатории (без применения специальных воздействий), сосредоточили свое внимание на его следствиях.

Явление массовых аномалий конечностей у шпорцевой лягушки (синдром АК — аномалии конечностей) было зарегистрировано в потомстве от внешне нормальных производителей и проявлялось следующим образом. Либо в нарушении строения только передних конечностей и их пояса (особи АПК-N — аномалии передних конечностей и/или их пояса, при нормальном строении задних), либо в нарушении строения и передних, и задних конечностей (особи АПК-АЗК). Обозначим особей с внешне нормальным строением всех конечностей и их поясов, как особей N-N.

Все исследованные серии были разделены по степени проявления синдрома АК, и для каждой из них был проведен анализ нормы крестца и правила его изменчивости.

1. Серии НК (нормальное строение конечностей) — группы, в которых встречаются только особи N-N (рис. 4а). В группе ярко выражена норма строения крестца, типичная для вида, а также правило изменчивости крестца, описанное выше. Спектр изменчивости их крестца всегда резко асимметричен вправо (рис. 2а).

2. Серии АПК (1-ая стадия проявления синдрома) — группы, в которых значительная часть особей демонстрирует нарушения строения только передних конечностей и их пояса (особи АПК-N; рис. 4б—д), но часть потомков могут быть внешне нормальными (особи N-N; рис. 4а). В таких сериях у всех особей сохраняется норма строения задних конечностей и таза, хорошо выражена норма строения крестца (типичная для вида), но правило изменчивости крестца этих серий меняется (рис. 2б). Диапазон изменчивости крестца сокращается (за счет вариантов правой части спектра) и спектр становится более симметричным.

3. Серии АПК + АПЗК (2-ая стадия синдрома) — группы, в которых большая часть аномальных представлена особями АПК-N (рис. 4б—д), часть — особями АПК-АЗК (рис. 4е) и небольшая часть особей внешне нормальными потомками — особями N-N. В этих сериях норма строения таза и задних конечностей все еще соответствует типичному для вида

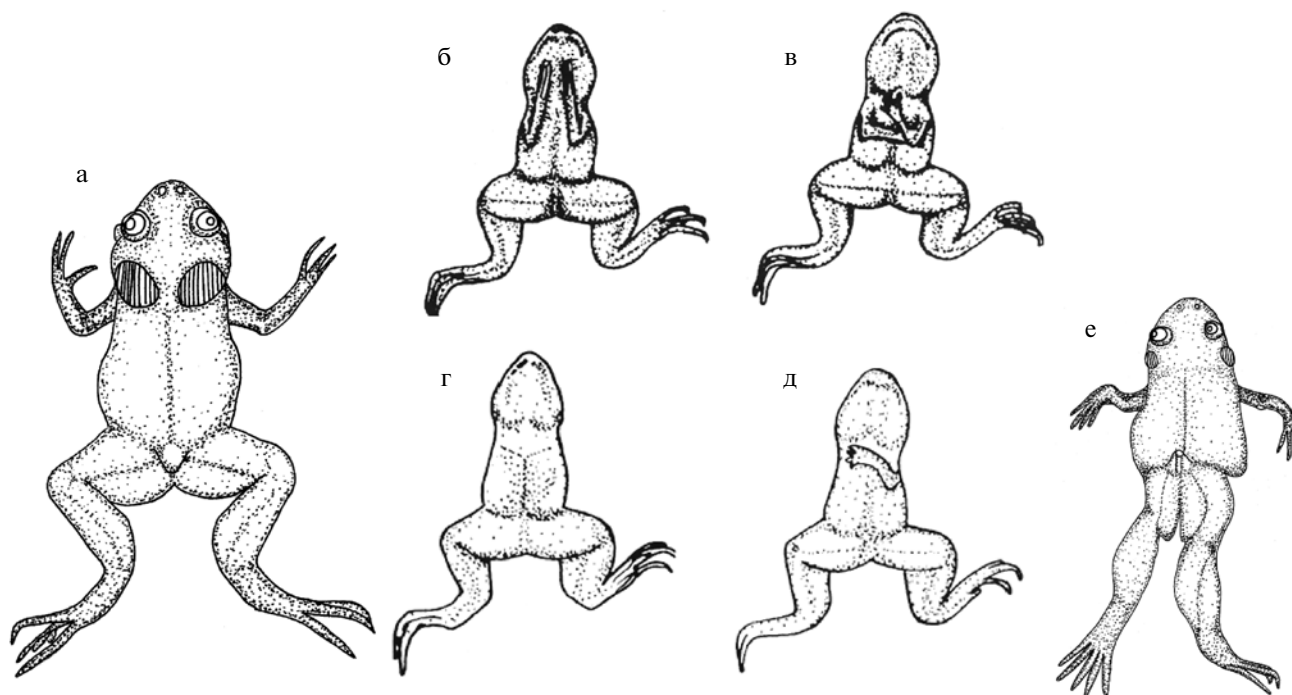


Рис. 4. Внешний вид постметаморфозных особей *X. laevis* из разных серий. а – особь N-N; б–д – особи АПК-N; е – особь АПК-АЗК.

строению; особи с редукцией таза и аномалиями задних конечностей еще редки. Типичная для вида норма крестца (рис. 3а) еще выражена, хотя частота ее немного падает. А вот правило изменчивости уже существенно отличается от того, которое наблюдается в сериях НК (рис. 2в). Спектр этих серий становится явно асимметричным влево (т.е. большую вероятность имеют варианты со смещением крестца вперед).

4. Серии АПЗК (максимальная стадия проявления синдрома) – группы, в которых все особи имеют нарушения в строении передних и задних конечностей (и/или их поясов). Преобладают особи АПК-АЗК (рис. 4е), в части серий встречаются только единичные особи АПК-N (рис. 4б–д), а особи с нормальным строением конечностей (N-N; рис. 4а) не встречаются вовсе. То есть в этих сериях исчезает бывшая норма строения, как передних, так и задних конечностей и их поясов (см. подробнее Коваленко, Кружкова, 2000). Кроме того, изменяется норма строения крестца – преобладающим вариантом становится редуцированный крестец (рис. 5г) – крестцовые отростки отсутствуют (обычно с двух сторон тела, редко – с одной стороны). Варианты двухстороннего крестца становятся вариантами индивидуальной изменчивости. Всего исследовано 128 экз., и только 43 из них имели двухсторонний крестец. Правило спектра двухстороннего крестца этих серий (рис. 2г) меняется на прямо противоположное по сравнению с таковым в сериях

НК (рис. 2а) – спектр этих серий становится резко асимметричным влево.

Из этой классификации серий выпадает потомство одной пары производителей (внешне нормальных производителей) – серия № I-II-92. Все потомки этой пары (от данного спаривания) тоже демонстрировали внешне нормальное строение конечностей и их поясов (все они особи N-N; рис. 4а), т.е. формально относятся к сериям НК. Однако ряд особенностей приближает эту группу к сериям АК. Во-первых, в той группе отмечены сразу 3 особи (3.3%), у которых крестец редуцирован: у двоих есть только один крестцовый отросток (рис. 5в), у одной – отсутствуют оба (рис. 5б). Такое строение крестца ранее отмечалось нами только в связи с нарушением строения задних конечностей и таза: 1) в составе синдрома АК – в качестве правила строения (рис. 5г); 2) при развитии группы с эффектом нормы признаков – как исключительно редкое явление – менее 0.01% (Kovalenko, Danilevskaya, 1994). Во-вторых, правило спектра изменчивости крестца этой группы заметно отличается от такового для всех остальных серий НК (сравнить рис. 2а и 2д), но сходно с правилом, характерным для первых стадий синдрома АК (сравнить рис. 2б, в и 2д), – спектр симметричен.

Эти факты наталкивали на заключение, что правило изменчивости может меняться еще до того, как изменилась норма строения. Теоретически, скорее можно было ожидать другое – сначала должна меняться норма, и только вслед за ней должен

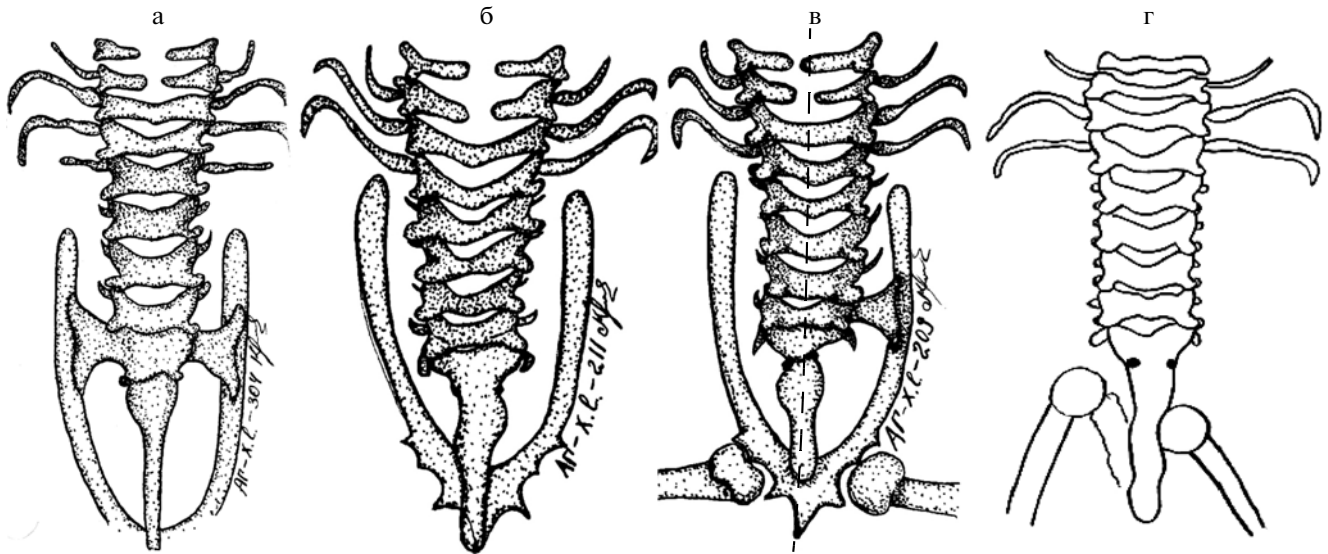


Рис. 5. Варианты строения крестцового отдела у постметаморфозных особей *X. laevis*. а – из серий НК; б – из серии I-II-92; в – из серий с максимальной стадией проявления синдрома АК.

меняться характер изменчивости (если он вообще может меняться). Поэтому нами был проведен специальный анализ – анализ характера изменчивости крестца у особей N-N из разных типов серий (НК, АПК, АПК + АЗК; в сериях АПЗК – таких особей нет). Напомним, что N-N – это особи, у которых и передние, и задние конечности (а также их пояса) внешне развиты нормально. Результаты этого сравнения показали, что правило изменчивости крестца особей N-N из разных типов серий закономерно меняется – в зависимости от того, из каких серий они происходят. Чем больше сама группа отклоняется от нормального развития, тем больше спектр изменчивости ее внешне нормальных представителей отклоняется от типичного для ее вида. Спектр изменчивости группы сначала становится симметричным (для серий АПК; рис. 2е), а затем – явно асимметричным вправо (для серий АПК + АПЗК; рис. 2в). То есть группы внешне одинаково нормальных особей из разных серий показывают разные тенденции изменчивости крестца в зависимости от степени проявления синдрома в серии, к которой они принадлежат.

Обратим внимание, что факт связи между строением крестца и строением задних конечностей (и таза) не вызывает удивления. Ведь развитие этих структур происходит в непосредственной близости друг от друга (в последнем туловищном сегменте). Связь между нормой строения крестца и характером его изменчивости тоже можно было предполагать, хотя это и противоречит предполагаемому фундаментальному свойству изменчивости в рамках дарвинизма (неограниченность и неопределенность). Но корреляция между характером изменчи-

вости крестца и строением передних конечностей (в сериях АПК и АПК + АЗК) не может не удивлять.

Реально норма строения конечностей и их поясов, а вслед за ними и норма крестца меняется, казалось бы, резко (даже скачкообразно), но этому предшествует более постепенное изменение правила изменчивости крестца. Очевидно, что изменению нормы строения конечностей и их поясов предшествует изменение общего хода онтогенеза. Возникает предположение, что изменчивость крестца прежде его нормы (и даже прежде нормы конечностей) реагирует на изменение общего хода онтогенеза – правило изменчивости меняется до того, как изменится их норма (см. подробнее Коваленко, 2007). Это принципиально новые факты о свойствах изменчивости. И они позволяют предположить, что изменчивость может служить весьма тонким индикатором изменения способа онтогенеза, что, в свою очередь, является первым шагом к изменению нормы в эволюции (т.е. к видообразованию).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные данные можно сделать следующие заключения:

1. Норма строения (важнейшая характеристика видов, и более высоких таксонов) представляет собой наиболее вероятный, но не единственный из возможных результатов *нормального развития группы*. Ее высокая частота при ограниченной плодовитости не позволяет реализоваться всем потенциальным возможностям одновременно и маскирует от наблюдателя весь возможный диапазон потенциальной изменчивости. Поэтому ставшие в биологии

традиционными “репрезентативные выборки” могут служить только для анализа устойчивости нормы (у данного вида, только в данный момент и только в данном месте).

2. Как индивидуальная, так и межвидовая изменчивость закономерны и ограничены – они подчиняются определенному правилу (*правилу спектра изменчивости* межвидовой или индивидуальной). Поэтому для выявления полного диапазона индивидуальной изменчивости (данной структуры и у данного вида) и анализа его закономерностей необходимо использовать специальные методы сбора материала (условия составления выборок для анализа), которые учитывают *правило спектра изменчивости*.

3. Норма строения может сменяться скачкообразно (или даже *должна* меняться именно так). Это означает, что норма консервативна и продолжает воспроизводиться какое-то время уже после того, как параметры онтогенеза изменились. Иными словами, развитие с эффектом нормы признаков еще не является гарантией стабильности вида (например, в данной популяции и в данное время).

4. Смене нормы (в данном случае крестца) предшествует изменение правила его изменчивости. Правило изменчивости более тонко реагирует на изменение общего характера онтогенеза, чем норма строения. Потомство внешне нормальных для вида производителей может постепенно менять правило изменчивости, а *вслед за этим* резко менять норму строения.

5. Массовые аномалии могут служить одним из модельных объектов для анализа возможных отношений между нормой и изменчивостью в эволюции.

Суммируя эти положения, вытекающие из фактических данных, можно *предположить*, что эволюция есть скачкообразная смена норм строения, которой предшествует постепенное изменение хода онтогенеза и постепенное изменение правила изменчивости. В то время как в дарвинизме (и его производных) постулируется очень постепенная смена норм и постоянно неограниченная изменчивость.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ²

- Детлаф Т.А., Руднева Т.Б., Шпорцевая лягушка *Xenopus laevis* // Объекты биологии развития. М.: Наука. 1975. С. 392–440.
- Дарвин Ч., Происхождение видов // Собр. соч. Т. 1. М.: Изд. Ю. Лепковского, 1907. С. 65–431.
- Воронцов Н.Н., Развитие эволюционных идей в биологии. М.: КМК, 2004. 432 с.
- В тени дарвинизма, Альтернативные теории эволюции в XX веке. Сб. научн. трудов. СПб.: Fineday press, 2005. 248 с.
- История биологии, с древнейших времен до начала XX века / Под ред. С.Р. Микулинского. М.: Наука, 1972. 563 с.
- Коваленко Е.Е., Аномалии позвоночника бесхвостых амфибий // СПб. 1992. С. 1–142.
- Коваленко Е.Е., Анализ изменчивости крестца Anura. 1. Метод анализа изменчивости крестца бесхвостых амфибий // Зоол. журн. 1996. Т. 75. Вып. 1. С. 52–66.
- Коваленко Е.Е., Анализ изменчивости крестца Anura. 2. Изменчивости крестца у представителей рода Rana // Зоол. журн. 1996а. Т. 75. Вып. 2. С. 222–236.
- Коваленко Е.Е., Изменчивость посткраниального скелета бесхвостых амфибий. Автореф. дис. на степень докт. биол. наук. СПб.: ЗАО “Познание”. 2000. 117 с.
- Коваленко Е.Е., Массовые аномалии конечностей у бесхвостых амфибий // Журн. Общей биол. 2000а. Т. 61. № 4. С. 412–427.
- Коваленко Е.Е., Эффект нормы признака и его теоретическое значение // Эволюционная биология: история и теория. Вып. 2. С. 66–87 / Под ред. Э.И. Колчинского, И.Ю. Попова. СПб, 2003. 218 с.
- Коваленко Е.Е., Изменчивость крестца у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Pipidae) при нормальном морфогенезе конечностей // Зоол. журн. 2003а. Т. 82. № 10. С. 1222–1238.
- Коваленко Е.Е., Изменчивость крестца у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Amphibia, Anura) при aberrантном морфогенезе конечностей // Зоол. журн. 2007. Т. 86. № 1. С. 66–80.
- Коваленко Е.Е., Данилевская С.Э., Экспериментальное получение аномалий позвоночника у бесхвостых амфибий. 1. Развитие личинок. 2. Аномалии позвоночника // Вестн. Ленингр. ун-та. 1991. Вып. 2. № 1. С. 11–23.
- Коваленко Е.Е., Данилов И.Г., Разнообразие крестцово-уростильного отдела в семействе Bufonidae (Amphibia, Anura). 1. Фактическое разнообразие крестца у буфонид // Зоол. журн. 2006. Т. 85. № 4. С. 500–516.
- Коваленко Е.Е., Данилов И.Г., Разнообразие крестцово-уростильного отдела в семействе Bufonidae (Amphibia, Anura). 2. Анализ разнообразия методом спектров // Зоол. журн. 2006 а. Т. 85. № 6. С. 725–740.
- Коваленко Е.Е., Кружкова Ю.И., Аномалии задних конечностей у лабораторной шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Anura, Pipidae). 1. Феномен массовых аномалий // Вестн. СПб ун-та. 2000. Сер. 3. Вып. 1. № 3. С. 3–21.
- Коваленко Е.Е., Кружкова Ю.И., Аномалии задних конечностей у лабораторной шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Anura, Pipidae). 3. Характеристика спектра изменчивости // Вестн. СПб ун-та. 2001. Сер. 3. Вып. 3. № 3. С. 3–17.
- Коваленко Е.Е., Попов И.Ю., Новый подход к анализу свойств изменчивости // Журн. общ. биол. 1997. Т. 58. № 1. С. 70–83.

² В статье сделаны ссылки в основном на работы самого автора и его соавторов, что продиктовано стремлением дать как можно больше фактических данных в ограниченном объеме. Но в приведенных источниках содержится более подробная информация и о данных автора, и о других источниках информации, на которые автор опирался.

- Ламарк Ж.Б., Избранные произведения. М.: Изд-во АН СССР, 1955. Т. 1.
- Назаров В.И., Эволюция не по Дарвину: смена эволюционной модели. М.: Ком Книга, 2005. 520 с.
- “Объекты биологии развития”, М.: Наука, 1975.
- Татаринов Л.П., Очерки по теории эволюции. М.: Наука, 1987. 250 с.
- Чайковский Ю.В., Эволюция. Вып. 22. “Ценологические исследования”. М.: Центр системных исследований – ИИЕТ РАН, 2003. 472 с.
- Шишкин М.А., Индивидуальное развитие и уроки эволюционизма // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 3. С. 179–198.
- Dubois A., Anomalies and mutations in natural populations of the *Rana “esculenta”* complex (Amphibia, Anura) // Mitt. Zool. Mus. Berlin. B. 1979. 55. H.1. S. 59–87.
- Fowler L.F., Control of vertebral members in teleosts – an embryological problem // Quart. Rev. Biol. 1970. Vol 45. P. 148–176.
- Gould S.J., Eldredge N., 1993. Punctuated equilibria comes of age // Nature. Vol. 366. P. 223–227.
- Kovalenko E.E. and Danilevskaya S.E., On unique forms of anomalous sacral structure in tailless amphibians // Rus. J. Herpetol. 1994. Vol. 1. № 1. P. 30–36.
- Wassersug R.J., A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates // Stain. Techn. 1976. V. 51. P. 131–134.

Properties of Norm and Variability

E. E. Kovalenko

Faculty of Soil Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia
e-mail: kovalenko_j@mail.ru

Abstract—Data of the authors from many years on the two ways of development of a group of offspring of tailless amphibians—development with the effect of the norm of characteristics and development with the effect of mass anomalies of a number of characteristics—are summarized. Mass anomalies of limbs in the African clawed frog *Xenopus laevis* were obtained in laboratory (without using any special influences). They represent a syndrome when the structure of limbs and their girdles, as well as the sacral part of the spine, change correlatively. The syndrome has several stages of manifestation (according to the degree of intensification of deviations from the norm). The maximum manifestation of the syndrome produces a change in the norm of the structure of the sacral part. It was shown that change in the rule of its variability precedes change in the norm of the structure of the sacrum. Not having an opportunity of observing the process of evolution directly (change in norms on the large scale of time), we have to use any data (even indirect), which can give us information on how the change in the norm takes place and what happens to the variability.

УДК 597.828:591.34

КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ *R. arvalis*. ЧАСТЬ 1: ЛИНЕЙНЫЕ РАЗМЕРЫ ЗАРОДЫША¹

© 2011 г. Е. А. Северцова, А. С. Северцов

Московский государственный университет им М.В. Ломоносова,
119899 Москва, Ленинские горы

E-mail: Severtsova@mail.ru

Поступила в редакцию 27.01.2010 г.
Окончательный вариант получен 13.09.2010 г.

Постадийный анализ изменения значений коэффициентов вариации признаков, характеризующих линейные размеры зародыша остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nills.), позволил выявить критические периоды в эмбриональном развитии этого вида. Эти критические периоды соответствуют стадиям поздней гастролы (18–20 стадии), стадии вылупления личинок из оболочек (32–33 стадии) и, по-видимому, стадии начала метаморфоза (39 стадия). Однако процесс формирования хвостовой пластины, в частности, значимость ее ширины, становится критическим на 34-й стадии развития, когда наблюдается переход головастика от прикрепленного к свободноплавающему образу жизни. Эти данные позволяют предположить, что адаптивные преобразования в эмбриогенезе происходят как раз во время критических периодов развития (в понимании П.Г. Светлова) или на узловых стадиях (в понимании В.Г. Черданцева) и могут определять эволюцию не только всего зародыша в целом, но и его отдельных структур, несущих самостоятельную функциональную нагрузку. На межзловых стадиях развития мы наблюдали различия в уровне вариабельности эмбриогенеза между районами с разным характером антропогенной нагрузки.

Ключевые слова: критические периоды развития, изменчивость, *Rana arvalis*.

Исторически термин и понятие “критический период” зародились на рубеже XIX и XX веков в экспериментально-эмбриологических работах по изучению влияния повреждающих факторов окружающей среды на развитие. Эта проблема получила широкое развитие благодаря работам А. Вейсмана. Экспериментируя на личинках и куколках бабочки *Chrysonotus phlaes*, Вейсман (Weismann, 1894) показал, что длительные температурные воздействия, отклоняющиеся от физиологического оптимума, приводят к изменению ряда признаков у взрослых особей. В исследованиях Штандфуса на насекомых был выяснен интересный факт, а именно: “В проведенных экспериментах выявляются строго определенные фазы развития, являющиеся чрезвычайно реакционноспособными по отношению к применяемым факторам” (Standfuss, 1896, с. 324, цит. по Пучков, 1978).

Термин “критические периоды” в 1897 году ввел ботаник П.И. Броунов. Он говорил о периодах наибольшей чувствительности семян злаков, всходов картофеля и иных растений, отмечая, что в эмбрио-

нальном и постэмбриональном развитии происходит смена периодов, во время которых организм стоек к различным воздействиям, на периоды, когда он чувствителен, в равной степени, к действию различных агентов. Работами С.Р. Стоккарда (Stockard, 1907, 1921) и С. Келликота (Kellicot, 1916), проведенными на эмбрионах *Fundulus heteroclitis*, было положено начало серии исследований, так называемых критических периодов в ходе развития эмбрионов позвоночных. Стоккард (Stockard, 1921) “критическими периодами” называл периоды, когда происходит нарушение темпов развития отдельных закладок органов у эмбрионов. Эти представления получили дальнейшее развитие в работах Р. Гольдшмита (Goldschmidt, 1938), создавшего представление о координированной системе скоростей в перемещении клеточного материала, которая особенно легко нарушается в период закладки органов.

Классическими работами по изучению критических периодов развития признаны труды П.Г. Светлова (1960, 1978). Он писал: “Главным признаком, характеризующим критические периоды развития, является высокая чувствительность клеток зародышей к действию внешних агентов, обусловленная пониженной регулятивной деятельностью в эти периоды” (цит. по Светлов, 1960, с. 281). Эмбриологи-

¹ Предлагаемая статья является первой частью серии статей. Часть 2 будет посвящена изучению критических периодов в эмбриогенезе остромордой лягушки на основе анализа размеров головных структур, а часть 3 – на основе пропорциональных характеристик.

ческий смысл критических периодов заключается в том, что в это время происходит детерминация процессов развития до конечного состояния, достигаемого теми или иными единицами развивающейся системы к концу данного этапа онтогенеза. Внешние факторы, к которым особенно велика чувствительность в эти периоды, могут ускорять, замедлять или совсем приостанавливать развитие (Токин, 1987). Принято считать, что у низших позвоночных одним из таких критических периодов является стадия гастролы, а у млекопитающих — стадия бластоцисты, в период ее имплантации в стенку матки (Светлов, 1978). Однако выявление этих периодов проводилось на основе оценки увеличения числа проявляющихся в фенотипе нарушений морфогенеза в ответ на воздействие факторов окружающей среды. Иной подход был применен Дорфманом и Черданцевым, в работах которых был введен термин “узловые стадии развития” (Дорфман, Черданцев, 1977). И хотя, по мнению авторов, “они (т.е. узловые стадии) должны соответствовать так называемым “критическим периодам развития” (с. 167), их выделение основано на оценке варибельности нормального развития зародышей.

Проведенные ранее исследования по изучению влияния антропогенного загрязнения нерестовых водоемов на эмбриогенез бесхвостых амфибий показали, что при анализе морфометрии развития зародышей можно выявить стадии, для которых значения коэффициентов вариации оказываются близкими для разных кладок (Северцова, 2002). Это соответствует понятию “узловые стадии развития”, т.е. стадии, где происходит “сглаживание индивидуальных вариаций морфологии и зародыш приобретает более или менее стандартное строение...” (Дорфман, Черданцев, 1977, с. 167). Тем не менее, выделение критических периодов или узловых стадий на постгастролационных этапах развития не проводилось.

Задачей данного исследования было выявление критических периодов (или узловых стадий) в развитии остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nills.) с использованием метода оценки варибельности морфогенеза. Кроме того, нас интересовал вопрос о влиянии такого эволюционно нового фактора окружающей среды, как антропогенное загрязнение нерестовых водоемов, на характер динамики изменчивости эмбриогенеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на эмбрионах остромордой лягушки *Rana arvalis* Nills., собранных на нулевой стадии развития из водоемов двух районов города Москвы и подмосковного водоема. В районе Южное Бутово из водоема, расположенного на окраине Битцевского парка, примерно в полукilометре от внешнего кольца МКАД, были взяты пробы от 6 кладок. Водоем представляет собой глубо-

кую яму, заполняемую талой водой и содержащую большое количество бытового и промышленного мусора (полиэтиленовые пакеты, автомобильные покрышки и т.п.). Второй водоем располагался в районе Востряково, в 200 метрах от внутреннего кольца МКАД, рядом с бензозаправкой. Этот водоем является постоянным, пополняемым как за счет талой воды, так и за счет воды, поступающей из соседних, более крупных прудов. Из него были собраны пробы от 6 кладок. Третий водоем, из которого осуществлялся сбор проб икры остромордой лягушки от пяти кладок, расположен в 50 км к западу от Москвы, на территории Звенигородской биологической станции МГУ, рядом с деревней Луцино. Этот водоем представляет собой зарастающее болото с достаточно кислой водой (рН 5.2).

Пробы икры, объемом около 100 икринок от каждой кладки, переносились в лабораторию и помещались в кристаллизаторы с водой из нативных водоемов. Температура воды поддерживалась в пределах 15–19°C. Стадии развития определялись согласно таблицам Дабагян и Слепцовой (1975), разработанным для травяной лягушки, но часто применимым и для развития остромордой лягушки. Каждые 3–4 часа по 10–15 зародышей, развивающихся в кристаллизаторах, фотографировали при помощи фотокамеры, установленной на бинокляре фирмы Zeisse. На стадиях от 33–34-й до 39-й головастиков фиксировали каждые 3–4 ч по 10–15 штук. По достижении 39-й стадии эксперимент прекращали и фотографировали фиксированных зародышей.

На основе полученных фотографий, с помощью программы Axio Vision (Zeisse) проводились промеры зародышей по следующим признакам (рис. 1). У зародышей до стадии поздней нейрулы измерялся апико-базальный диаметр икринки ($D1$), что позволяло сопоставить эти промеры с промерами общей длины зародыша (Lo), полученными для более поздних стадий. На стадиях, начиная со стадии хвостовой почки, помимо Lo , отдельно измерялась длина тела зародыша (Lb), от наиболее выступающей части головы до анального отверстия; длина хвостовой пластины (Lx), от анального отверстия до конца хвостовой пластины; и ширина хвостовой пластины (Wx), по наиболее широкой части середины хвостовой пластины.

Полученные данные обрабатывались при помощи программ Excel и Statistica 6.0. Рассчитывался коэффициент вариации для каждой стадии каждой кладки. На основе однофакторного дисперсионного анализа вычислялся коэффициент внутриклассовой корреляции по Фишеру (η^2 (%)), с помощью которого определялась доля (в %) внутрикладочной и межкладочной изменчивости.

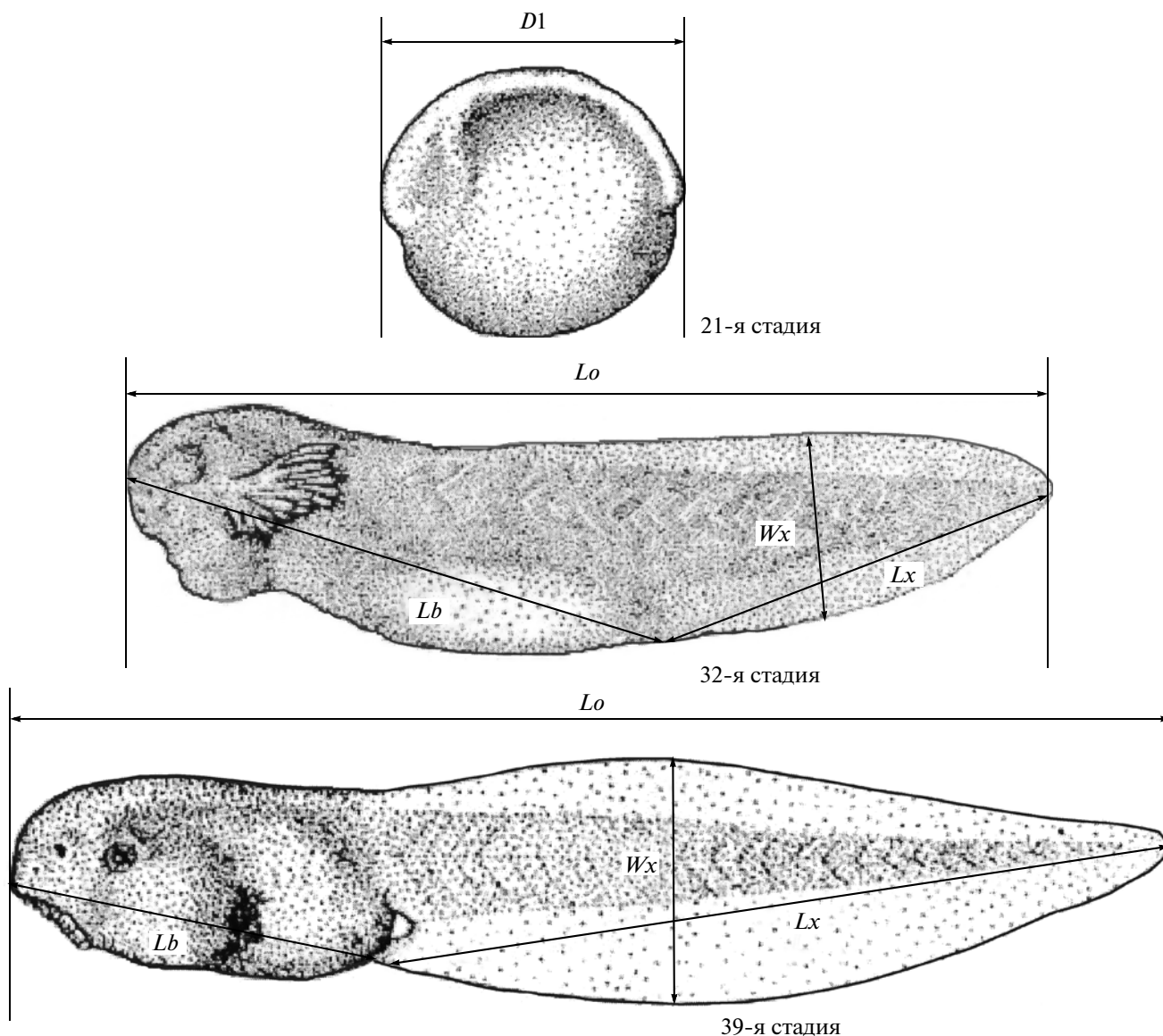


Рис. 1. Морфометрические признаки на примере трех стадий развития остромордой лягушки (*Rana arvalis*). Обозначения признаков см. в тексте.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе экспериментальной работы нами регистрировались случаи возникновения аномалий развития и гибели зародышей (рис. 2). Две кладки из районов Луцино (№ 5) и Бутово (№ 6) погибли полностью на стадиях поздней гастролы (16–19-й стадии развития). Поскольку аномалии, которые мы фиксировали, в природных условиях не совместимы с жизнью, мы объединили имеющиеся данные в единый показатель “смертность”. Наиболее высокий показатель такой “смертности” наблюдался в кладках из района Бутово. Так, пик “смертности” наблюдался на стадиях 32–33 в четырех кладках и составлял от 2 до 30%. В дальнейшем развитии “смертность” не велика, менее 2%, и только к

39-й стадии развития присутствовала в трех кладках и составляла от 2 до 5%. Среди зародышей из района Луцино “смертность” наблюдалась в меньшей степени, но, как и для зародышей из района Бутово, проявлялась в определенные периоды развития. Так, в кладках № 1 и № 4 смертность на 17-й стадии развития составляла около 9–19%, а кладка № 5 в течение двух следующих стадий погибла полностью. Вторым периодом, когда наблюдается “смертность” в кладках, — это вылупление зародышей из оболочек, с максимальным значением на 30-й стадии развития — 26.67%. На 38-й стадии развития в кладке № 1 наблюдается новый пик “смертности”, который составляет всего 9%. В кладках из района Востряково доля погибших и аномальных зароды-

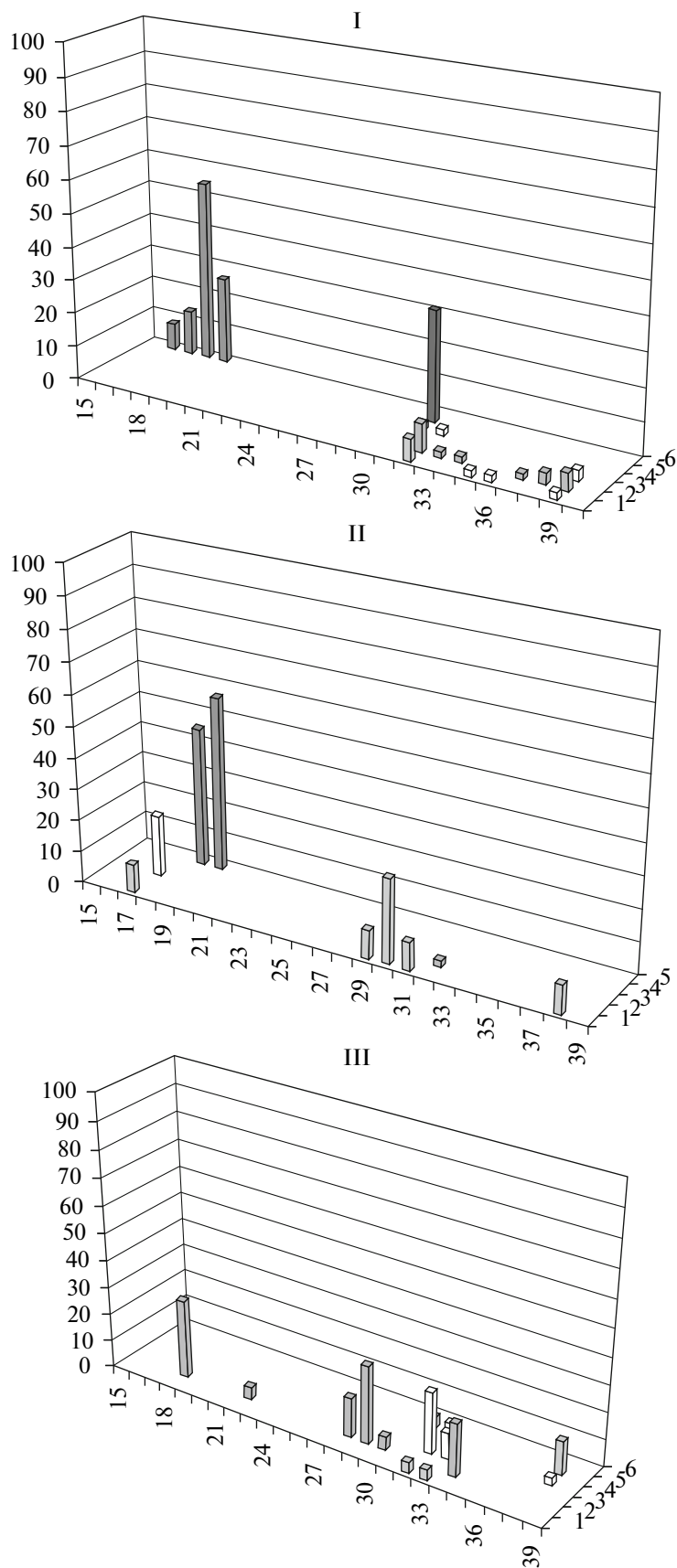


Рис. 2. Постадийная смертность зародышей в кладках остромордой лягушки из района Бутово (I), района Луцино (II) и района Востряково (III). По оси X – номер стадии, по оси Y – доля погибших зародышей (в %), по оси Z – номера кладок.

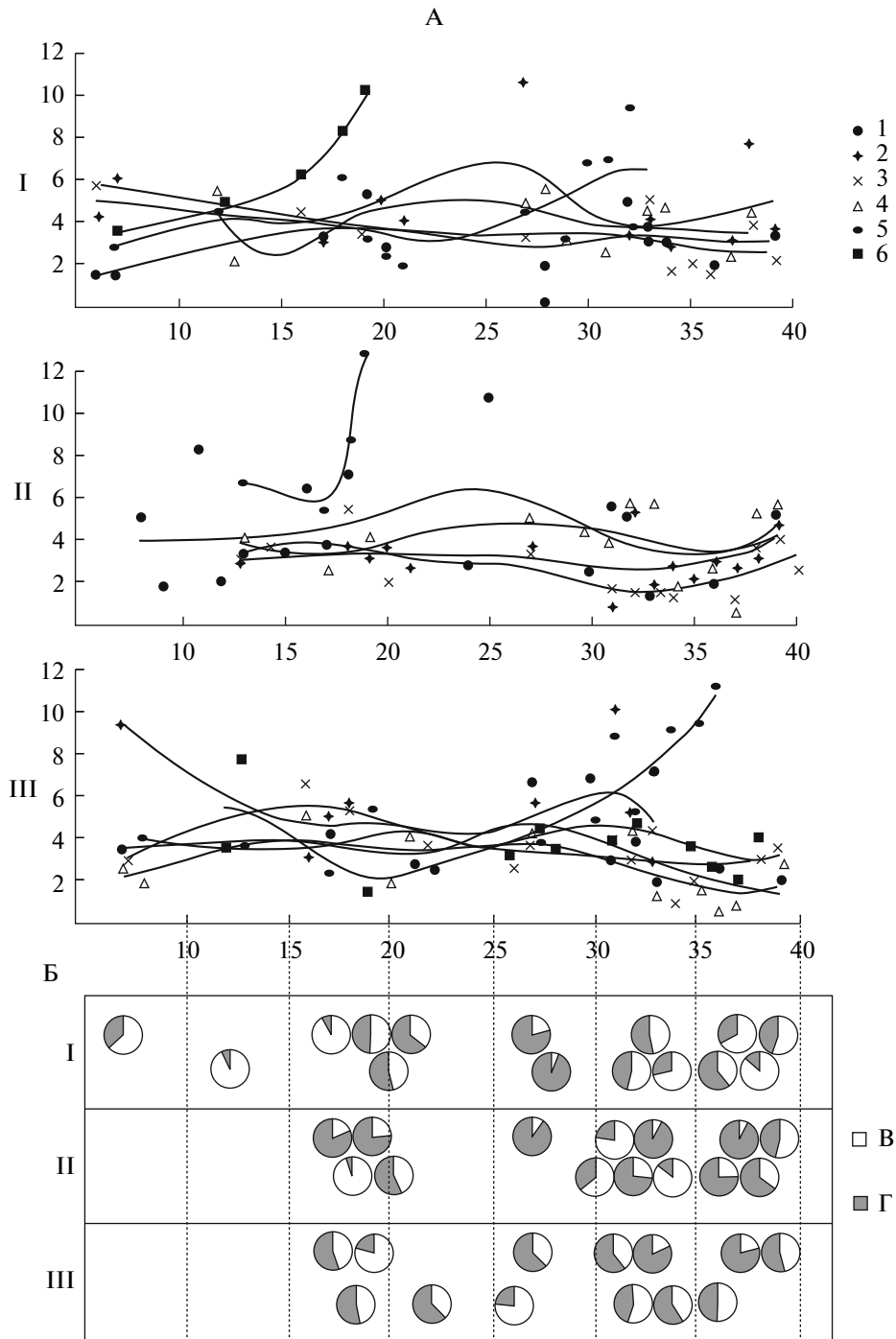


Рис. 3. А – динамика значений коэффициентов вариации (C_v) признака общая длина зародыша (L_o) из районов Бутово (I), Луцино (II) и Востряково (III). По оси X – номера стадий, по оси Y – значения C_v .

Б – постадийная динамика значений коэффициента внутриклассовой корреляции по Фишеру признака общая длина зародыша (L_o) из районов Бутово (I), Луцино (II) и Востряково (III). По оси X – номера стадий. В – доля внутрикладочной изменчивости, Г – доля межкладочной изменчивости.

шей выше, чем из района Луцино, но существенно меньше, чем из района Бутово. На 18-й и с 28-й по 29-й стадию развития в кладке № 2 погибает по 29% эмбрионов, а на стадии 34 – еще 19%. Интересно отметить, что в остальных кладках наблюдается

смертность на 32–33-й стадиях развития, при этом “смертность” невысока и составляет от 4 до 23%. Еще меньший уровень “смертности” наблюдается в двух кладках на 39-й стадии развития и составляет от 2 до 12%.

Анализ динамики изменения значений коэффициентов вариации признака “общая длина зародыша” (L_0) показывает, что имеются два критических периода в развитии эмбрионов из района Бутово, на которых уровень изменчивости этого признака принимает определенные значения (рис. 3А-I). До и после этого этапа значения коэффициентов вариации (C_v) могут быть как выше, так и ниже. Первым критическим периодом является стадия поздней гаструлы (19–20-я стадия развития). Значения C_v для зародышей этой стадии в разных кладках колеблются от 2.7 для кладки № 1 до 5.1 для кладки № 5 (в среднем 3.8). Только для кладки № 6 к 20-й стадии развития значения C_v значительно возрастают до значений около 10.2, и кладка погибает. Второй стадией, значения C_v для которой для всех кладок должны быть примерно одинаковыми, является стадия вылупления (32–33-я стадия). Изменчивость зародышей на этой стадии в разных кладках также колеблется вблизи 4, хотя в разных кладках она может варьировать от 3.1 до 4.9. Только в кладке № 5 значения C_v равно 9.66 на 32-й стадии. Дальше этой стадии кладка не развивалась. Расчеты коэффициентов внутриклассовой корреляции по Фишеру (η^2 (%)), проведенные на основе однофакторного дисперсионного анализа по фактору “кладка”, показали, что во время критического периода развития, т.е. на 19–20-й стадиях и на 32–33-й стадиях наблюдается примерно 50%-й вклад внутрикладочной в общую изменчивость (рис. 3Б-I). На стадиях до 19-й значения внутрикладочной изменчивости высоки, т.е. превышают 63% и доходят даже до 93%. В промежуток между 20-й и 31-й стадиями, наоборот, внутрикладочная изменчивость крайне мала и даже может составлять всего 5%. После “перехода” второго критического периода – 32–33-й стадий, доля внутригрупповой изменчивости снова возрастает до 70–80%.

В развитии зародышей из района Луцино также прослеживаются два критических периода (рис. 3А-II). На стадиях 18–20 среднее значение C_v составляет 4, хотя в разных кладках может колебаться от 3.23 для кладки № 2 до 5.52 для кладки № 3. Для зародышей кладки № 5 значение коэффициента вариации к 20-й стадии развития превышают 12-и кладка погибает. Видимо, эту стадию можно рассматривать, как критическую, поскольку только для этой стадии коэффициент внутриклассовой корреляции приобретает значение приблизительно равное 50% (рис. 3Б-II). Сближение пределов значений C_v наблюдается на стадиях развития после вылупления: к 36-й стадии развития. При этом, изменчивость оказывается низкой (от $C_v = 1.93$ до $C_v = 3.06$). Интересно отметить, что на стадии вылупления мы можем не наблюдать “сближения” кривых динамики коэффициентов вариации по причине общей невысокой изменчивости развития: к 32–33-й стадиям C_v принимает значение, близкое к 4. Отсутствие критических стадий также видно и

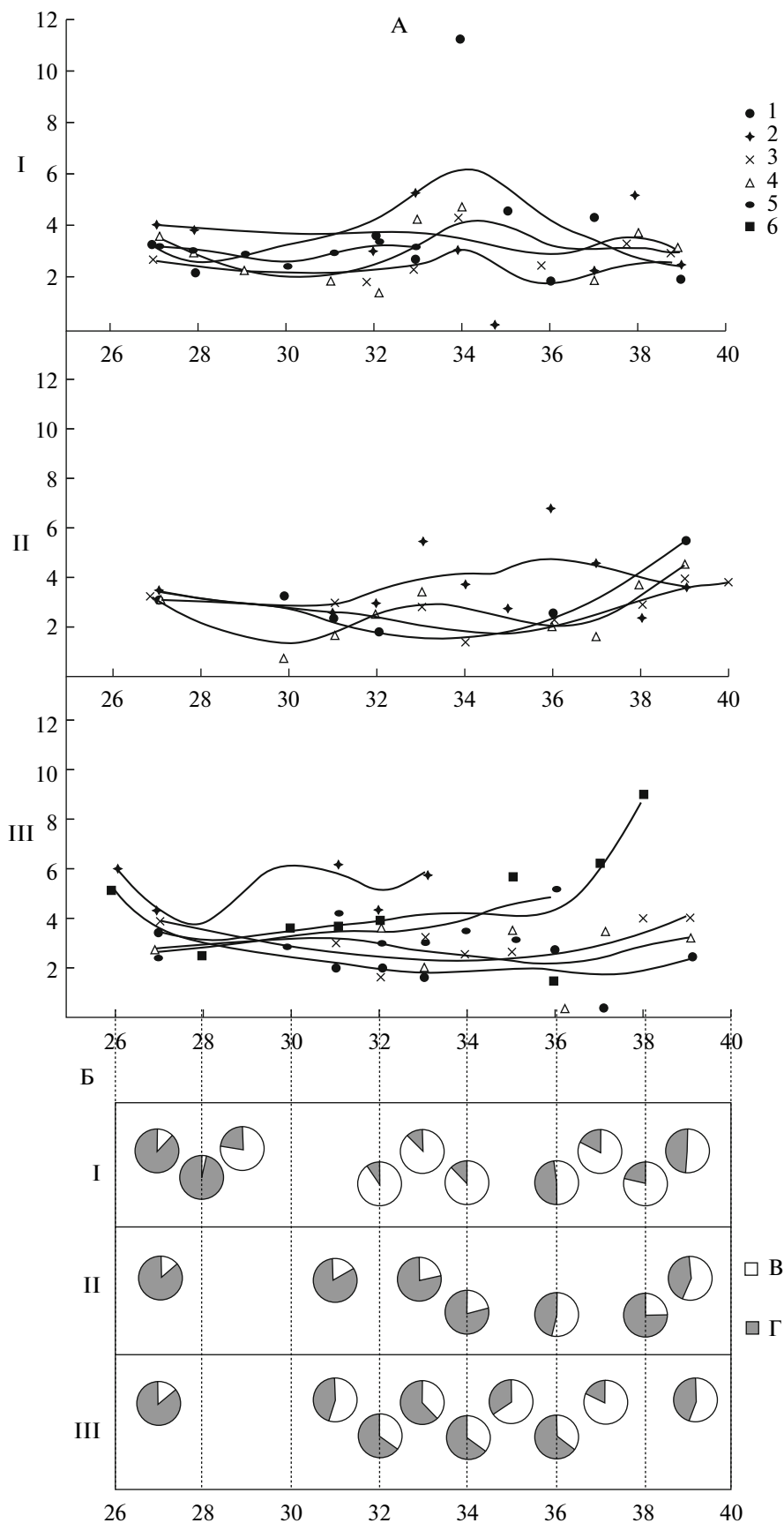
при анализе значений коэффициентов внутриклассовой корреляции, – на всех анализируемых стадиях наибольшую роль играет межкладочная изменчивость.

Высокая вариабельность развития зародышей из района Востряково связана с крайней индивидуализацией динамики изменчивости развития каждой кладки (рис. 3А-III). Так, кладки № 1, 3 и 4 характеризуются ровным развитием, с колебаниями значений C_v в районе 4 на протяжении всего периода наблюдений. Однако в кладке № 2 отмечен изначально высокий уровень изменчивости, который к 18–19-й стадии достигает значений 5.63 и остается примерно таким же до стадии, на которой анализ был прекращен. Обратная картина наблюдается для кладки № 5. Ровное развитие приблизительно до 26–27-й стадии сменяется резким увеличением изменчивости признака L_0 до значений коэффициента вариации 11.3 на 36-й стадии. Видимо, резкое увеличение изменчивости приводит к гибели данной кладки. Значения коэффициентов внутриклассовой корреляции Фишера указывают на два критических периода в развитии эмбрионов остромордой лягушки из района Востряково (рис. 3Б-III). Эти периоды соответствуют стадиям 17–18 и 32–36, что близко к критическим периодам в развитии эмбрионов из района Бутово.

Следует отметить, что для всех трех исследованных районов можно выделить еще одну критическую стадию в развитии – 39-ю стадию, на которой происходит формирование почки задней конечности. К сожалению, поскольку эксперимент был прекращен на этой стадии, не представляется возможным проследить продолжительность этого периода. Однако тот факт, что вне зависимости от условий и характера развития эмбрионов из разных районов исследования мы наблюдаем формирование вариабельности на уровне значения коэффициента вариации, близкого к 4, и примерно 50% вклад внутрикладочной изменчивости, говорит о важности, т.е. критичности, этого периода в эмбриогенезе остромордой лягушки.

Анализ признака “длина тела” (L_b) был проведен у зародышей начиная с 26–27-й стадий развития, когда у эмбрионов развивается хвостовая пластинка (рис. 4А-I). У зародышей из района Бутово вариабельность этого признака невелика. Только в период 32–36-й стадий наблюдается увеличение значений C_v , которое в дальнейшем снижается до уровня менее 4. Анализ значений коэффициентов внутриклассовой корреляции показывает, что на двух стадиях, 36-й и 39-й, значения этого коэффициента близки к 50% (рис. 4Б-I).

Значения коэффициентов вариации у зародышей из района Луцино также практически на всех анализируемых стадиях не превышают 4. При этом, не наблюдается ни на одной из анализируемых стадий схождения линий динамики C_v до какого-либо



определенного значения для всех кладок (рис. 4А-II). Тем не менее, изменения η приобретают значения, близкие к 50% на стадиях 36 и 39, как и у зародышей из района Бутово.

В районе Востряково также наблюдается уровень значений C_v ниже 4 практически на протяжении всего анализируемого периода (рис. 4А-III). Только для двух кладок, № 2 и № 6, значения C_v превышают значения 4, и эти кладки погибли до окончания эмбриогенеза, на 33-й и 36-й стадиях, соответственно. Значения коэффициентов внутриклассовой корреляции по Фишеру демонстрируют две стадии, на которых значения близки к 50%, — это 31-я и 39-я стадии.

Анализ динамики изменения значений коэффициентов вариации признака Lx у зародышей из района Бутово показывает, что вариабельность длины хвостовой пластины выше, чем для признаков Lo и Lb , и может достигать значений больше 20 (рис. 5А-hI). Столь высокая вариабельность, характерная для кладки № 5, видимо, и явилась причиной гибели этой кладки. Для остальных кладок динамика значений C_v имеет схождения к 32–33-й и к 36–37-й стадиям. Однако, в отличие от признаков “общая длина зародыша” и “длина тела”, вариабельность длины хвостовой пластины на стадии вылупления в среднем в два раза выше, и составляет около 8. К стадиям же расплытия с галлерт C_v в среднем близки к 4. Анализ коэффициентов внутриклассовой корреляции по Фишеру (рис. 5Б-I) показывает, что примерно 50% внутрикладочной изменчивости приходится на эти же стадии развития.

Развитие зародышей из Луцино имеет более четкую картину динамики изменчивости признака Lx . Высокая вариабельность на этапе формирования хвостовой пластины сменяется снижением значений C_v к 36-й стадии развития и, по завершении этого периода, для всех исследованных кладок принимает значения в диапазоне от 4 до 6 (рис. 5А-II). Значения коэффициентов внутриклассовой корреляции оказываются приблизительно равными 50% на стадиях 32 и 36 (рис. 5Б-II), хотя только с началом расплытия головастиков C_v в исследованных кладках, в среднем, близок 4. На стадии вылупления он выше и может достигать значений, близких к 9.

Очень схожую картину мы наблюдаем и для зародышей из района Востряково (рис. 5А-III). Только в кладке № 2 на стадии 33 значения коэффициентов вариации снижаются до 2-х, после чего кладка погибает. Для кладки № 5 наблюдается обратная картина — при анализе динамики значений C_v для зародышей характерно постадийное увеличение значений коэффициентов вариации до значений, близких 18, и кладка погибает на 36-й стадии развития. В остальных кладках значения C_v колеблются от 6 до 8.

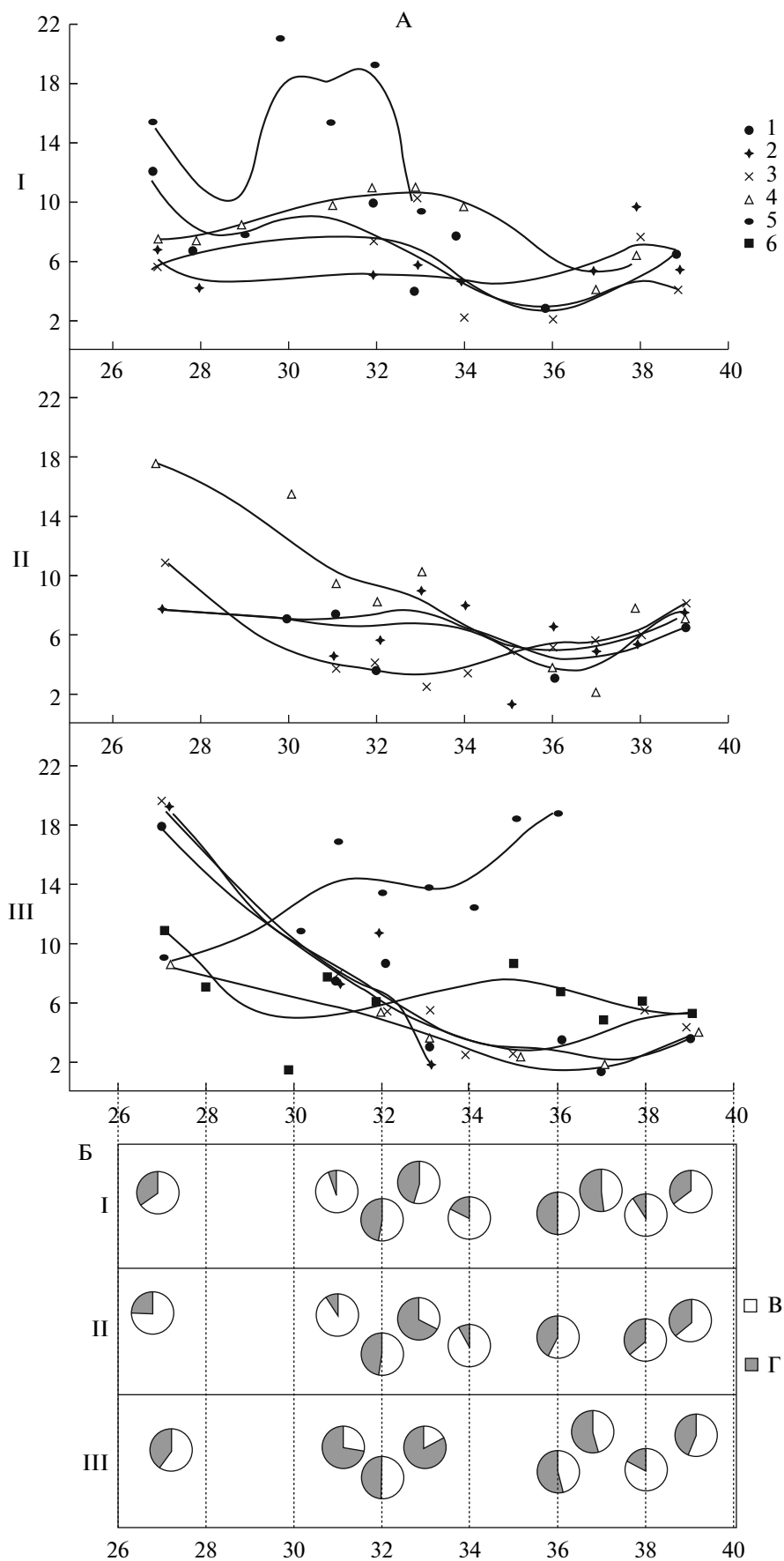
Измерение ширины хвостовой пластины (Wx) проводилось не во всех кладках одновременно с измерением ее длины — этим обусловлены неполные данные для этого признака. Тем не менее, на рис. 6А-I видно, что наиболее вариабельным оказывается процесс увеличения ширины хвостовой пластины у зародышей из района Бутово. Особенно высока изменчивость этого признака в период, когда зародыши вылупились и сидят на галлертах. На этих стадиях эмбриогенеза значения C_v могут быть около 10–17. С началом расплытия, с 34-й по 38-ю стадии развития, изменчивость ширины хвостовой пластины падает, а затем снова возрастает к моменту начала формирования почки задней конечности. Вычисление коэффициентов внутриклассовой корреляции для каждой стадии показало, что на стадиях 34 и 37 значения этого коэффициента примерно равны 50% (рис. 6Б-I).

Зародыши из разных кладок Луцино развиваются по единой схеме: высокая изменчивость на первых этапах формирования хвостовой пластины сменяется снижением вариабельности Wx к стадии расплытия и активной функциональной нагрузки (рис. 6А-II). Далее изменчивость этого признака снова возрастает с началом формирования почки задней конечности. Именно на стадиях, где значения коэффициентов вариации во всех кладках имеют меньшие значения, наблюдаются и 50% значения коэффициентов внутриклассовой корреляции (рис. 6Б-II). Это видно на стадиях 34 и 36, где в среднем значения C_v равны 5.5 и 4, соответственно.

Близкой к картине, характерной для Бутово, является динамика развития зародышей из района Востряково, с той лишь разницей, что вариабельность данного признака ниже (рис. 6А-III).

Рис. 4. А — динамика значений коэффициентов вариации (C_v) признака длина тела зародыша (Lb) из районов Бутово (I), Луцино (II) и Востряково (III). По оси X — номера стадий, по оси Y — значения C_v .

Б — постадийная динамика значений коэффициента внутриклассовой корреляции по Фишеру признака длина тела зародыша (Lb) из районов Бутово (I), Луцино (II) и Востряково (III). По оси X — номера стадий. В — доля внутрикладочной изменчивости, Г — доля межкладочной изменчивости.



Тем не менее, коэффициент η^2 (%) имеет значение, близкое к 50%, только на 34-й стадии. На 37-й стадии, где можно было бы так же ожидать сходное значение этого коэффициента, он равен 37% (рис. 6Б-III).

ОБСУЖДЕНИЕ

Постадийный анализ изменения значений коэффициентов вариации признаков, характеризующих линейные размеры зародыша остромордой лягушки, позволил выявить критические периоды в эмбриональном развитии этого вида. Продолжительность этих критических периодов может ограничиваться как несколькими последовательными стадиями, так и наблюдаться в пределах одной, выделяемой, согласно таблицам Дабаган и Слепцовой (1975), стадии. Во время этих периодов изменчивость линейных размеров развивающегося зародыша должна быть на определенном уровне. Между критическими периодами изменчивость может быть как выше, так и ниже значения, характерного для критического периода. Это наглядно видно при анализе изменения значений коэффициентов вариации в кладках, погибших во время эксперимента. У зародышей этих кладок, по всем анализируемым признакам, к критическому периоду развития значения S_v были выше или ниже критического значения, и кладки погибли целиком. Среди выживших кладок также наблюдалась смертность и возникновение аномалий, несовместимых с жизнью, именно в критический период развития, но доля таких зародышей была невысока и кладка развивалась дальше.

Наиболее ранней узловой стадией оказываются стадии завершения гастрюляции — начало нейруляции, т.е. с 18-й по 20-ю стадии развития. Именно в этот период наблюдается наибольшая смертность зародышей, а доля внутрикладочной изменчивости развивающихся приблизительно равна 50%, и значения S_v приблизительно равны 4. Интересно отметить, что в городских популяциях остромордой лягушки этот критический период несколько уже, чем в подмосковной популяции, развитие в которой проходит, в целом, менее вариабельно.

Дальнейший анализ линейных размеров развивающихся зародышей позволил выявить второй критический период в раннем эмбриогенезе, включающий стадии после вылупления личинок из оболочек, т.е. 32–33-ю стадии развития. Этот период оказывается критическим для формирования общей

длины зародыша и длины его хвостовой пластины. В то же время, критической для формирования ширины хвостовой пластины оказывается следующая стадия, стадия 34, на которой наблюдается переход головастика от прикрепленного к галлертам к свободноплавающему образу жизни. 36-я стадия развития оказывается критической для формирования признаков “длина туловища” и “длина хвостовой пластины”, но не для признака “общая длина зародыша”. Для всех этих признаков, по-видимому, критическим периодом оказывается и 39-я стадия развития, но для подтверждения этого факта необходимо провести исследования на еще более поздних стадиях развития.

Таким образом, в развитии остромордой лягушки можно выделить критические периоды, однако эти периоды оказываются критическими не только для развития всего зародыша в целом, но и для процесса формирования его отдельных структур. В ряде случаев эти периоды могут не совпадать. Связано это может быть с разной функциональной нагрузкой структур зародыша. Возможно, именно на эти стадии или даже периоды стоит обращать внимание при исследованиях возможных эволюционных преобразований, происходящих в процессе адаптивной эволюции к окружающей среде, в том числе, и к антропогенному загрязнению нерестовых водоемов.

Помимо критических периодов, есть и более продолжительные периоды развития, на которых мы наблюдаем широкий спектр значений коэффициентов вариации. В разных кладках эти значения могут существенно отличаться и быть как больше, так и меньше тех значений, которые приобретают S_v на критических стадиях. Следовательно, каждая кладка развивается по индивидуальному пути, что обеспечивает формирование общей изменчивости морфогенеза. Прежде всего, на уровень этой изменчивости и может оказывать влияние воздействие окружающей среды, в частности, загрязнение воды из нерестовых водоемов. На такое предположение наталкивает факт более вариабельного развития зародышей из городских популяций, по сравнению с подмосковной. Возможно, субвитальное воздействие окружающей среды на раннее развитие приводит к увеличению изменчивости формирующихся структур, которая должна отрегулироваться к критическому периоду. В случае, если такая регуляция по тем или иным причинам невозможна, — кладка погибает либо полностью, либо частично.

Рис. 5. А — динамика значений коэффициентов вариации (S_v) признака длина хвостовой пластины зародыша (L_x) из районов Бутово (I), Луцино (II) и Востряково (III). По оси X — номера стадий, по оси Y — значения S_v .

Б — постадийная динамика значений коэффициента внутриклассовой корреляции по Фишеру признака длина хвостовой пластины зародыша (L_x) из районов Бутово (I), Луцино (II) и Востряково (III). По оси X — номера стадий. **В** — доля внутрикладочной изменчивости, **Г** — доля межкладочной изменчивости.

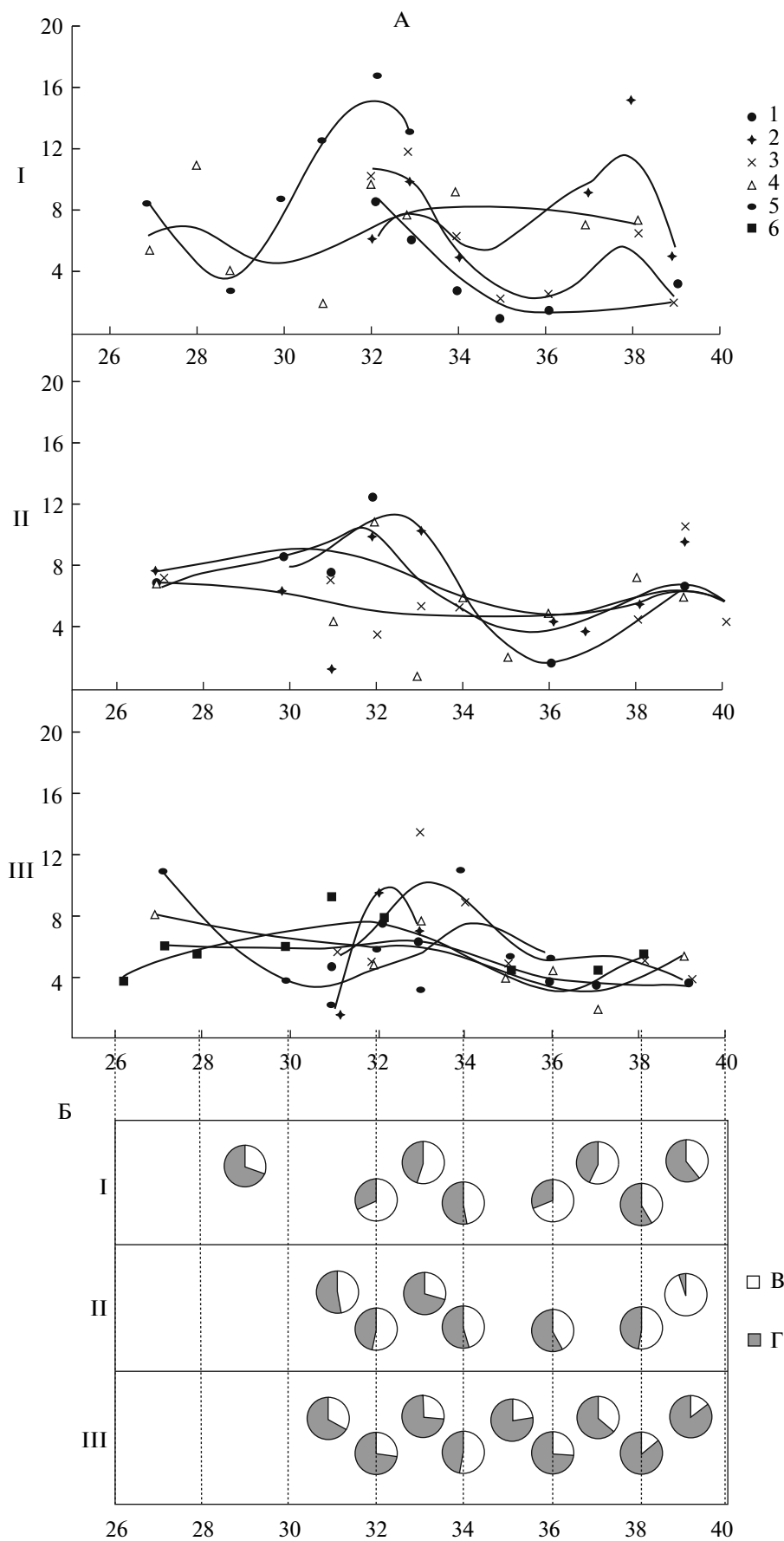


Рис. 6. А — динамика значений коэффициентов вариации (C_v) признака ширина хвостовой пластины зародыша (W_x) из районов Бутово (I), Луцино (II) и Востряково (III). По оси X — номера стадий, по оси Y — значения C_v .

Б — постадийная динамика значений коэффициента внутриклассовой корреляции по Фишеру признака ширина хвостовой пластины зародыша (W_x) из районов Бутово (I), Луцино (II) и Востряково (III). По оси X — номера стадий. **В** — доля внутрикласовой изменчивости, **Г** — доля межкласовой изменчивости.

При втором варианте возможны эволюционные преобразования эмбриогенеза.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 08-04-00664) и Российской государственной программой “Ведущие школы” (проект № НШ-4813.2010.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРА

- Броунов П.И.* Метеорология как наука о вихревых движениях воздуха // Морской сборник. 1897. № 3.
- Дабаян Н.В., Слепцова Л.А.* Травяная лягушка (*Rana temporaria* L.) // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 442–462.
- Дорфман Я.Г., Черданцев В.Г.* Роль силы тяжести в раннем развитии // Внешняя среда и развивающийся организм. М.: Наука, 1977. С. 140–173.
- Пучков В.Ф.* Критические периоды роста, морфогенетический аппарат и эволюционный подход к их изучению с позиции телеономии // Арх. анат., гистол. и эмбриологии. 1978. № 75 (10). С. 20–29.
- Светлов П.Г.* Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез // “Вопросы цитологии и обшей физиологии” / Под ред. Ю.И. Полянского. М.—Л., 1960. С. 263–285.
- Светлов П.Г.* Физиология (механика) развития. Л.: Наука, 1978. Т. 1. Процессы морфогенеза на клеточном и организменном уровнях. 279 с. Т. 2. Внутренние и внешние факторы развития. 263 с.
- Северцова Е.А.* Адаптивные процессы и изменчивость эмбриогенеза бесхвостых амфибий в городских популяциях. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2002. 24 с.
- Токин Б.П.* Общая эмбриология, М.: Высшая школа, 1987.
- Goldschmidt R.*, Physiological genetics. New York—London, McGrawHill Book Comp., 1938. 375 p.
- Kellicott C.* Effect of low temperature on the development of fundulus // Amer. J. Anat. 1916. V. 20. P. 449.
- Stockard C.R.* Observations on the natural history of *Polyodon spathula*. Am. Nat. 1907. V. 41. P. 753–766.
- Stockard C.R.* Developmental rate and structural expression an experimental study of twins, double monsters and single deformities, and interaction among embryonic organs during their origin and development // Amer. J. anat. 1921. V. 28. № 2. P. 115–226.
- Weismann A.* The effect of external influences upon development. London: Frowde, 1894.

Crucial Stages of Embryogenesis of *R. arvalis*: Part 1. Linear Measurements of Embryonic Structures

E. A. Severtsova and A. S. Severtsov

Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia
E-mail: Severtsova@mail.ru

Abstract—Investigations of individual variability have allowed us to reveal the crucial (=nodal) stages in embryogenesis of the moor frog (*Rana arvalis* Nills.). These crucial stages are: the late gastrula stage (stages 18–20), the hatching stages (stages 32–33) and, apparently, early metamorphosis (stage 39). Moreover, we have found that each embryonic structure passes through its specific crucial stages. For example, stage 34 is crucial for the trait “tail width” but is internodal for all other embryonic traits. At this stage, larva passes from an attached to a free-swimming life style. We also found considerable differences between the different frog populations in the level of developmental variability. These differences were associated with internodal developmental stages.

Keywords: crucial stages of ontogenesis, variability, *Rana arvalis*

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 576.52:576.5

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ИНДУКЦИЮ СПИКУЛОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРАХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК МОРСКИХ ЕЖЕЙ

© 2011 г. Ю. О. Кипрюшина^{1,2}, Н. А. Одинцова^{1,2}

¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
690041 Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17

² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690600

E-mail: kiprul@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.05.2010 г.
Окончательный вариант получен 17.03.2011 г.

Проведен анализ экзогенных факторов, влияющих на реализацию программы спикулогенеза, для двух видов морских ежей (*Strongylocentrotus intermedius* и *S. nudus*) в первичной культуре эмбриональных клеток, полученных со стадии бластулы и гастрюлы. Установлено влияние различных типов субстратов и состава среды на процесс спикулообразования. Впервые показано, что сыворотку, присутствие которой необходимо для образования спикул *in vitro*, можно заменить, вводя в питательную среду комплекс факторов, состоящий из инсулина, трансферрина и лектинов. Управление процессами роста и дифференцировки эмбриональных клеток морских беспозвоночных *in vitro* открывает перспективу их применения для решения практических задач, связанных с получением культур клеток – продуцентов минеральных структур.

Ключевые слова: культура клеток, лектин, морской еж, спикула, спикулогенез, эмбрионы

В настоящее время все более актуальными становятся исследования, посвященные изучению процесса биоминерализации, проходящего в условиях нормальной жизнедеятельности у представителей различных организмов, таких как губки, кишечнорастворимые, диатомовые водоросли, немертины, радиолярии и иглокожие. У морских ежей биоминерализация начинается во время гастрюляции (Davidson, 2006).

Удобным инструментом для исследования направленной дифференцировки у иглокожих являются первичные культуры их эмбриональных клеток, которые позволяют изучать конкретный вклад в реализацию программ цитодифференцировки таких факторов, как субстрат, на котором производят культивирование, наличие или отсутствие факторов роста и адгезии. Оказакки (Okazaki, 1975) показал, что изолированные микромеры морских ежей в условиях клеточной культуры при определенных условиях могут дифференцироваться в клетки, способные образовывать спикулы. В исследуемом эта система была использована для исследования возможного участия гликопротеинов и коллаген-подобных молекул в формировании спикул (Mintz, Lennarz, 1982).

Каждая спикула, образующая скелет личинки морских ежей, состоит из одиночного кристалла кальцита и различных количеств аморфного кар-

боната кальция (Wilt, 2002). Спикулы окружены внеклеточным матриксом (Wilt, 1999) и являются результатом секреторной деятельности клеток первичной мезенхимы (ПМ) (Illies, 2002; Kiyomoto et al., 2004; Yajima, Kiyomoto, 2006), преобразующих аморфный карбонат кальция в единый упорядоченный кристалл и экспрессирующих специфические белки. Кроме того, в клетках ПМ была обнаружена экспрессия гена коллагена (порядка 600–700 копий мРНК на клетку) (Angerer et al., 1988). Однако для процесса образования спикул большое значение имеет не только синтез и функционирование специфических белков, но и особое положение клеток в бластоцеле эмбриона. Клетки ПМ мигрируют во время личиночного развития в бластоцель, а на стадии средней и поздней гастрюлы выстраиваются кольцом вокруг архентерона, образуя будущие центры спикулогенеза (Oliveri et al., 2002). Отростки этих клеток сливаются в синцитии, и в результате внутриклеточного отложения углекислого кальция в вакуолях при участии аппарата Гольджи синтезируется спикула (Wilt, 1999; Wilt, Etensohn, 2007).

Управление процессами роста и дифференцировки эмбриональных клеток морских беспозвоночных *in vitro* связано с поиском факторов, направляющих дифференцировку в тот или иной тип клеток, и разработкой технологий получения

“чистой” популяции клеток одного типа. Цель данной работы – выявить факторы, влияющие на реализацию программы спикүлогенеза в культуре эмбриональных клеток морских ежей, и оценить их влияние на развитие спикүлогенной дифференцировки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Морских ежей (*Strongylocentrotus intermedius* и *S. nudus*) собирали в заливе Восток Японского моря с июля по октябрь 2008–2009 г. Все эксперименты проводили на биостанции “Восток” Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Животных держали в ваннах с проточной аэрированной водой и перед началом эксперимента промывали два-три раза фильтрованной морской водой, обработанной ультрафиолетом. Перест морских ежей стимулировали инъекцией 0.5 М КСI в область Аристотелева фонаря. Эмбрионов получали искусственным оплодотворением и культивировали при 18°C до стадии бластулы или гастрюлы (14 и 24 ч после оплодотворения соответственно).

Получение и анализ клеточных культур

Диссоциацию эмбрионов морских ежей проводили с помощью раствора коллагеназы (2.5 мг/мл; ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток) в течение 20–30 мин при 18°C. Ферментативная диссоциация позволила получить культуры клеток с жизнеспособностью не менее 99%. Клеточную суспензию дважды промывали искусственной морской водой без Ca^{2+} и Mg^{2+} , а затем морской водой. Все растворы для промывок содержали антибиотики: гентамицин (0.4 мг/мл), пенициллин (G 100 ед/мл), стрептомицин (0.1 мг/мл) и нистатин (500 ед/мл). Полученную суспензию клеток фильтровали через стерильный газ (с размером ячеек 35 мкм) для освобождения от частично диссоциированных эмбрионов и крупных агрегатов клеток. Жизнеспособность клеток определяли методом исключения красителя трипанового синего (“Serva”, Германия) в камере Горяева. Конечная концентрация клеток при культивировании во всех экспериментах составляла 2×10^6 /мл.

Клетки высевали на различные субстраты: пластик (24-луночные пластиковые планшеты, “Costar”, США), покровные стекла с углеродным напылением, поли-L-лизин (мол. массой 190 кДа) или фибронектин (“Sigma”, США). Для культивирования клеток использовали морскую воду с содержанием эмбриональной сыворотки телят (ЭС) от 0 до 32% (“Sigma”, США) или питательную среду L15 (“Flow Laboratories”, Великобритания) с модификациями (L15-M) (Одинцова, 2001). Кроме того, в некоторых экспериментах в среду добавляли вместо ЭС бычий сывороточный альбумин,

БСА (0.125%), инсулин (100 мкг/мл) и холо-трансферрин (80 мкг/мл) (все реактивы фирмы “Sigma”, США) либо набор этих же компонентов в комплексе с лектинами, такими как маннозо-специфичный лектин, конканавалин А (Кон А), (“Sigma”, США) в концентрации 1.5 мкг/мл или глюкозамин-специфичный лектин из асцидии *Didemnum ternatanum* (ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток) в концентрации 2.5 мкг/мл.

Клетки культивировали при температуре 17–18°C. Число образовавшихся спикүл подсчитывали через 3 сут после высева клеток на субстраты. Клеточные культуры анализировали при помощи инвертированного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия).

Гистохимическое выявление ферментативной активности эндогенной щелочной фосфатазы в клеточных культурах проводили согласно методу, описанному ранее (Kamalia et al., 1992).

Статистический анализ полученных данных (количество спикүл) проведен при помощи программы Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 1 сут после начала культивирования часть диссоциированных клеток агрегировала и образовывала эмбриоидо-подобные тела. Тест на присутствие эндогенной щелочной фосфатазы показал, что клетки, позитивные по этому параметру, обнаружены только в клеточных агрегатах, напоминающих эмбриоидо-подобные тела (рис. 1). Присутствие сыворотки не влияло на уровень активности щелочной фосфатазы в агрегатах клеток. Данную картину наблюдали на всех тестируемых субстратах, кроме поли-L-лизина. На поли-L-лизине клетки прочно связывались с субстратом, но не распластывались и не формировали эмбриоидо-подобные тела.

Среди клеток, не участвовавших в формировании эмбриоидо-подобных тел, по морфологическим признакам можно было выделить три типа клеток: пигментные клетки красно-коричневого цвета, распластанные клетки и округлые клетки (рис. 2а). Распластанные клетки при дальнейшем культивировании объединялись в синцитии. Именно в таких спикүлогенных синцитиях образуются скелетные спикүлы.

Культивирование клеток в морской воде в присутствии ЭС (1–32%) приводило к стабильному появлению спикүл, которые можно было различить на 2-е сут культивирования. На рис. 2б и 2в представлен внешний вид спикүл, которые образовывались в первичной культуре клеток бластулы морского ежа *S. nudus*, культивированных в морской воде в присутствии 10% ЭС. Спикүлы были в основном правильной трехосной формы, а после 3-х суток культивирования некоторые спи-

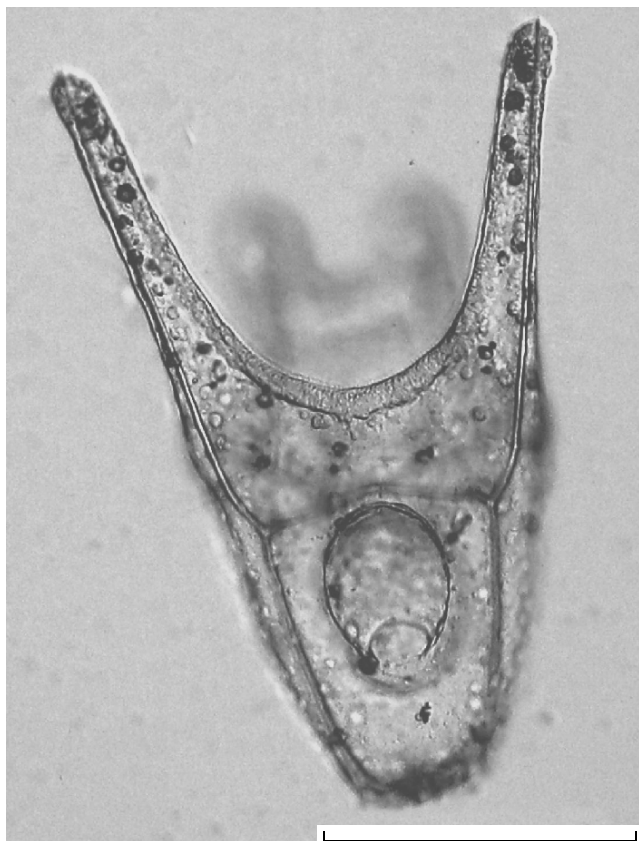


Рис. 3. Личинка морского ежа *S. nudus* (стадия плутеуса). Масштаб: 50 мкм.

кулы ветвились и образовывали отростки. В культуре клеток *S. intermedius* трехосные спикулы наблюдали редко, зато в большом количестве формировались длинные одноосные спикулы (до 50 мкм) (рис. 2г). Установлено, что при культивировании клеток, полученных с более поздней стадии развития – гастролы, спикулогенез идет бо-

лее интенсивно, чем в культуре клеток, полученной со стадии бластулы.

В нормальном личиночном развитии морского ежа трехосные спикулы являются элементами высокоупорядоченного внутреннего скелета, необходимого для поддержки архентерона, и могут быть легко различимы в живых личинках (рис. 3).

В ходе индуцированной спикулогенной дифференцировки число образующихся спикул зависело от концентрации сыворотки в морской воде и от типа субстрата, как в первичных культурах эмбриональных клеток морских ежей со стадии бластулы (рис. 4), так и гастролы (см. рис. 5). Наиболее эффективно программа спикулогенеза реализовалась при культивировании клеток на фибронектине, тогда как на пластике и в лунках, поверхность которых была покрыта другими субстратами, число распластанных клеток и спикул было значительно меньше.

При использовании вместо морской воды питательной среды L15-M с сывороткой индуцировать спикулогенную дифференцировку не удалось. Иногда спикулы спонтанно появлялись при культивировании в морской воде без сыворотки. Это происходило довольно редко и только в культурах, полученных со стадии гастролы.

При культивировании клеток в питательной среде L15-M в присутствии БСА, инсулина и трансферрина спикулы также отсутствовали, но образовывались синцитий-подобные островки клеток (рис. 6а). Используя эти же условия, но дополнительно вводя в среду лектины (например, Кон А), нам удалось получить спикулы в культуре клеток морского ежа со стадии гастролы (рис. 6б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия щелочной фосфатазы является маркером плюрипотентных эмбриональных клеток многих млекопитающих (Bernstine et al., 1973;

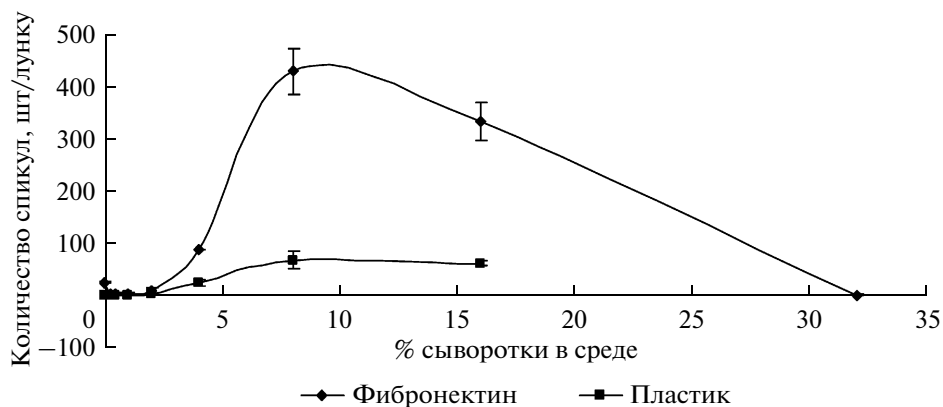


Рис. 4. Зависимость числа образовавшихся спикул в культуре клеток бластулы морского ежа *S. intermedius* от содержания сыворотки в среде культивирования (клетки культивировали в течение 3 сут на пластике и фибронектине).

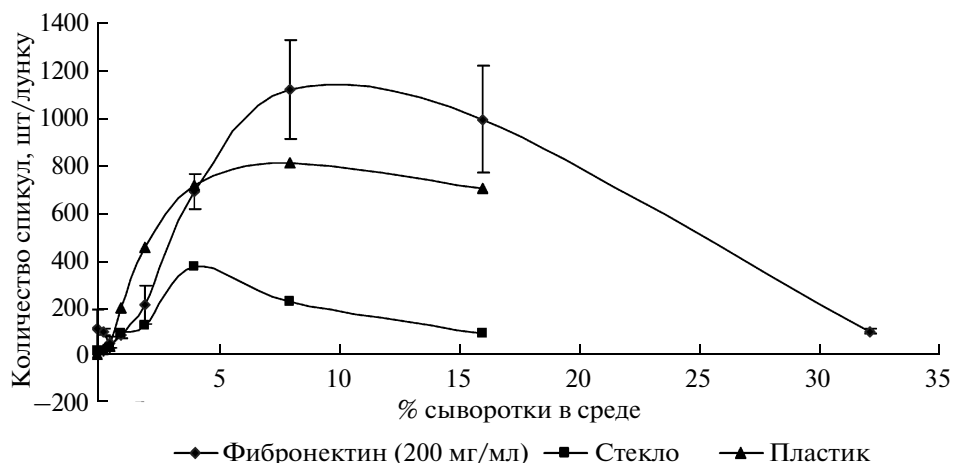


Рис. 5. Зависимость числа образовавшихся спикул в культуре клеток гастролы морского ежа *S. intermedius* от содержания сыворотки в среде культивирования и типа субстрата (клетки культивировали в течение 3 сут на пластике, либо фибронектине, либо на стекле).

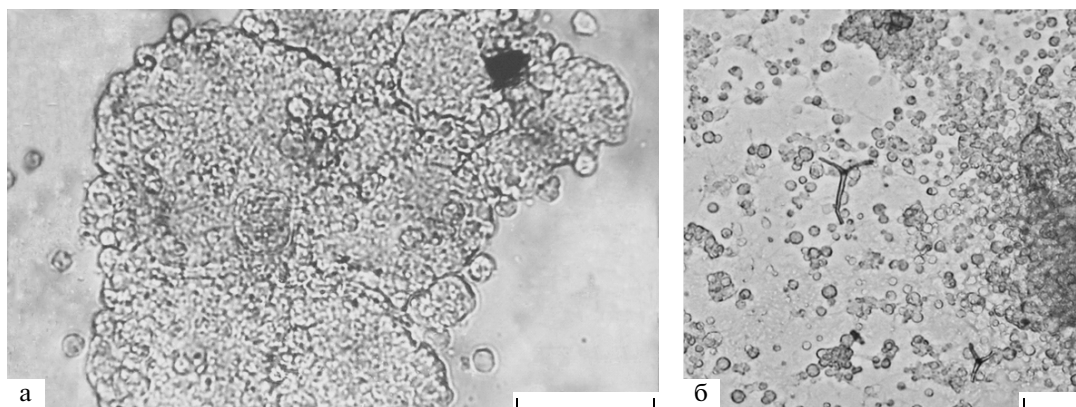


Рис. 6. Морфология эмбриональных клеток морского ежа *S. intermedius* в первичных культурах, полученных со стадии гастролы. а – клетки, культивированные в течение 3-х сут в присутствии БСА, инсулина и трансферина; б – клетки, культивированные в течение 3-х сут в присутствии БСА, инсулина и трансферина и конканавалина А. Масштаб: 50 мкм (а), 30 мкм (б).

Brons et al., 2007) и беспозвоночных животных (Ishizuka et al., 2001), поэтому присутствие ферментативной активности эндогенной щелочной фосфатазы в культивируемых клетках со стадии бластулы в наших экспериментах, может свидетельствовать о том, что полученные клетки потенциально способны к делению.

Известно, что в культурах диссоциированных клеток эмбрионов морских ежей в зависимости от условий культивирования возможна либо реконструкция целых эмбрионов, либо дифференцировка клеток в различных направлениях (Исаева, 1994); образование мышечных клеток (Kaneko et al., 1997), пигментных клеток (Одинцова, 2001; Calestani et al., 2003) или клеток, формирующих спикулы (Okazaki, 1975; Mintz, Lennarz, 1982; Decker et al., 1987; Исаева, 1994). Выбор программы развития в культуре клеток происходит задол-

го до экспрессии специфических генов, зависит от состава среды и множества внешних сигналов, которые воспринимаются поверхностными рецепторами клетки (Одинцова, 2001).

Микромеры, появляясь на 16-клеточной стадии развития, являются носителями программы спикулогенеза и в последующем способны образовывать спикулы в культуре в присутствии лошадиной сыворотки или сыворотки телят (Okazaki, 1975). Пространственная упорядоченность спикул и их форма зависит от условий культивирования и коррелирует с развитием структур цитоскелета в клетках (Керкис, Исаева, 1984). Как показали наши эксперименты, форма спикул может значительно отличаться даже у близких видов морских ежей.

Микромеры, культивированные в морской воде без сыворотки, образуют “розеткоподобные”

группы округлых, отдельно лежащих друг от друга клеток. При добавлении сыворотки спикулообразование в культуре восстанавливается (McCarty, Spiegel, 1983). Природа возникновения сигналов, которые индуцируют спикулообразование иглокожих, до конца не выяснена. В наших экспериментах количество спикул в культуре увеличивалось по мере увеличения содержания ЭС в среде (до концентрации примерно 16%) для обоих видов морских ежей. При использовании более высоких концентраций сыворотки (16–32%) наблюдался обратный эффект – число образовавшихся спикул снижалось, что согласуется с данными других авторов (Kiyomoto et al., 2004). Спонтанное появление спикул при культивировании в морской воде без сыворотки происходило только в культурах, полученных со стадии гастролы, что можно объяснить коммитированностью клеток гастролы как более поздней стадии развития. Отсутствие спикул при культивировании в питательной среде с сывороткой, вероятно, связано с недостатком каких-либо минеральных компонентов, необходимых для формирования спикул.

Клеточный ответ на внешний стимул (сыворотку) происходит в определенном временном интервале (36–50 часов после начала культивирования). Это соответствует стадии *in vivo*, когда клетки начинают агрегировать и формировать кольцевую синцитий (Page, Benson, 1992). Хотя функция спикулообразования характерна для клеток ПМ, потомков микромеров, микрохирургическое удаление этих клеток на стадии гастролы приводит к превращению нескелетогенных мезодермальных клеток в клетки ПМ (Ettensohn et al., 2007). Это превращение в дальнейшем сопровождается синтезом полного, хорошо выраженного скелета, хотя и с некоторым запаздыванием, и связано с активацией многих генов, отвечающих за процесс биоминерализации, в нескелетогенных мезенхимных клетках (Ettensohn, 2009). Инъекция в зиготы морских ежей мРНК рецепторов нейромедиаторов млекопитающих приводила к резкой остановке развития на стадии гастролы и появлению дизорганизованных пигментных и скелетогенных клеток в бластоцеле эмбрионов, что может указывать на общность эндогенной сигнал-проводящей системы у позвоночных и беспозвоночных животных (Cameron et al., 1994).

Сыворотка обеспечивает присутствие фибронектина и других необходимых для спикулообразования компонентов. В наших экспериментах именно при культивировании клеток на фибронектине было зарегистрировано самое большое число спикул, что неудивительно, так как фибронектин входит в состав базальных мембран клеток иглокожих и необходим для эффективной реализации программы спикулогенеза (Hynes, 1990).

Тем не менее, даже вводя в питательную среду, а не в морскую воду, комплекс факторов, состоящий из инсулина, трансферрина и лектинов, можно заменить сыворотку, присутствие которой критично для образования спикул. Этот эффект, вероятно, связан с присутствием гликопротеинов полиманнозного типа в органическом матриксе в полости спикул морских ежей (Decker et al., 1987).

Наши данные об участии лектинов в индукции спикулогенной дифференцировки в культуре эмбриональных клеток морских ежей в отсутствие сыворотки, подтверждающие способность лектинов изменять адгезивные свойства этих клеток (Mafranga et al., 1991) и воздействовать на процессы роста и дифференцировки клеток иглокожих (Latham et al., 1995; Odintsova et al., 1999). Механизмы этого явления могут быть различны – здесь могут быть вовлечены как углевод-связывающие участки, так и коллаген-подобные сайты и/или хорошо известная для многих адгезионных белков последовательность из трех аминокислот – аргинина–глицина–аспарагиновой кислоты – RGD-последовательность (Ruoslahti, Pierschbacher, 1987). Так, например, адгезивная активность лектинов, выделенных из морских ежей, эхинонектин и эхиноидина, не зависит от углевод-связывающей активности (Alliegro et al., 1990; Alliegro, Alliegro, 1991), но в состав этих лектинов входит RGD-последовательность (Ozeki et al., 1991). Адгезивная активность фибронектина, одного из самых древних лектинов (Akiyama, Johnson, 1983), связана как с RGD-последовательностью, так и с другими участками молекулы (Hynes, 1990; Tanabe et al., 1993). В процессе эмбрионального развития меняются поверхностные свойства клеток, поэтому рецепторы к лектинам или их связывающие свойства также меняются. Так, например, маннозо-специфичный лектин, Кон А, на ранних стадиях эмбрионального развития морского ежа не связывается с поверхностными рецепторами вовсе или связывается очень слабо, но на стадии бластулы и гастролы этот лектин активно связывается с поверхностными рецепторами (Mafranga et al., 1991; Latham et al., 1995). Вероятно, гликопротеины клеточной поверхности, синтезируемые на разных стадиях развития, являются основными молекулами морфогенеза (Edelman, 1984, 1985).

Полученные результаты могут быть использованы в морской биотехнологии для решения практических задач, связанных с получением культур клеток – продуцентов минеральных структур, необходимых для нанотехнологий.

Работа поддержана Президиумом ДВО РАН (проекты № 09-I-П22-04 и 09-II-СО-06-001), РФФИ (№ 10-04-00-330) и Программой ДВФУ (№ 11 G34.31.0010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Исаева В.В. Клетки в морфогенезе. М.: Наука, 1994. 224 с.
- Керкис А.Ю., Исаева В.В. Электронно-микроскопическое исследование спикүлогенеза в культуре эмбриональных клеток морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Онтогенез. 1984. Т. 15. № 1. С. 34–40.
- Одинцова Н.А. Основы культивирования клеток морских беспозвоночных. Владивосток: Дальнаука, 2001. 162 с.
- Akiyama S.K., Johnson M.D. Fibronectin in evolution: presence in invertebrates and isolation from *Microcina porifera* // Comp. Biochem. Phys. B. 1983. V. 76. P. 687–694.
- Alliegro M.C., Burdsal C.A., McClay D.R. Galactose-specific lectin from sea urchin embryos // Biochem. 1990. V. 29. P. 2135–2141.
- Alliegro M.C., Alliegro M.A. The structure and activities of echinonectin: a developmentally regulated cell adhesion glycoprotein with galactose-specific lectin activity // Glycobiology. 1991. V. 1. P. 253–256.
- Angerer L.M., Chambers S.A., Yang Q. et al. Expression of a collagen gene in mesenchyme lineages of the *Strongylocentrotus purpuratus* embryo // Genes Dev. 1988. V. 2. P. 239–246.
- Abrecht M., Chiou J.W., Guo J. et al. Probing the organic-mineral interface at the molecular level in model biomaterials // Langmuir. 2008. V. 24. № 6. P. 2680–2687.
- Bernstine E.G., Hoopert M.L., Grandchamp S. et al. Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. Part II. P. 3899–3903.
- Brons G.M., Smithers L.E., Trotter M.W.B. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // Nature. 2007. V. 448. P. 191–195.
- Calestani C., Rast J., Davidson E. Isolation of pigment cell specific genes in the sea urchin embryo by differential macroarray screening // Development. 2003. V. 130. P. 4587–4596.
- Cameron R.A., Smith L.C., Britten R.J., Davidson E.H. Ligand-dependent stimulation of introduced mammalian brain receptors alters spicule symmetry and other morphogenetic events in sea urchin embryos // Mech. Dev. 1994. V. 45(1). P. 31–47.
- Custodio M.R., Hajdu E., Muricy G. Cellular dynamics of *in vitro* allogeneic reactions of *Hymeniacidon heliophila* (Demospongiae: Halichondrida) // Mar. Biol. 2004. V. 144. P. 999–1010.
- Davidson E.H. The Regulatory Genome: Gene Regulatory Networks in Development and Evolution. San Diego, CA: Acad. Press., 2006. 304 p.
- Decker G.L., Morrill J.B., Lennarz W.J. Characterization of sea urchin primary mesenchyme cells and spicules during biomineralization *in vitro* // Development. 1987. V. 101. P. 297–312.
- Edelman G.M. Cell adhesion and morphogenesis: the regulation hypothesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 1460–1464.
- Edelman G.M. Modulation mechanisms in cell-cell recognition // Trends Pharmacol. Sci. 1985. V. 6. P. 208–214.
- Ettensohn C.A., Kitazawa C., Cheers M.S. et al. Gene regulatory networks and developmental plasticity in the early sea urchin embryo: alternative deployment of the skeletogenic gene regulatory network // Development. 2007. V. 134. P. 3077–3087.
- Ettensohn C.A. Lessons from a gene regulatory network: echinoderm skeletogenesis provides insights into evolution, plasticity and morphogenesis // Development. 2009. V. 136. P. 11–21.
- Hynes R.O. Fibronectins. New York: Springer, 1990. 546 p.
- Illies M.R., Peeler M.T., Dechtiaruk A.M. et al. Identification and developmental expression of new biomineralization proteins in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* // Dev. Genes Evol. 2002. V. 9. P. 419–31.
- Ishizuka Y., Minokawa T., Amemiya S. Micromere descendants at the blastula stage are involved in normal archenteron formation in sea urchin embryos // Dev. Genes Evol. 2001. V. 211. P. 83–88.
- Kamalia N., McCulloch C.A.G., Tenenbaum H.C. et al. Direct flow cytometric quantification of alkaline phosphatase activity in rat bone marrow stromal cells // J. Histochem. Cytochem. 1992. V. 40. № 7. P. 1059–1065.
- Kaneko H., Kawahara Y., Okamoto M. et al. Study on the nature of starfish larval muscle cells *in vitro* // Zoolog. Sci. 1997. V. 14. P. 287–296.
- Kiyomoto M., Zito F., Sciarrino S. et al. Commitment and response to inductive signals of primary mesenchyme cells of the sea urchin embryo // Dev. Growth Differ. 2004. V. 46 № 1. P. 107–114.
- Latham V.H., Herrera S., Rostamiani K. et al. Rapid identification of lectin receptors and their possible function in sea urchin cell systems // Acta Histochem. 1995. V. 97. № 4. P. 373–382.
- Mafranga V., Di Ferro D., Cervello M. et al. Adhesion of sea urchin embryonic cells to substrata coated with cell adhesion molecules // Biol. Cell. 1991. V. 1. № 71. P. 289–291.
- Mc Carty R.A., Spiegel M. Serum effects on the *in vitro* differentiation of sea urchin micromeres // Exp. Cell Res. 1983. V. 149. P. 433–441.
- Mintz G.R., Lennarz W.J. Spicule formation by cultured embryonic cells from the sea urchin // Cell Diff. 1982. V. 11. P. 331–333.
- Odintsova N.A., Belogortseva N.I., Ermak A.V. et al. Adhesive and growth properties of lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum* on cultivated marine invertebrate cells // BBA-Mol. Cell Biol. 1999. V. 1448. P. 381–389.
- Okazaki K. Spicule formation by isolated micromeres of sea urchin embryo // Amer. Zool. 1975. V. 15. № 3. P. 567–582.
- Oliveri P., Carrick D.M., Davidson E.H. A gene regulatory network that directs micromere specification in the sea urchin embryo // Dev. Biol. 2002. V. 246. P. 209–228.
- Ozeki Y., Matsui T., Titani K. Cell adhesive activity of two animal lectins through different recognition mechanisms // FEBS Lett. 1991. V. 30. P. 2391–2394.
- Page L., Benson S. Analysis of competence in cultured sea urchin micromeres // Exp. Cell Res. 1992. V. 203. № 2. P. 305–311.
- Pain B., Clark M.E., Shen M. et al. Long-term *in vitro* culture and characterization of avian embryonic stem cells

- with multiple morphogenetic potentialities // *Development*. 1996. V. 122. P. 2339–2348.
- Peled-Kamar M., Hamilton P., Wilt F.H.* Spicule matrix protein LSM34 is essential for biomineralization of the sea urchin spicule // *Exp. Cell Res.* 2002. V. 272. № 1. P. 56–61.
- Ruoslahti E., Pierschbacher M.D.* New perspectives in cell adhesion: RGD and Integrins // *Science*. 1987. V. 238. P. 491–497.
- Seto J., Zhang Y., Hamilton P., Wilt F.* The localization of occluded matrix proteins in calcareous spicules of sea urchin larvae // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 1. P. 123–130.
- Tanabe J., Fujita H., Iwamatsu A., Mohri H. et al.* Fibronectin inhibits platelet aggregation independently of RGD-sequence // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 27143–27147.
- Wilt F.H.* Matrix and mineral in the sea urchin larval skeleton // *J. Struct. Biol.* 1999. V. 126. № 3. P. 216–226.
- Wilt F.H.* Biomineralization of the spicules of sea urchin embryos // *Zoolog. Sci.* 2002. V. 3. P. 253–261.
- Wilt F.H., Ettensohn C.A.* The morphogenesis and biomineralization of the sea urchin larval skeleton // *Handbook of Biomineralization* (ed. E. Bauerlein), Weinheim: Wiley-VCH Press. 2007. P. 183–210.
- Yajima M., Kiyomoto M.* Study of larval and adult skeletogenic cells in developing sea urchin larvae // *Biol. Bull.* 2006. V. 211. № 2. P. 183–192.

Effect of Exogenous Factors on the Induction of Spicule Formation in Sea Urchin Embryonic Cell Cultures

Yu. O. Kipryushina^{a, b} and N. A. Odintsova^{a, b}

^a*Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences,
ul. Pal'chevskogo 17, Vladivostok 690041 Russia
e-mail: kiprul@yandex.ru*

^b*Far East Federal University, Vladivostok, 690600 Russia*

Abstract—The effect of exogenous factors on the realization of the spicule formation program in two sea urchin species, *Strongylocentrotus intermedius* and *S. nudus*, has been studied in primary embryonic cell cultures derived from the blastula and gastrula stages. It has been shown that the process of spicule formation depends on the type of substrate and the composition of the medium. An original finding is that calf or horse serum necessary for spicule formation in vitro can be replaced by a complex of factors including insulin, transferrin, and lectins. Methods allowing control over the growth and differentiation of marine invertebrate embryonic cells in vitro open prospects for their application to practical problems such as the establishment of cell cultures producing certain mineral structures.

Keywords: cell culture, lectin, sea urchin, spicule, spicule formation, embryos

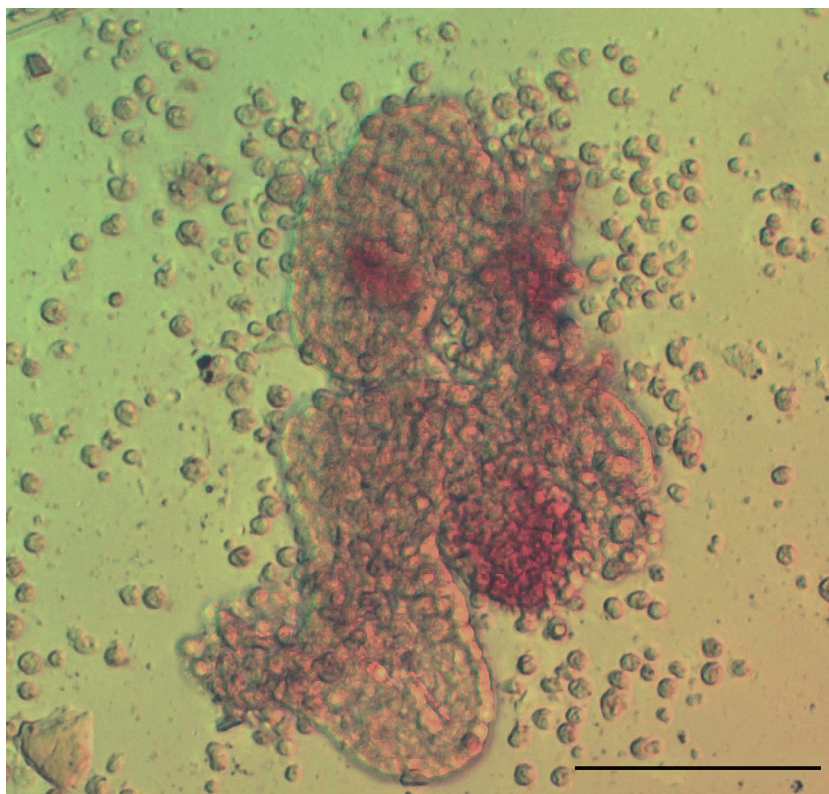


Рис. 1. Выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы в культуре эмбриональных клеток морского ежа *S. intermedius* после трех дней культивирования в морской воде с добавлением 4% сыворотки. Масштаб: 100 мкм.

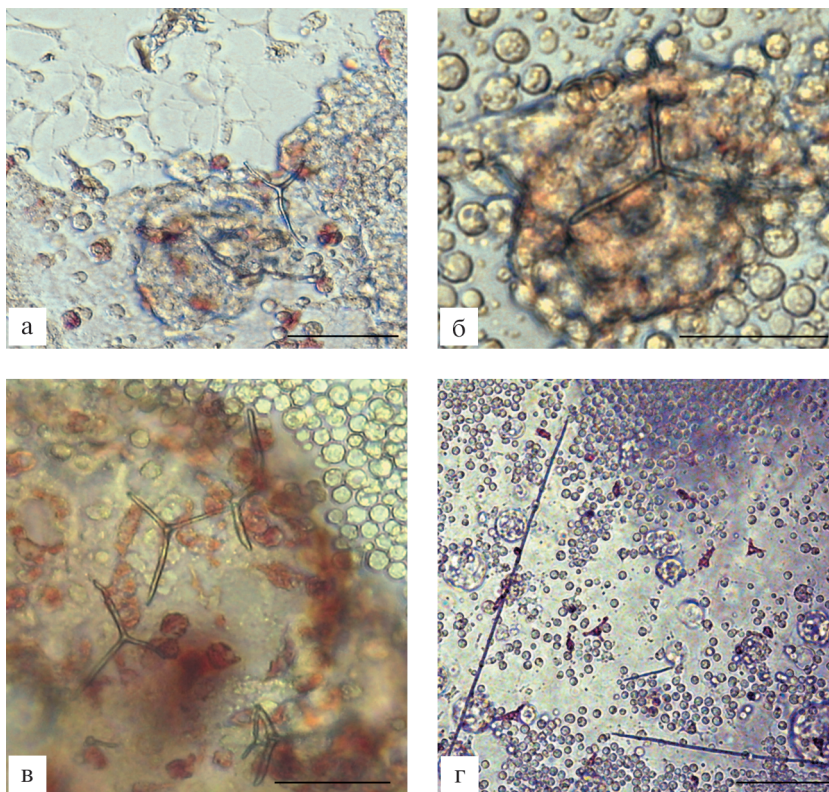


Рис. 2. Спикулогенез в культуре эмбриональных клеток морских ежей, полученных со стадии бластулы: а, б, в – культура эмбриональных клеток морского ежа *S. nudus*; г – культура эмбриональных клеток морского ежа *S. intermedius*. Клетки культивировали в течение 72 часов. Масштаб: 20 мкм (а, в), 30 мкм (б), 100 мкм (г).



УДК 576.3/.7

**SCOTT F. GILBERT – DEVELOPMENTAL BIOLOGY. NINTH EDITION.
SINAUER ASS. SUNDERLAND, MASS. 2010**

Девятое издание книги С.Ф. Гилберта подтверждает ее уже ранее сложившуюся репутацию как наиболее полного и квалифицированного учебника по биологии развития. В ней не только излагаются и прекрасно иллюстрируются сведения практически по всем аспектам этой науки – как описательной, так и экспериментальной – но и содержатся разделы, обычно в учебниках отсутствующие. Речь идет о подробной главе по генетике развития, и особенно – в чем состоит, возможно, основное новшество данного издания – о части IV, посвященной системной биологии в ее медицинских, экологических и эволюционных аспектах. Включение такого раздела в стандартный учебник заслуживает особого одобрения, поскольку в ней обсуждаются важнейшие общетеоретические вопросы, обычно вообще умалчиваемые: контекст-зависимые свойства, уровни организации и так называемая эмергенция, гетерогенная причинность и интеграция, модульность и грубость. Причем эти, казалось бы, абстрактные понятия иллюстрируются наглядными и понятными примерами. В этой связи, однако, было бы желательным хотя бы в нескольких словах упомянуть о существовании такого мощного раздела современной науки, как теория самоорганизации, где дается строгая формулировка этих и других связанных с ними понятий (и дать соответствующие ссылки, тем более, что в мире много книг разной степени популярности по этой теории).

Вообще книга Гилберта представляется мне пособием скорее и в первую очередь для преподавателей, нежели непосредственно для студентов: имея в виду сравнительно небольшой объем времени, отводящийся биологии развития даже в лучших университетах, невозможно, да и не нужно осветить в лекциях все разделы данного учебника. И тем более их не следует излагать в том порядке, в

каком они представлены. Например, сведения, содержащиеся в главе по клеточным коммуникациям, должны быть инкорпорированы в те разделы курса, где обсуждаются те стадии развития, на которых эти коммуникации особенно наглядны. То же самое относится к генетике развития и, конечно, к проблемам системной биологии – важно, чтобы они не повисали в воздухе, а были бы возможно плотнее связаны с конкретным материалом. Хотелось бы особо отметить краткое, но точное изложение основных исторических вех в развитии эмбриологических идей.

Хотя объем приведенного фактического материала весьма велик, некоторые пропуски все же бросаются в глаза. Например, на мой взгляд, буквально “просится” в раздел по эволюционной эмбриологии недавняя работа Ю.А. Краус с соавторами, открывшими эмбриональную индукцию Шпемановского типа у коралловых полипов (Kraus et al. (2007) The blastoporal organizer of a sea anemone // *Curr. Biol.* 17(20): R874-6). Поскольку в главе о системной биологии в связи с целостным подходом упоминается имя П. Вейсса, следовало бы упомянуть об А.Г. Гурвиче, которого Вейсс считал своим учителем и чей вклад в теорию развития был высоко оценен самим Гилбертом (*Int. J. Dev. Biol.* 41 (1997) p. 778). Аналогично, при упоминании об эмбриональном характере раковых клеток не мешало бы сослаться на работы Г.И. Абелева с сотрудниками, которые впервые описали этот феномен.

Хотелось бы, чтобы этот замечательный учебник стал в той или иной форме доступным возможно более широкому кругу преподавателей биологии развития и студентов России.

Белоусов Л.В.

**“СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ. БИОЛОГИЯ, ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ,
РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ”,
ПОД РЕД. БРЮСА М. КАРЛСОНА (BRUCE M. CARLSON, ED. “STEM CELL
ANTHOLOGY. STEM CELL BIOLOGY, TISSUE ENGINEERING, CLONING,
REGENERATIVE MEDICINE, AND BIOLOGY.” ACAD. PRESS, 2010)**

Свойства стволовых клеток (СК) — одна из самых интенсивно разрабатываемых тем клеточной биологии и биологии развития с перспективами использования результатов в клинике болезней человека. В книге на 402 страницах большого формата отражены различные аспекты этой важной и актуальной темы. Книга содержит пять частей, каждая из нескольких глав, написанных 70-ю авторами из разных стран. В конце каждой главы список литературы. Много лет зная профессора Брюса Карлсона, должен отметить его значительный вклад как в само появление книги, созданной по определенному плану, так и в четкий стиль изложения сложного материала. Уверен, что ясность текста — заслуга редактора, выдающегося преподавателя, много лет читавшего курсы цитологии гистологии в Мичиганском университете.

Основному тексту предшествуют основные определения и фундаментальные данные, определяющие понятие “стволовости”. Какие критерии характеризуют СК, чем они отличаются от первых и следующих их потомков? Такие критерии давно обсуждаются в литературе и, тем не менее, само понятие “ствола” — источник многих непониманий и спекуляций. Давние характеристики СК — самовосстановление, клональность, мульти- или плюрипотентность (с необходимым отличием от тотипотентных бластомеров) дополнены многосторонним материалом, во многом новым.

Часть I — Введение в биологию стволовых клеток — содержит в пяти главах основные сведения о свойствах СК, источниках их получения и потенциалах развития. Перечислены более 10 видов млекопитающих, из эмбрионов которых выделены СК. Анализируются сходства и отличия наиболее изученных эмбриональных СК мыши и человека. Отмечены показатели дифференцировки эмбриональных СК человека в культуре *in vitro* и в трансплантате, перспективы их использования в клинике. Так же тщательно рассмотрены свой-

ства постнатальных СК из разных источников и перспективы биоинженерии с использованием таких клеток и первых их производных, прогениторных клеток. Детально описаны наиболее изученные объекты — ворсинка кишечника, эпидермис кожи, сосочки языка, костный мозг. Особое внимание уделено пластичности СК в трансплантатах — возможность их трансдифференцировки или же слияния с клетками хозяина. Отдельная глава посвящена мезенхимальным СК, их особой пластичности, разным путям развития. Описание методов изоляции и культивирования таких клеток — раздел главы. На примерах костного мозга, хряща, кости и мышц рассмотрены основные результаты использования СК в клинике. Авторы предостерегают от преждевременных восторгов, отмечая, что знания о СК “рудиментарны”. Пластичность и регенераторный потенциал СК — ключевая глава этой части книги. Глава написана Б.М. Карлсоном, редактором книги, крупным специалистом, автором специальной книги по молекулярным и клеточным основам регенерации*. Основное внимание в главе уделено участию СК в процессах регенерации у млекопитающих. Интересен обзор работ последних лет, исследующих возможность восстановления свойств сердца после терапии стволовыми клетками. Результаты пока скромные, но актуальность продолжения работы очевидна, и обсуждается стратегия будущих исследований. То же относится и к восстановлению скелетных мышц. Не меньшее внимание уделено регенерационным процессам в нервной системе. Трансплантаты из разных источников используются давно. В книге обобщен большой материал и, что существенно, объективно обсуждаются различные перспективы. Большая проблема, обсуждающаяся и в других главах книги, активация собственного ствола,

* Bruce M. Carlson. Principles of Regenerative Biology. Acad. Press. Elsevier. 2007. См. рецензию Э.Н. Григорян. Онтогенез, 2010.

и не меньшая, на мой взгляд, проблема — дезактивация СК с завершением регенерации.

Часть II — Методы получения эмбриональных СК (ЭСК) — также состоит из пяти глав. Если в первой части дается обзор общих свойств СК и их потенциалов, во второй части рассмотрены конкретные приемы получения ЭСК и их культивирования. Приводятся даже фотографии образцовой лаборатории, схемы размещения ее блоков, перечислено оптимальное оборудование, указаны стандарты качества клеточного материала. Рассматривая разные подходы к получению ЭСК человека, детально описываются технические приемы, соответствующее оборудование и реактивы. Отдельная глава — генетические эксперименты с ЭСК человека. Рассмотрены варианты индуцированной трансдифференцировки, методы селекции клеток и анализа генетических изменений.

В восьми главах части III — Типы и свойства СК — рассмотрены возможные молекулярные основы плюрипотентности. Обсуждается понятие “ниши” СК, условий окружения на развитие СК, особенно, на выбор пути дифференцировки. Детально анализируются функции цитокинов и их рецепторов, транскрипционных факторов, их и некоторых других генов. Перечисляются каскады реакций, вызванных сигнальными факторами — внешними и внутренними. Упоминаются недавние данные о репрограммировании фибробластов в плюрипотентные клетки при трансдукции четырех определенных генов. Вновь сравниваются свойства эмбриональных СК мыши и человека. Интересный и актуальный раздел — мультипотентные прогениторные клетки костного мозга и нервной ткани, их изоляция и пути дифференцировки *in vitro* и *in vivo* после введения в организм. Отдельная глава — потенциалы СК костного мозга — кроветворных и мезанхимальных, а также их прогениторных клеток. Детально рассматриваются потенциалы всех этих клеток в процессах регенерации с анализом условий, определяющих направления дифференцировки. Маркеры и терапевтический потенциал кроветворных СК — отдельная глава. В другой главе рассматриваются плюрипотентные мезанхимальные СК, способные к остеогенной, адипогенной, нейральной или миогенной дифференцировке. Обсуждаются факторы развития таких СК. Отдельная глава — СК кишечника, их локализация, свойства ниши, механизмы самоподдержания ствола, дифференцировки в различные специализированные клетки и их движение по крипте. Оригинальные микрофотографии и схемы очень содержательны.

Часть IV — в десяти главах этой части обобщения знания о свойствах СК применительно к зада-

чам медицины. Важная глава о СК злокачественных опухолей, механизмах самовосстановления таких СК. Описано получение клонов, способы влияния на неопухолевую дифференцировку. Отдельно обсуждаются результаты выделения лейкемических СК и СК из солидных опухолей, о влиянии сигнальных факторов на такие и прогениторные клетки с возможным использованием в клинике. Также интересна глава о нейральных СК и их возможном участии в клинике болезней мозга. Детально анализируются нарушения при неиродегенеративных состояниях и перспективы использования в восстановительных процессах, как собственных СК, так и имплантированных клеток и трансплантатов. Отдельная проблема — восстановление последствий ожогов и кожных язв. Трансплантаты кожи используются давно. Положительны и опыты выделения СК эпидермиса и использования их культур. Подробно описано выделение таких СК, формирование клонов, использование в клинике трансплантатов. Обобщены конкретные результаты клеточной инженерии, подробно описана техника работ. Интересен для клиники и опыт использования СК в кардиоваскулярной терапии. Здесь также обобщен большой объем данных с обоснованием требований к клеточному материалу для трансплантации. Обсуждается возможность использования эмбриональных СК, а также мезанхимальных клеток костного мозга, способных к кардиомиогенной дифференцировке. Отдельная глава — трансплантация СК, способных к миогенной дифференцировке при восстановлении скелетных мышц. Как и в других главах, подробно обсуждается выбор клеточных источников и техника трансплантации. В отдельной главе отмечены перспективы терапии диабета при использовании как СК поджелудочной железы, так и печени, способных *in vitro* дифференцироваться в клетки, синтезирующие инсулин. Так же детально рассмотрены возможности восстановления хряща и кости. Рассмотрена и возможность восстановления пигментного эпителия сетчатки из эмбриональных СК, например, в случае ретинита. Очень существенно для характеристики этой части книги, что при обзоре “преклинических”, в терминологии авторов, данных обсуждаются не только положительные результаты, но также уже известные ограничения и риск при процедурах имплантации СК в организм человека.

Книгу завершает специальная часть об этических проблемах, постоянно возникающих в публицистике при описании работ со стволовыми клетками.

О СК написаны тысячи работ. Есть и крупные обзоры. Однако появление большой современной книги чрезвычайно важно. Специалисты могут убедиться в полноте знаний по своему узкому предмету исследования, а главное узнать о достижениях смежных разделов и о самой новой технике изоляции СК, клонирования о динамике превращений трансплантатов и их использовании в клинике. Для большей части биологов и медиков, не работающих со СК, но давно ими интересую-

щихся, как широко образованные исследователи и как преподаватели цитологии, эмбриологии, физиологии и генетики, эта книга также очень полезна. Несомненно, книга будет затребована многими биологами и медиками; целесообразность ее перевода не вызывает сомнения.

В.Я. Бродский

Сдано в набор 12.05.2011 г.	Подписано к печати 16.08.2011 г.	Формат бумаги $60 \times 88^{1/8}$		
Цифровая печать	Усл. печ. л. 10.0 + цв. вкл.	Усл. кр.-отт. 1.1 тыс.	Уч.-изд. л. 10.0	Бум. л. 5.0
	Тираж 103 экз.	Зак. 1652		

Учредитель: Российская академия наук,
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Издатель: Российская академия наук. Издательство "Наука", 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
Оригинал-макет подготовлен МАИК "Наука/Интерпериодика"
Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099 Москва, Шубинский пер., 6