

	Название статьи	Страницы	Цит.
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ			
<input type="checkbox"/>	ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ГЕННОЙ СЕТИ, КОНТРОЛИРУЮЩЕЙ РАЗВИТИЕ ДОРЗАЛЬНЫХ ВЫРОСТОВ ХОРИОНА ЯИЦ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> Омелина Е.С., Баричева Э.М.	163	0
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ			
<input type="checkbox"/>	МОРФОГЕНЕЗ ПРОКСИМАЛЬНЫХ ВЕТОЧНЫХ ЛИСТЬЕВ У МХОВ Игнатов М.С., Спирина У.Н.	175	1
ГАМЕТОГЕНЕЗ			
<input type="checkbox"/>	СТИМУЛЯЦИЯ <i>IN VITRO</i> ОВУЛЯЦИИ ООЦИТОВ ОСЕТРОВЫХ РЫБ ПРОГЕСТЕРОНОМ И ГОМОЛОГИЧНЫМ ГОНАДОТРОПНЫМ ГОРМОНОМ ГИПОФИЗА Скоблина М.Н., Гончаров Б.Ф.	185	1
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ			
<input type="checkbox"/>	КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ <i>R. ARVALIS</i>. ЧАСТЬ 2: РАЗВИТИЕ ГОЛОВНЫХ СТРУКТУР Северцова Е.А., Северцов А.С.	193	0
ЭМБРИОГЕНЕЗ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ			
<input type="checkbox"/>	МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЧАСТИЧНОГО УДАЛЕНИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ БЛАСТОМЕРОВ В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ВЬЮНА <i>MISGURNUS FOSSILIS L.</i> Ивашкин Е.Г., Черданцев В.Г.	202	1
ФИЗИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ			
<input type="checkbox"/>	ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТРАНСМИТТЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РАННЕМ РАЗВИТИИ МОРСКОГО ЕЖА <i>PARACENTROTUS LIVIDUS</i> Никишин Д.А., Семенова М.Н., Шмуклер Ю.Б.	212	0
<input type="checkbox"/>	ГДЕ И КОГДА В СЕРДЦЕ СЕКРЕТИРУЮТСЯ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ Коростышевская И.М., Максимов В.Ф.	217	6
КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ			
<input type="checkbox"/>	МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ОРГАНИЗУЮТ РИТМ СИНТЕЗА БЕЛКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКЗОГЕННОГО СИНХРОНИЗИРУЮЩЕГО СИГНАЛА Бродский В.Я., Васильев А.В., Терских В.В., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А., Киселева Е.В., Буверова Э.И.	229	1

УДК 575

ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ГЕННОЙ СЕТИ, КОНТРОЛИРУЮЩЕЙ РАЗВИТИЕ ДОРЗАЛЬНЫХ ВЫРОСТОВ ХОРИОНА ЯИЦ

Drosophila melanogaster

© 2012 г. Е. С. Омелина, Э. М. Баричева

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090

E-mail: omelina@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 28.03.11 г.
Окончательный вариант получен 09.06.11 г.

Формирование дорзальных выростов хориона — специализированных структур яйца *D. melanogaster*, имеющих вид эластичных трубок и обеспечивающих дыхание развивающегося эмбриона, представляет собой привлекательную модель для изучения генетических механизмов развития органов и тканей, в основе формирования которых лежит преобразование эпителиальной ткани в трубчатые структуры. В данном обзоре представлена информация о генах и белках, контролирующих развитие дорзальных выростов хориона. Показано, что в формировании дорзальных выростов хориона главную роль играют три сигнальных пути EGFR, DPP и NOTCH, которые через ряд компонентов объединяются между собой в единую генную сеть.

Образованная фолликулярными клетками оболочка яйца *D. melanogaster* представляет собой многослойную белковую структуру, обеспечивающую защиту и взаимодействие эмбриона с внешней средой (Hinton, 1969; Margaritis et al., 1980; Spradling, 1993; Dobens and Raftery, 2000). На переднем крае яйца (рис. 1) располагаются специализированные структуры — микропиле, оперкулум и дорзальные выросты хориона (ДВХ). Микропиле служит для проникновения сперматозоида внутрь яйца, оперкулум обеспечивает выход личинки из яйца. ДВХ, называемые также респираторными филаментами, представляют собой длинные пористые трубки, которые, удерживая яйцо на поверхности корма, обеспечивают дыхание развивающегося эмбриона (Spradling, 1993). Развитие передних дорзальных структур яйцевой оболочки контролируется продуктами многих генов, большинство из которых являются эволюционно-консервативными.

В данной работе рассматриваются гены и сигнальные пути, контролирующие формирование ДВХ. В норме ДВХ состоят из двух частей — ножки (stalk) и расширенной части, называемой лопастью (paddle) (рис. 1). ДВХ формируются из фолликулярных клеток, расположенных на переднем конце ооцита. Процесс формирования ДВХ делится на два этапа: структурирование фолликулярных клеток и морфогенез (Berg, 2005). В течение первого этапа, т.е. до стадии 10В (стадии развития яйцевой камеры даны в соответствии с (King, 1970) идет образование различных клеточных типов, покрывающих яйцевую камеру и формирующих буду-

щую оболочку яйца. Со стадии 10В начинается морфогенез ДВХ, во время которого две группы из 65–70 фолликулярных клеток отделяются от ооцита и начинают направленную миграцию, синтезируя дорзальные выросты хориона. В дальнейшем (стадия 13) дорзальные фолликулярные клетки прекращают миграцию, но продолжают секретировать белки хориона, что приводит к утолщению ДВХ (Berg, 2005).

Формирование ДВХ осуществляется при согласованном действии трех сигнальных путей EGFR, DPP и NOTCH (Dobens and Raftery, 2000).

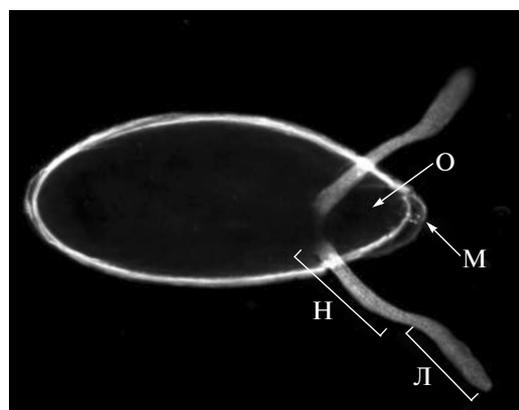


Рис. 1. Передние дорзальные структуры оболочки яйца, отложенного самкой *D. melanogaster* дикого типа. О — оперкулум, М — микропиле, Н — ножка (stalk) ДВХ, Л — лопасть (paddle) ДВХ.

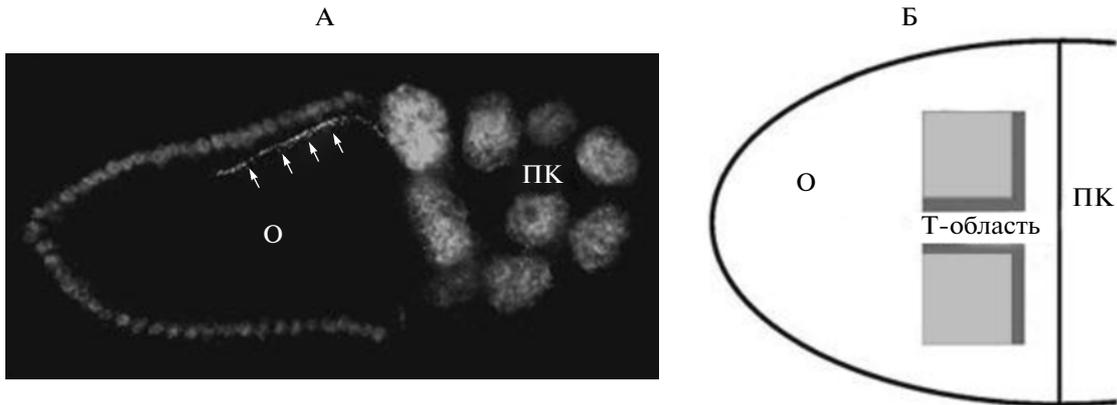


Рис. 2. А. Распределение белка GRK в переднем дорзальном углу ооцита яйцевой камеры дикого типа на стадии 10В, выявленное с помощью моноклональных антител anti-GRK (1D12 из Hybridoma Bank). Локализация белка GRK отмечена стрелками. Б. Схематическое изображение клеток, дающих начало ДВХ, в передней дорзальной части ооцита на поздней стадии 10В. Темно-серым показаны выступающие (RHO) клетки, светло-серым – покровные (BR) клетки. Впереди и между двумя областями данных клеток находится Т-область (из (Ward et al., 2006) с модификациями). О – область ооцита, ПК – область питающих клеток.

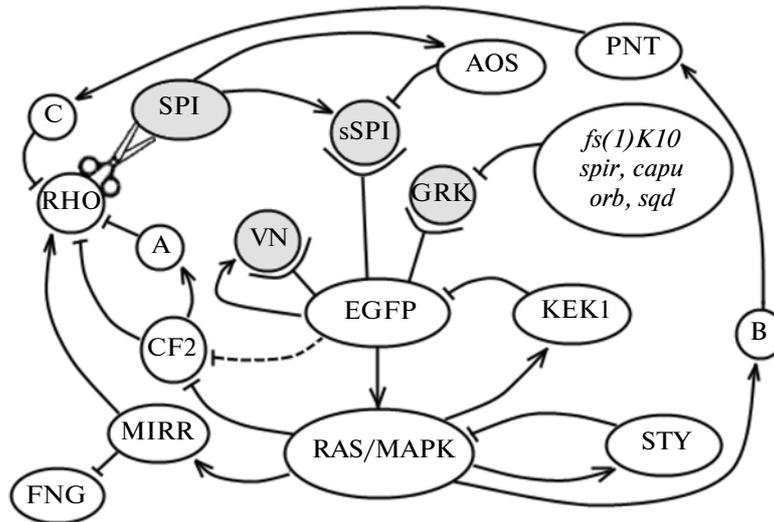


Рис. 3. Схема сигнального пути EGFR. Серым цветом показаны лиганды EGFR. Объяснения в тексте. Стрелками с острыми концами показаны процессы активации, стрелками с тупыми концами – процессы репрессии (из (Yakoby et al., 2005) с модификациями).

**СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ EGFR
ОБУСЛОВЛИВАЕТ НАЧАЛО
ФОРМИРОВАНИЯ ДОРЗАЛЬНЫХ
ВЫРОСТОВ ХОРИОНА**

Начало формирования ДВХ определяется секрецией в передней части ооцита белка GURKEN (GRK), относящегося к TGF-α классу трансформирующих фактора роста (Neuman-Silberg and Schupbach, 1993) и являющегося лигандом рецептора эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR). мРНК гена *grk* впервые выявляется на самых ранних этапах развития яйцевой камеры в районе 2В гермария (Neuman-

Silberg and Schupbach, 1993, 1996). На стадиях 8–10 транскрипты гена *grk* выявляются в переднем дорзальном углу ооцита вблизи ядра, где их распределение совпадает с локализацией белка GRK. На стадиях 10–12 распределение белка GRK отличается от расположения транскриптов, и белок занимает протяженную полосу, затрагивающую более половины длины дорзальной срединной линии ооцита (рис. 2А), тогда как транскрипты *grk* располагаются в менее протяженной области, локализуясь непосредственно возле ядра ооцита (Neuman-Silberg and Schupbach, 1996). Локализация РНК гена *grk* чрезвычайно важна для правильного формирования ДВХ (Hsu et al., 1996). Строго определен-

ная картина распределения мРНК *grk* ограничивается (рис. 3) действием продукта гена *female sterile (1) K10 (fs(1)K10)* (Prost et al., 1988; Forlani et al., 1993), активность генов *spire (spir)*, *cappuccino (capu)*, *oo18 RNA-binding protein (orb)* и *squid (sqd)* предотвращает распространение мРНК *grk* на вентральную сторону ооцита (Manseau and Schupbach, 1989; Neuman-Silberg and Schupbach, 1993; Christerson and McKearin, 1994; Roth and Schupbach, 1994).

Передача сигнала GRK соседним фолликулярным клеткам через EGFR активирует EGFR сигнальный путь (рис. 3), что обуславливает начало формирования ДВХ (Price et al., 1989; Schejter and Shilo, 1989; Neuman-Silberberg and Schupbach, 1993, 1994; Queenan et al., 1997). Активность EGFR сигнального пути контролирует ряд транскрипционных факторов, сигнальных молекул и генов, необходимых для морфогенеза яйцевой оболочки (Dobens and Raftery, 2000; Cavaliere et al., 2008; Wu et al., 2008; Yakoby et al., 2008). В процессе формирования ДВХ GRK запускает две петли положительных и три петли отрицательных обратных связей, которые регулируют активность EGFR пути в клетках фолликулярного эпителия (Yakoby et al., 2005). Первая петля положительной обратной связи обусловлена связыванием лиганда GRK с EGFR и передачей данного сигнала через RAS/RAF/MEK/MAPK каскад (Brand and Perrimon, 1994; Ray and Schupbach, 1996), что приводит к экспрессии в передних дорзальных фолликулярных клетках гена *mirror (mirr)*, кодирующего одноименный транскрипционный фактор (Nilson and Schupbach, 1999; Zhao et al., 2000). В свою очередь MIRR активирует транскрипцию гена *rhomboid (rho)*, продукт которого расщепляет второй лиганд EGFR – SPITZ (SPI), запуская таким образом другой раунд передачи EGFR сигнала внутри фолликулярных клеток (Schweitzer et al., 1995; Golembo et al., 1996; Sapir et al., 1998; Jordan et al., 2000). Транскрипционный фактор MIRR также действует как репрессор транскрипции гена *fringe (fng)*, активность которого в фолликулярных клетках важна для правильного формирования ДВХ, поскольку самки *fng*-мутантов откладывают яйца с ДВХ в разной степени слитыми между собой (Zhao et al., 2000a, b).

С компонентами первой петли положительной обратной связи взаимодействуют продукты генов *Chorion factor 2 (Cf2)* и *pointed (pnt)* (рис. 3). В отсутствие экспрессии *Cf2* происходит избыточное накопление материала ДВХ, приводящее к формированию ДВХ неправильной формы (Hsu et al., 1996). Супрессия *Cf2*, вероятно, происходит с участием MAPK, однако не исключено, что EGFR напрямую ингибирует *Cf2* (пунктирная линия от EGFR на рис. 3). CF2 напрямую или опосредованно (через некоторый фактор А) репрессирует ген *rho* (Ruohola-Baker et al., 1993; Hsu et al., 1996).

Ген *pnt*, который кодирует содержащий ETS-домен одноименный транскрипционный фактор, также необходим для правильной миграции фолликулярных клеток в процессе формирования ДВХ (Zartman et al., 2009). Экспрессия *pnt* в дорзальных фолликулярных клетках зависит от активности генов *grk*, *egfr* и *fs(1)K10* (Wieschaus et al., 1978; Morimoto et al., 1996). Возможно, действие этих генов на экспрессию *pnt* осуществляется не напрямую, а опосредованно через предполагаемый транскрипционный фактор (фактор В на рис. 3). Было показано, что PNT в свою очередь регулирует экспрессию компонентов EGFR сигнального пути, т.к. получены предварительные результаты, свидетельствующие о прямом или опосредованном влиянии PNT на экспрессию *rho*. Поскольку многие белки, содержащие ETS-домен, нуждаются в наличии партнера для выполнения своих функций (Wasyluk et al., 1993), предполагается существование некоторого дополнительного фактора С и для функционирования PNT. Возможно, PNT образует еще одну ингибиторную ветвь EGFR пути. Однако не исключено, что PNT обеспечивает перенос информации из другого сигнального пути (Morimoto et al., 1996).

Вторая (короткая) петля положительной обратной связи EGFR сигнального пути (рис. 3) зависит от транскрипционной активности гена *vein (vn)*, кодирующего третий лиганд EGFR, который, вероятно, является более слабым лигандом, чем GRK и SPI (Wasserman and Freeman, 1998). Активность *vn* зависит от EGFR сигнала – *vn* эктопически экспрессируется в яйцах *fs(1)K10*-мутантов и отсутствует у *grk*-мутантов. При этом транскрипция *vn* напрямую контролируется EGFR сигналом. Последовательная передача сигнала от VN к EGFR и обратно является необходимой для правильного развития структур яйцевой оболочки, в частности для формирования ДВХ (Wasserman and Freeman, 1998; Peri et al., 1999; Yakoby et al., 2005).

Запускаемая белком GRK первая петля отрицательной обратной связи (рис. 3) зависит от белка ARGOS (AOS). Экспрессия гена *aos*, кодирующего данный белок, контролируется белком SPI. В отсутствие последнего экспрессия *aos* снижается в два раза (Wasserman and Freeman, 1998). Ингибирование EGFR сигнала осуществляется без прямого взаимодействия AOS с рецептором, а через блокирование активности лиганда SPI (Freeman et al., 1992; Klein et al., 2004). AOS связывается со специфическим мотивом белка SPI, формируя комплекс SPI-AOS, который уже не способен связываться с EGFR (Klein et al., 2004; Yakoby et al., 2005). Таким образом, AOS нарушает ход EGFR сигнального пути и, по-видимому, играет роль в процессе морфогенеза ДВХ, не влияя, однако, на количество формирующихся ДВХ (Zartman et al., 2009).

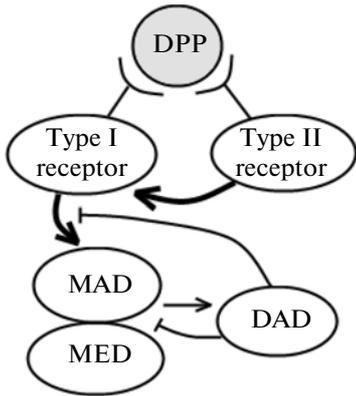


Рис. 4. Схема сигнального пути DPP. Серым цветом показан лиганд DPP. Жирными стрелками обозначен процесс фосфорилирования.

Вторая петля отрицательной обратной связи (рис. 3) предполагает участие трансмембранного белка КЕККОН-1 (КЕК1) (Ghigliione et al., 1999). Транскрипция гена *kek1* регулируется GRK/EGFR/RAF путем, поскольку известно, что избыток активной формы RAF приводит к повсеместной экспрессии *kek1*. В то же время эндогенный КЕК1 действует как репрессор EGFR: потеря активности гена *kek1* приводит к повышению уровня сигнала EGFR, а оверэкспрессия *kek1* блокирует активность EGFR. Физическое взаимодействие внеклеточного и трансмембранного доменов КЕК1 с EGFR ингибирует действие последнего, нарушая тем самым ход EGFR пути. Это дает право называть КЕК1 истинным ингибитором EGFR сигнального пути, который действует в отрицательной обратной связи для регуляции активности данного пути. Кроме того, было выдвинуто предположение о том, что существует и другой механизм действия КЕК1 на EGFR сигнальный путь. Возможно, КЕК1 мешает белку RHO положительно влиять на активность передачи EGFR сигнала (Ghigliione et al., 1999).

Третья петля отрицательной обратной связи (рис. 3) зависит от цитоплазматического белка SPROUTY (STY) (Reich et al., 1999). Экспрессия *sty*, который требуется для правильного формирования ДВХ, индуцируется в фолликулярных клетках яичника EGFR сигнальным путем. Белок GRK активирует экспрессию *sty*, поскольку она значительно снижена в яйцевых камерах *grk*-мутантов. Таким образом, *sty* является геном-мишенью пути передачи сигнала EGFR в фолликулярных клетках. Полагают, что STY ингибирует EGFR сигнальный путь, действуя на первые компоненты этого пути до MAPK. Вероятно, STY действует на RAF (Brand and Perrimon, 1994; Sapir et al., 1998; Reich et al., 1999).

Таким образом, все три ингибитора EGFR сигнального пути (AOS, КЕК1, STY) индуцируются

посредством EGFR и характеризуются сходной пространственно-временной картиной экспрессии. Понимание роли данных перекрывающихся петель обратных связей в функционировании фолликулярных клеток является одной из главных целей в развитии системно-уровневых моделей оогенеза (Yakoby et al., 2005).

Несмотря на то, что в формирование ДВХ вовлечены несколько сигнальных путей, только в отсутствие сигнала GRK дорзальные структуры яйцевой оболочки исчезают полностью (Schupbach, 1987), что свидетельствует о важности EGFR сигнального пути в развитии ДВХ.

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ DECAPENTAPLEGIC КОНТРОЛИРУЕТ РАЗВИТИЕ ДОРЗАЛЬНЫХ ВЫРОСТОВ ХОРИОНА

В формировании ДВХ важную роль играет также сигнальный путь DECAPENTAPLEGIC (DPP) (Twombly et al., 1996). Белок DPP, являющийся членом семейства трансформирующих факторов роста β (TGF- β), необходим для правильного функционирования соматических клеток яичников дрозофилы, и изменение экспрессии гена *dpp* приводит к нарушению длины яйца и неправильному формированию передних дорзальных структур яйцевой оболочки, включая ДВХ и оперкулум у *dpp*-мутантов (Padgett et al., 1987; Twombly et al., 1996).

Экспрессия *dpp* впервые выявляется в конце стадии 8 в 20–30 соматических фолликулярных клетках, расположенных на переднем конце яйцевой камеры. На стадии 10А количество клеток, в которых экспрессируется *dpp*, возрастает приблизительно в два раза. На стадиях 10–11 экспрессия *dpp* наблюдается в фолликулярных клетках, покрывающих питающие клетки, а также в лидирующей группе центрипетальных клеток, расположенных на границе ооцита и питающих клеток. На стадиях 13–14 область экспрессии *dpp* ограничена фолликулярными клетками, лежащими поверх питающих, и клетками, окружающими микропиле (Twombly et al., 1996). Таким образом, экспрессия гена *dpp* наблюдается в районах, удаленных от клеток, дающих начало ДВХ. Однако известно, что DPP может оказывать свое действие на расстоянии (Nellen et al., 1996; Singer et al., 1997; Dobens and Raftery, 1998). Полагают, что DPP диффундирует из передних фолликулярных клеток для организации морфогенеза ДВХ и дифференцировки оперкулума (Dobens and Raftery, 1998).

DPP действует через серин/треонин киназные рецепторы I и II типов (рис. 4), различающиеся своими последовательностями и лиганд-связывающими характеристиками (Derynck, 1994). DPP рецепторы I типа (SAX, TKV) кодируются генами *saxophone* (*sax*) и *thick veins* (*tkv*) (Brummel et al., 1994; Nellen et al., 1994; Xie et al., 1994), а DPP ре-

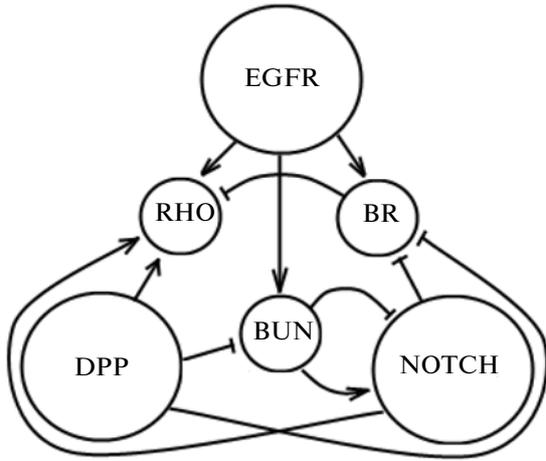


Рис. 6. Генная сеть развития дорзальных выростов хориона. Схематично представлены сигнальные пути EGFR, DPP и NOTCH, соединенные между собой посредством взаимодействия с тремя компонентами BR, RHO и BUN.

rho, что приводит к формированию слоя клеток (RHO клеток), окружающих с двух сторон кластеры BR клеток (рис. 2Б). RHO клетки, получившие название выстилающие (floor), формируют ventральную сторону каждого ДВХ (Ward et al., 2006).

В установлении границы между BR и RHO клетками N действует через стандартный сигнальный путь (рис. 5), начало которого определяется взаимодействием рецептора N с лигандами *SERRATE* (SER) и *DELTA* (DL) (Artavanis-Tsakonas et al., 1995, 1999; Dobens et al., 2005; Ward et al., 2006). Связывание лиганда с рецептором N запускает серию специфических протеолитических расщеплений с освобождением внутриклеточного домена NICD (Notch Intracellular Domain), который является активной формой белка N (Pan and Rubin, 1997; Lieber et al., 2002; Dobens et al., 2005). NICD относится к классу белков коактиваторов, не способных связываться с ДНК. NICD проникает в ядро и взаимодействует с транскрипционным фактором SUPPRESSOR OF HAIRLESS (SU(H)). Такое взаимодействие изменяет корепрессорный комплекс, в состав которого входит SU(H), в транскрипционный коактиваторный комплекс, участвующий в регуляции экспрессии генов-мишеней сигнального пути N, специфичных для разных видов клеток и тканей (Eastman et al., 1997; Wech et al., 1999; Mumm and Kopan, 2000; Cave and Caudy, 2008). Обычно белки SER, DL, NICD и SU(H) относят к компонентам стандартного (“core”) N сигнального пути. Однако известны случаи и SU(H)-независимого хода пути N (Mumm and Kopan, 2000). Следует отметить, что экспрессия *Dl* связана с активностью N сигнала петлей положительной обратной связи (Dobens et al., 2005).

В процессе формирования ДВХ взаимодействии NICD с транскрипционным фактором SU(H) (Schweisguth, 2004; Ward et al., 2006) приводит к супрессии *br* и активации *rho* (рис. 5), что способствует установлению строго определенного уровня белков в BR и RHO клетках. Однако не исключается и другой путь, при котором экспрессия *br* подавляется опосредованно через ингибирование транскрипции гена *pangolin* (*pan*), являющегося компонентом сигнального пути WINGLESS и кодирующего одноименный транскрипционный фактор, который, как известно, необходим для экспрессии *br* и нормального формирования ДВХ (Jordan et al., 2005). Кроме того, экспрессия *pan* приводит к подавлению экспрессии *rho*. Следует отметить, что в передних дорзальных фолликулярных клетках BR способен непосредственно подавлять экспрессию *rho* (Ward et al., 2006).

Установлено, что в ходе развития ДВХ с N сигнальным путем взаимодействуют гены *extra macrochaetae* (*emc*) и *tramtrack* (*ttk*) (рис. 5). *emc*-мутанты откладывают вентрализованные яйца с ДВХ различной морфологии – от расположенных близко друг к другу и слитых в основании до полностью слившихся между собой. Экспрессия *emc* в фолликулярных клетках яйцевой камеры дрозофилы обеспечивается сигнальным путем N (Adam and Montell, 2004). Экспрессия гена *ttk* необходима для удлинения трубок формирующихся ДВХ, и *ttk*-мутанты откладывают яйца с укороченными ДВХ вследствие нарушения формы фолликулярных клеток, образующих ДВХ (French et al., 2003; Boyle and Berg, 2009). Следует отметить, что во время морфогенеза дорзальных выростов хориона N и TTK являются взаиморепрессорами. Кроме того, N и *ttk* взаимодействуют с *Ecdysone receptor* (*EcR*), в результате чего N может выступать и в роли активатора *ttk*, поскольку на стадии 10 экспрессия N способствует нормальной активности *EcR*, продукт которого в свою очередь активирует транскрипцию *ttk* (Sun et al., 2008; Boyle and Berg, 2009). В то же время отсутствие экспрессии *EcR* приводит к активации N и, соответственно, отсутствию сигнала TTK. Следовательно, *EcR* подавляет экспрессию N (Boyle and Berg, 2009).

Таким образом, формирование дорзальных выростов хориона представляет собой сложный многоступенчатый процесс, ход которого регулируется сразу несколькими сигнальными путями. При этом через ряд компонентов отдельные сигнальные пути объединяются в единую генную сеть, контролирующую развитие ДВХ.

ГЕННАЯ СЕТЬ РАЗВИТИЯ ДОРЗАЛЬНЫХ ВЫРОСТОВ ХОРИОНА

К числу генов, объединяющих отдельные сигнальные пути в единую генную сеть, относится ген *br* (рис. 6), кодирующий одноименный транскрип-

ционный фактор, который контролирует активность ряда генов, необходимых для формирования ДВХ (Deng and Bownes, 1997; Ward et al., 2006; Zartman et al., 2008). Ген *br* взаимодействует не только с сигнальным путем N, как было описано выше, но также с EGFR и DPP сигналами (Deng and Bownes, 1997). Динамику экспрессии *br* можно разделить на несколько этапов (Yakoby et al., 2008). Впервые экспрессия *br* наблюдается на стадии 6 во всех фолликулярных клетках, покрывающих яйцевую камеру. До стадии 9 количество BR не зависит ни от EGFR, ни от DPP сигналов (этап 1). В середине оогенеза экспрессия *br* наблюдается в фолликулярных клетках, связанных с ооцитом (этап 2). На ранней стадии 10B вслед за формированием градиента EGFR наблюдается подавление экспрессии *br* в районе дорзальной срединной линии ооцита и в передних дорзальных клетках, покрывающих ооцит (этап 3). Репрессия *br* в срединной линии обусловлена активностью транскрипционного фактора PNT, индуцируемого EGFR сигналом (Morimoto et al., 1996; Deng and Bownes, 1997; Yamada et al., 2003; Yakoby et al., 2008; Zartman et al., 2009), а репрессия *br* в передних дорзальных клетках связана с началом активности DPP сигнального пути (Peri and Roth, 2000; Yakoby et al., 2008). Следующий этап характеризуется увеличением экспрессии *br* в покровных клетках, обусловленной активностью RAS/MAPK пути, который стимулируется EGFR сигналом (Deng and Bownes, 1997; Atkey et al., 2006; Yakoby et al., 2008). При этом уровень MAPK сигнала в покровных клетках постепенно снижается, поскольку в этих клетках BR репрессирует *rho*, являющийся важнейшим компонентом первой положительной петли EGFR сигнала (Peri et al., 1999; Ward et al., 2006). Высокий уровень BR в покровных клетках приводит к повышению уровня TKV, который будучи DPP рецептором I типа, обеспечивает поступление DPP в покровные клетки, где DPP выступает в роли репрессора *br*, ограничивая продолжительность экспрессии *br* в этих клетках. Таким образом, экспрессия *br* во время развития ДВХ устанавливается в результате согласованного действия сигналов EGFR, DPP и N (Deng and Bownes, 1997; James and Berg, 2003; Ward et al., 2006).

Следует отметить, что экспрессия гена *br* контролируется также продуктами генов *ttk* и *emc*, взаимодействующих с сигнальным путем N, как было описано выше. У *ttk*-мутантов наблюдается нарушение картины экспрессии гена *br* — снижение уровня экспрессии *br* в покровных клетках и усиление экспрессии в остальных фолликулярных клетках (Boyle and Berg, 2009), тогда как в норме экспрессия *br* увеличена в покровных клетках, снижена в основной массе фолликулярных клеток и отсутствует в T-области (Ward et al., 2006). Локализация экспрессии *br* также нарушена у *emc*-мутантов, характеризующихся эктопической экс-

прессией *emc*. Однако известно, что экспрессия *br* во время ранних и средних стадий оогенеза не зависит от нарушения экспрессии *emc* (Paradia et al., 2005), поэтому предполагается не прямое влияние EMC на экспрессию *br* с помощью белков-посредников. Возможно, *br* объединяет в единую генную сеть не только сигнальные пути EGFR, DPP и N, но также и другие пути. Так, с помощью микроципового анализа было показано, что транскрипция *br* может контролироваться ECDYSONE RECEPTOR (ECR) и WINGLESS (WG) сигнальными путями, которые в свою очередь зависят от активности EGFR пути, однако выяснение точных механизмов данной регуляции требует проведения дальнейших исследований (Jordan et al., 2005).

Как было упомянуто ранее, экспрессия гена *rho* контролируется сигнальными путями EGFR и N. Однако было показано, что в фолликулярных клетках экспрессия *rho* не может быть индуцирована одним EGFR сигналом, а требует согласованного действия EGFR и DPP сигнальных путей (Peri and Roth, 2000). Таким образом, экспрессия гена *rho* регулируется сигнальными путями EGFR, DPP и N (рис. 6).

С тремя сигнальными путями (рис. 6) взаимодействует также ген *bunched* (*bun*), продукт которого необходим для разделения клеток, формирующих ДВХ и оперкулум, а также участвует в регуляции миграции центрипетальных клеток. Определенный уровень экспрессии *bun* в фолликулярных клетках яйцевой камеры обеспечивается взаимодействием DPP и EGFR сигналов (Dobens et al., 1997, 2000, 2005). DPP сигнал действует как репрессор экспрессии *bun* в передних фолликулярных клетках, а EGFR сигнал активирует его экспрессию. Кроме того, белок BUN контролирует активность сигнального пути N, поскольку у *bun*-мутантов в передних фолликулярных клетках, покрывающих ооцит, наблюдается активация N сигнала. Показано, что высокий уровень BUN в цилиндрических фолликулярных клетках, окружающих ооцит, блокирует накопление SER (лиганда рецептора N) в этих клетках, в то время как в соседних центрипетальных клетках BUN, действуя опосредованно, повышает уровень SER (Dobens et al., 2005). Предполагается, что существует какой-то дополнительный механизм (фактор D), вовлеченный в регуляцию активности N в передних фолликулярных клетках (рис. 5). Было высказано предположение, что в качестве фактора D может выступать белок FNG, обладающий гликозилтрансферазной активностью. FNG способен модифицировать N рецептор, что приводит к усилению взаимодействия рецептора N с лигандами (Bruckner et al., 2000; Moloney et al., 2000; Grammont and Irvine, 2001). Однако, к сожалению, данная гипотеза не получила подтверждения, поскольку было установлено, что в оогенезе FNG не

регулирует активность *Ser* (Zhao et al., 2000b). Тем не менее, активность *fng* в фолликулярных клетках необходима для регуляции активности сигнального пути N через DL (рис. 5), что важно для нормального морфогенеза ДВХ (Zhao et al., 2000a). Таким образом, ген *fng* взаимодействует с двумя сигнальными путями EGFR и N.

К числу генов, контролирующих формирование ДВХ и регулируемых двумя сигнальными путями, относятся также гены *brinker* (*brk*), *Cad74A* и *mirr*. Оптимальное количество BRK в покровных клетках определяется взаимодействием EGFR и DPP сигналов. Активность EGFR сигнального пути в покровных клетках индуцирует экспрессию гена *brk*. Постепенное поступление лиганда DPP из передних дорзальных фолликулярных клеток в покровные приводит к репрессии активности гена *brk*. Следует отметить, что BRK и DPP являются взаиморепрессорами (Chen and Schupbach, 2006; Shrivage et al., 2007). В срединной дорзальной линии ооцита экспрессия гена *Cad74A* активируется EGFR сигнальным путем через PNT, действующим напрямую или опосредованно посредством репрессии *br*, продукт которого является репрессором *Cad74A* (Twombly et al., 1996; Yakoby et al., 2008; Zartman et al., 2008). В передних дорзальных клетках наблюдается подавление экспрессии *Cad74A* под действием DPP сигнального пути с использованием рецептора TKV, увеличение уровня активной формы которого приводит к репрессии *Cad74A* в этом районе. Позже в этих клетках вследствие снижения экспрессии *br* на стадии 10B наблюдается сильная экспрессия *Cad74A*, однако остается небольшая полоса репрессии *Cad74A* между оперкулумом и основной частью яйца, соответствующая высокому уровню BR (Zartman et al., 2008). В передних дорзальных фолликулярных клетках взаимодействие между EGFR и DPP сигнальными путями осуществляется посредством генов *mirr* и *capricua* (*cic*). В этих клетках сигнал EGFR подавляет активность *cic*, который является репрессором транскрипции генов дрозофилы, в частности гена *dpp*. Репрессия *cic* посредством EGFR позволяет DPP индуцировать транскрипцию *mirr* (Atkey et al., 2006).

К настоящему времени описан ряд генов, участие которых в развитии ДВХ несомненно, однако выяснение точных механизмов взаимодействия с вышеописанными сигнальными путями требует проведения дополнительных исследований. К числу таких генов относятся *kayak* (*kay*), *toucan* (*toc*), *brainiac* (*brn*), *bullwinkle* (*bwk*) и *emc*.

Ген *kayak* (*kay*) принимает участие в морфогенезе ДВХ со стадии 11, и для транскрипции *kay* в фолликулярных клетках, дающих начало ДВХ, необходимы активность EGFR сигнального пути и определенный уровень DPP сигнала (Dequier et al., 2001). Однако способ взаимодействия *kay* с данны-

ми сигнальными путями во время формирования ДВХ остаются неизвестными. Сходным образом обстоит дело с геном *toc*, о котором известно, что он не напрямую взаимодействует с компонентами N пути (Grammont et al., 1997), и геном *brn*, который действует параллельно с компонентами EGFR пути (Goode et al., 1996). Особый интерес представляет ген *bwk*, регулирующий морфогенез ДВХ, поскольку у *bwk*-мутантов наблюдается нарушение согласованного передвижения групп BR и RHO клеток. Однако было показано, что *bwk* действует через сигнальный путь, независимый от EGFR пути. Поэтому исследование участия *bwk* в развитии ДВХ представляет большой интерес для понимания процессов регуляции морфогенеза (Dorman et al., 2004). *emc* был описан ранее, как ген, взаимодействующий с сигнальным путем N. Но также есть данные о том, что локализация экспрессии *emc* контролируется EGFR путем, поскольку у мутантов по генам *grk*, *fs(1)K10* и *egfr* наблюдается нарушение картины экспрессии *emc* (Campuzano, 2001; Papadia et al., 2005). Однако сделать однозначные выводы об активаторном или супрессорном характере данного взаимодействия на данный момент невозможно, и требуется выявление дополнительных компонентов, участвующих в данном взаимодействии.

К настоящему времени получены интересные, однако, требующие дальнейшего изучения, данные о взаимном влиянии активности сигнальных путей EGFR, DPP и N. Так, например, данные микрочипового анализа показали, что сигнальный путь EGFR может активировать транскрипцию компонентов DPP пути (Jordan et al., 2005), в то время как в передних фолликулярных клетках постоянная активность EGFR сигнального пути подавляет экспрессию *dpp* (Larkin et al., 1999). Кроме того, о взаимодействии этих путей свидетельствуют данные о том, что *dpp* перестает экспрессироваться в яйцевой камере у дигетерозигот *N*; *grk* (Larkin et al., 1999), а у *grk*-мутантов наблюдается эктопическая экспрессия *dpp* на заднем полюсе яйцевой камеры на стадиях 9–14 (Twombly et al., 1996).

Таким образом, процесс развития ДВХ включает образование различных клеточных типов, согласованную миграцию и изменение формы клеток, дающих начало ДВХ. Формирование ДВХ контролируется обширной генной сетью, в основе которой лежит согласованная работа трех сигнальных путей EGFR, DPP и NOTCH, устанавливающих через последовательное действие петель прямых и обратных связей. Следует отметить, что в данном обзоре представлена информация далеко не обо всех генах и сигнальных путях, участвующих в этом процессе, но собраны данные о наиболее выдающихся компонентах генной сети развития ДВХ. Понимание клеточных и генетических механизмов, контролирующих преобразование

ДВХ из эпителиальной ткани, может быть полезным для развития представлений о формировании органов, в основе развития которых лежит образование трубчатых структур из эпителиальной ткани (Berg, 2008). Также данная работа может быть полезна для выявления таких ключевых компонентов, присутствие или отсутствие которых определяет формирование того или иного органа.

Авторы выражают искреннюю благодарность и признательность профессору И.И. Кикнадзе и Н.В. Баттулиной (ИЦиГ СО РАН) за помощь и ценные советы в процессе составления обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adam J.C., Montell D.J. A role for extra macrochaetae downstream of Notch in follicle cell differentiation // *Development*. 2004. V. 131. № 23. P. 5971–5980.
- Artavanis-Tsakonas S., Matsuno K., Fortini M.E. Notch signaling // *Science*. 1995. V. 268. № 5208. P. 225–232.
- Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D., Lake R.J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development // *Science*. 1999. V. 284. P. 770–776.
- Artavanis-Tsakonas S., Simpson P. Choosing a cell fate: a view from the Notch locus // *Trends Genet.* 1991. V. 7. № 11/12. P. 403–408.
- Atkey M.R., Lachance J.F., Walczak M. et al. Capicua regulates follicle cell fate in the *Drosophila* ovary through repression of *mirror* // *Development*. 2006. V. 133. № 11. P. 2115–2123.
- Berg C.A. The *Drosophila* shell game: patterning genes and morphological change // *Trends Genet.* 2005. V. 21. № 6. P. 346–355.
- Berg C.A. Tube formation in *Drosophila* egg chambers // *Tissue Eng. Part A*. 2008. V. 14. № 9. P. 1479–1488.
- Brand A.H., Perrimon N. Raf acts downstream of the EGF receptor to determine dorsoventral polarity during *Drosophila* oogenesis // *Genes Dev*. 1994. V. 8. № 5. P. 629–639.
- Bruckner K., Perez L., Clausen H., Cohen S. Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions // *Nature*. 2000. V. 406. № 6794. P. 411–415.
- Brummel T., Twombly V., Marques G. et al. Characterization and relationship of *dpp* receptors encoded by the *saxophone* and *thick veins* genes in *Drosophila* // *Cell*. 1994. V. 78. № 2. P. 251–261.
- Boyle M.J., Berg C.A. Control in time and space: Tramtrack69 cooperates with Notch and Ecdysone to repress ectopic fate and shape changes during *Drosophila* egg chamber maturation // *Development*. 2009. V. 136. № 24. P. 4187–4197.
- Campuzano S. Emc, a negative HLH regulator with multiple functions in *Drosophila* development // *Oncogene*. 2001. V. 20. № 58. P. 8299–8307.
- Cavaliere V., Bernardi F., Romani P. et al. Building up the *Drosophila* eggshell: First of all the eggshell genes must be transcribed // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. № 8. P. 2061–2072.
- Cave J.W., Caudy M.A. Promoter-specific co-activation by *Drosophila* Mastermind // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 377. № 2. P. 658–661.
- Chen Y., Schupbach T. The role of *brinker* in eggshell patterning // *Mech. Dev.* 2006. V. 123. № 5. P. 395–406.
- Christerson L.B., McKearin D. *orb* is required for anteroposterior and dorsoventral patterning during *Drosophila* oogenesis // *Genes Dev*. 1994. V. 8. № 5. P. 614–628.
- Deng W.M., Bownes M. Two signalling pathways specify localised expression of the Broad-Complex in *Drosophila* eggshell patterning and morphogenesis // *Development*. 1997. V. 124. № 22. P. 4639–4647.
- Dequier E., Souid S., Pal M. et al. Top-DER- and Dpp-dependent requirements for the *Drosophila* *fos/kayak* gene in follicular epithelium morphogenesis // *Mech. Dev.* 2001. V. 106. № 1–2. P. 47–60.
- Derynck R. TGF-beta-receptor-mediated signaling // *Trends Biochem. Sci.* 1994. V. 19. № 12. P. 548–553.
- Dobens L.L., Hsu T., Twombly V. et al. The *Drosophila* *bunched* gene is a homologue of the growth factor stimulated mammalian TSC-22 sequence and is required during oogenesis // *Mech. Dev.* 1997. V. 65. № 1–2. P. 197–208.
- Dobens L., Jaeger A., Peterson J.S., Raftery L.A. Bunched sets a boundary for Notch signaling to pattern anterior eggshell structures during *Drosophila* oogenesis // *Dev. Biol.* 2005. V. 287. № 2. P. 425–437.
- Dobens L.L., Peterson J.S., Treisman J., Raftery L.A. *Drosophila* *bunched* integrates opposing DPP and EGF signals to set the operculum boundary // *Development*. 2000. V. 127. № 4. P. 745–754.
- Dobens L.L., Raftery L.A. *Drosophila* oogenesis: a model system to understand TGF-/Dpp directed cell morphogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998. P. 245–247.
- Dobens L.L., Raftery L.A. Integration of epithelial patterning and morphogenesis in *Drosophila* ovarian follicle cells // *Dev. Dyn.* 2000. V. 218. № 1. P. 80–93.
- Dorman J.B., James K.E., Fraser S.E. et al. *bullwinkle* is required for epithelial morphogenesis during *Drosophila* oogenesis // *Dev. Biol.* 2004. V. 267. № 2. P. 320–341.
- Eastman D.S., Slee R., Skoufos E. et al. Synergy between suppressor of Hairless and Notch in regulation of Enhancer of split m gamma and m delta expression // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. № 9. P. 5620–5628.
- Freeman M., Klambt C., Goodman C.S., Rubin G.M. The *argos* gene encodes a diffusible factor that regulates cell fate decisions in the *Drosophila* eye // *Cell*. 1992. V. 69. № 6. P. 963–975.
- French R.L., Cosand K.A., Berg C.A. The *Drosophila* female sterile mutation twin peaks is a novel allele of tramtrack and reveals a requirement for Ttk69 in epithelial morphogenesis // *Dev. Biol.* 2003. V. 253. № 1. P. 18–35.
- Forlani S., Ferrandon D., Saget O., Mohier E. A regulatory function for K10 in the establishment of dorsoventral polarity in the *Drosophila* egg and embryo // *Mech. Dev.* 1993. V. 41. № 2–3. P. 109–120.
- Grammont M., Dastugue B., Couderc J.L. The *Drosophila* *toucan* (*toc*) gene is required in germline cells for the somatic cell patterning during oogenesis // *Development*. 1997. V. 124. № 24. P. 4917–4926.
- Grammont M., Irvine K.D. Fringe and Notch specify polar cell fate during *Drosophila* oogenesis // *Development*. 2001. V. 128. № 12. P. 2243–2253.

- Ghiglione C., Carraway K.L., Amundadottir L.T. et al. The transmembrane molecule kerkon 1 acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the *Drosophila* EGF receptor during oogenesis // *Cell*. 1999. V. 96. № 6. P. 847–856.
- Golembo M., Raz E., Shilo B.Z. The *Drosophila* embryonic midline is the site of Spitz processing, and induces activation of the EGF receptor in the ventral ectoderm // *Development*. 1996. V. 122. № 11. P. 3363–3370.
- Goode S., Morgan M., Liang Y.P., Mahowald A.P. *brainiac* encodes a novel, putative secreted protein that cooperates with Grk TGF in the genesis of the follicular epithelium // *Dev. Biol*. 1996. V. 178. № 1. P. 35–50.
- Hinton H.E. Respiratory systems of insect egg shells // *A. Rev. Ent.* 1969. V. 14. P. 343–368.
- Hsu T., Bagni C., Sutherland J.D., Kafatos F.C. The transcription factor CF2 is a mediator of EGFR-activated dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis // *Genes Dev*. 1996. V. 10. № 11. P. 1411–1421.
- Inoue H., Imamura T., Ishidou Y. et al. Interplay of signal mediators of decapentaplegic (Dpp): molecular characterization of mothers against dpp, Medea, and daughters against dpp // *Mol. Biol. Cell*. 1998. V. 9. № 8. P. 2145–2156.
- James K.E., Berg C.A. Temporal comparison of Broad-Complex expression during eggshell-appendage patterning and morphogenesis in two *Drosophila* species with different eggshell-appendage numbers // *Gene Expr. Patterns*. 2003. V. 3. № 5. P. 629–634.
- Jordan K.C., Clegg N.J., Blasi J.A. et al. The homeobox gene *mirror* links EGF signalling to embryonic dorso-ventral axis formation through Notch activation // *Nat. Genet*. 2000. V. 24. № 4. P. 429–433.
- Jordan K.C., Hatfield S.D., Tworoger M. et al. Genome wide analysis of transcript levels after perturbation of the EGFR pathway in the *Drosophila* ovary // *Dev. Dyn*. 2005. V. 232. № 3. P. 709–724.
- King R.C. Ovarian Development in *Drosophila melanogaster*. New York: Academic, 1970. 227 p.
- Klein D.E., Nappi V.M., Reeves G.T. et al. Argos inhibits epidermal growth factor receptor signalling by ligand sequestration // *Nature*. 2004. V. 430. № 7003. P. 1040–1044.
- Kretzschmar M., Massagué J. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling // *Curr. Opin. Genet. Dev*. 1998. V. 8. № 1. P. 103–111.
- Larkin M.K., Deng W.M., Holder K. et al. Role of Notch pathway in terminal follicle cell differentiation during *Drosophila* oogenesis // *Dev. Genes Evol*. 1999. V. 209. № 5. P. 301–311.
- Letsou A., Arora K., Wrana J.L. *Drosophila* Dpp signaling is mediated by the *punt* gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family // *Cell*. 1995. V. 80. № 6. P. 899–908.
- Lieber T., Kidd S., Young M.W. Kuzbanian-mediated cleavage of *Drosophila* Notch // *Genes Dev*. 2002. V. 16. № 2. P. 209–221.
- Manseau L.J., Schupbach T. *cappuccino* and *spire*: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the *Drosophila* embryo // *Genes Dev*. 1989. V. 3. № 9. P. 1437–1452.
- Mantrova E.Y., Schulz R.A., Hsu T. Oogenic function of the myogenic factor D-MEF2: negative regulation of the decapentaplegic receptor gene thick veins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. № 21. P. 11889–11894.
- Margaritis L., Kafatos F., Petri W. The eggshell of *Drosophila melanogaster*. I. Fine structure of the layers and regions of the wild-type eggshell // *J. Cell Sci*. 1980. V. 43. P. 1–35.
- Massagué J. TGF-beta signal transduction // *Annu. Rev. Biochem*. 1998. V. 67. P. 753–791.
- Moloney D.J., Panin V.M., Johnston S.H. et al. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch // *Nature*. 2000. V. 406. № 6794. P. 369–375.
- Morimoto A.M., Jordan K.C., Tietze K. et al. Pointed, an ETS domain transcription factor, negatively regulates the EGF receptor pathway in *Drosophila* oogenesis // *Development*. 1996. V. 122. № 12. P. 3745–3754.
- Mumm J.S., Kopan R. Notch signaling: from the outside in // *Dev. Biol*. 2000. V. 228. № 2. P. 151–165.
- Muzzopappa M., Wappner P. Multiple roles of the F-box protein Slimb in *Drosophila* egg chamber development // *Development*. 2005. V. 132. № 11. P. 2561–2571.
- Nellen D., Affolter M., Basler K. Receptor serine/threonine kinases implicated in the control of *Drosophila* body pattern by *decapentaplegic* // *Cell*. 1994. V. 78. № 2. P. 225–237.
- Nellen D., Burke R., Struhl G., Basler K. Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient // *Cell*. 1996. V. 85. № 3. P. 357–368.
- Neuman-Silberberg F.S., Schupbach T. The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF-like protein // *Cell*. 1993. V. 75. № 1. P. 165–174.
- Neuman-Silberberg F.S., Schupbach T. The *Drosophila* TGF-like protein Gurken: expression and cellular localization during *Drosophila* oogenesis // *Mech. Dev*. 1996. V. 59. № 2. P. 105–113.
- Neuman-Silberberg F.S., Schupbach T. Dorsoventral axis formation in *Drosophila* depends on the correct dosage of the gene *gurken* // *Development*. 1994. V. 120. № 9. P. 2457–2463.
- Nilson L.A., Schupbach T. EGF receptor signaling in *Drosophila* oogenesis // *Curr. Topics Dev. Biol*. 1999. V. 44. P. 203–243.
- Padgett R.W., St. Johnston R.D., Gelbart W.M. A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor- family // *Nature*. 1987. V. 325. № 6099. P. 81–84.
- Pan D., Rubin G.M. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis // *Cell*. 1997. V. 90. № 2. P. 271–280.
- Papadia S., Tzolovsky G., Zhao D. et al. *emc* has a role in dorsal appendage fate formation in *Drosophila* oogenesis // *Mech. Dev*. 2005. V. 122. № 9. P. 961–974.
- Peri F., Bokel C., Roth S. Local Gurken signaling and dynamic MAPK activation during *Drosophila* oogenesis // *Mech. Dev*. 1999. V. 81. № 1–2. P. 75–88.

- Peri F., Roth S.* Combined activities of Gurken and Decapentaplegic specify dorsal chorion structures of the *Drosophila* egg // *Development*. 2000. V. 127. № 4. P. 841–850.
- Price J.V., Clifford R.J., Schupbach T.* The maternal ventralizing locus torpedo is allelic to faint little ball, an embryonic lethal, and encodes the *Drosophila* EGF receptor homolog // *Cell*. 1989. V. 56. № 6. P. 1085–1092.
- Prost E., Deryckere F., Roos C. et al.* Role of the oocyte nucleus in determination of the dorsoventral polarity of *Drosophila* as revealed by molecular analysis of the K10 gene // *Genes Dev*. 1988. V. 2. № 7. P. 891–900.
- Queenan A.M., Ghabrial A., Schupbach T.* Ectopic activation of torpedo/Egfr, a *Drosophila* receptor tyrosine kinase, dorsalizes both the eggshell and the embryo // *Development*. 1997. V. 124. № 19. P. 3871–3880.
- Ray R.P., Schupbach T.* Intercellular signaling and the polarization of body axes during *Drosophila* oogenesis // *Genes Dev*. 1996. V. 10. № 14. P. 1711–1723.
- Reich A., Sapir A., Shilo B.* Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling // *Development*. 1999. V. 126. № 18. P. 4139–4147.
- Roth S., Schupbach T.* The relationship between ovarian and embryonic dorsoventral patterning in *Drosophila* // *Development*. 1994. V. 120. № 8. P. 2245–2257.
- Ruberte E., Marty T., Nellen D. et al.* An absolute requirement for both the Type II and Type I receptors, punt and thick veins, for Dpp signaling *in vivo* // *Cell*. 1995. V. 80. № 6. P. 889–897.
- Ruohola-Baker H., Greil E., Chou T.B. et al.* Spatially localized *rhomboid* is required for establishment of the dorsal-ventral axis in *Drosophila* oogenesis // *Cell*. 1993. V. 73. № 5. P. 953–965.
- Sapir A., Schweitzer R., Shilo B.Z.* Sequential activation of the EGF receptor pathway during *Drosophila* oogenesis establishes the dorsoventral axis // *Development*. 1998. V. 125. № 2. P. 191–200.
- Schejter E.D., Shilo B.Z.* The *Drosophila* EGF receptor homolog (DER) gene is allelic to faint little ball, a locus essential for embryonic development // *Cell*. 1989. V. 56. № 6. P. 1093–1104.
- Schupbach T.* Germ line and soma cooperate during oogenesis to establish the dorsoventral pattern of egg shell and embryo in *Drosophila melanogaster* // *Cell*. 1987. V. 49. № 5. P. 699–707.
- Schweisguth F.* Regulation of Notch signaling activity // *Curr. Biol*. 2004. V. 14. № 3. P. 129–138.
- Schweitzer R., Shaharabany M., Seger R., Shilo B.Z.* Secreted Spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination // *Genes Dev*. 1995. V. 9. № 12. P. 1518–1529.
- Singer M.A., Penton A., Twombly V. et al.* Signaling through both type I DPP receptors is required for anterior-posterior patterning of the entire *Drosophila* wing // *Development*. 1997. V. 124. № 1. P. 79–89.
- Shi Y., Massagué J.* Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus // *Cell*. 2003. V. 113. № 6. P. 685–700.
- Shrivage B.V., Altmann G., Technau M., Roth S.* The role of Dpp and its inhibitors during eggshell patterning in *Drosophila* // *Development*. 2007. V. 134. № 12. P. 2261–2271.
- Spradling A.* *Developmental genetics of oogenesis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. 70 p.
- Sun J., Smith L., Armento A., Deng W.M.* Regulation of the endocycle/gene amplification switch by Notch and ecdysone signaling // *J. Cell Biol*. 2008. V. 182. № 5. P. 885–896.
- Twombly V., Blackman R.K., Jin H.* The TGF-beta signaling pathway is essential for *Drosophila* oogenesis // *Development*. 1996. V. 122. № 5. P. 1555–1565.
- Ward E.J., Berg C.A.* Juxtaposition between two cell types is necessary for dorsal appendage tube formation // *Mech. Dev*. 2005. V. 122. № 2. P. 241–255.
- Ward E.J., Zhou X., Berg C.A., Ruohola-Baker H.* Border of Notch activity establishes a boundary between the two dorsal appendage tube cell types // *Dev. Biol*. 2006. V. 297. № 2. P. 461–470.
- Wasserman J.D., Freeman M.* An autoregulatory cascade of EGF receptor signaling patterns the *Drosophila* egg // *Cell*. 1998. V. 95. № 3. P. 355–364.
- Wasyluk B., Hahn S.L., Giovane A.* The ETS family of transcription factors // *Europ. J. Biochem*. 1993. V. 211. № 1–2. P. 7–18.
- Wech I., Bray S., Delidakis C., Preiss A.* Distinct expression patterns of different enhancer of split bHLH genes during embryogenesis of *Drosophila melanogaster* // *Dev. Genes Evol*. 1999. V. 209. № 6. P. 370–375.
- Wieschaus E., Marsh J.L., Gehring W.J.* fs(1)K10, a germline-dependent female sterile mutation causing abnormal chorion morphology in *Drosophila melanogaster* // *Roux Arch. Dev. Biol*. 1978. V. 184. P. 75–82.
- Wu X., Tanwar P.S., Raftery L.A.* *Drosophila* follicle cells: morphogenesis in an eggshell // *Semin. Cell Dev. Biol*. 2008. V. 19. № 3. P. 271–282.
- Xie T., Finelli A., Padgett R.W.* The *Drosophila saxophone* gene: a serine-threonine kinase receptor of the TGF-superfamily // *Science*. 1994. V. 263. № 5154. P. 1756–1759.
- Xu T., Caron L.A., Fehon R.G., Artavanis-Tsakonas S.* The involvement of the Notch locus in *Drosophila* oogenesis // *Development*. 1992. V. 115. P. 913–922.
- Yakoby N., Bristow C.A., Gouzman I. et al.* Systems-level questions in *Drosophila* oogenesis // *IEE Proc. Systems Biol*. 2005. V. 152. № 4. P. 276–284.
- Yakoby N., Lembong J., Schüpbach T., Shvartsman S.Y.* *Drosophila* eggshell is patterned by sequential action of feedforward and feedback loops // *Development*. 2008. V. 135. № 2. P. 343–351.
- Yamada T., Okabe M., Hiromi Y.* EDL/MAE regulates EGF-mediated induction by antagonizing ETS transcription factor Pointed // *Development*. 2003. V. 130. № 17. P. 4085–4096.
- Zartman J.J., Kanodia J.S., Cheung L.S., Shvartsman S.Y.* Feedback control of the EGFR signaling gradient: superposition of domain-splitting events in *Drosophila* oogenesis // *Development*. 2009. V. 136. № 17. P. 2903–2911.
- Zartman J.J., Yakoby N., Bristow C.A. et al.* Cad74A is regulated by BR and is required for robust dorsal append-

age formation in *Drosophila* oogenesis // Dev. Biol. 2008. V. 322. № 2. P. 289–301.

Zhao D., Clyde D., Bownes M. Expression of *fringe* is down regulated by Gurken/Epidermal growth factor receptor signalling and is required for the morphogenesis of ova-

rian follicle cells // J. Cell Sci. 2000. V. 113. № 21. P. 3781–3794.

Zhao D., Woolner S., Bownes M. The Mirror transcription factor links signalling pathways in *Drosophila* oogenesis // Dev. Genes Evol. 2000. V. 210. № 8–9. P. 449–457.

Main Components of Gene Network Controlling Development of Dorsal Appendages of Egg Chorion in *Drosophila melanogaster*

E. S. Omelina and E. M. Baricheva

Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, 630090
e-mail: omelina@bionet.nsc.ru

Abstract—The development of dorsal appendages of the chorion (specialized structures in the *D. melanogaster* egg which look like elastic tubes and ensure the breathing of the developing embryo) is an attractive model for the study of genetic mechanisms of the development of organs and tissues, whose generation is based on transformation of the epithelial tissue in the tubular structures. In the present review, we present information on genes and proteins that control the development of dorsal appendages of the chorion. We demonstrated that three signal pathways (EGFR, DPP, and NOTCH), which are combined together in a single gene network through a number of components, play a major role in the development of dorsal appendages of the chorion.

МОРФОГЕНЕЗ ПРОКСИМАЛЬНЫХ ВЕТОЧНЫХ ЛИСТЬЕВ У МХОВ

© 2012 г. М. С. Игнатов¹, У. Н. Спирина²

¹ Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН,

127276 Москва, Ботаническая ул., д. 4

E-mail: misha_ignatov@list.ru

² Тверской государственный университет, Биологический факультет

170100 Тверь, ул. Желябова, д. 33

Поступила в редакцию 27.10.11 г.

Окончательный вариант получен 11.01.12 г.

Рассмотрены случаи образования глубоко рассеченных и составных листьев в основании веточек у мхов, определена их гомология в разных группах и возможные причины их формирования. Ранее данные структуры трактовались разными авторами неоднозначно, в большинстве случаев для их описания использовался термин псевдопарафиллии, который, как показано, применялся и к целым листьям, и к отдельным их частям. Среди типов строения, уклоняющихся от основного, особое положение занимает *Hampella*-вариант, при котором образование глубоко рассеченных и составных листьев связано с задержкой развития веточек; семейства для которых он характерен, занимают базальное положение в филогенетическом дереве бокоплодных мхов. *Leucodon*-вариант не является специфическим для какой-либо филогенетически очерченной группы; он возникал в разных семействах, в которых разрывы листьев на доли можно объяснить более сильным растяжением стебля. *Hypnum*-вариант также не связан с отдельными филогенетическими линиями, но является примером более глубоко зашедшей специализации.

Ключевые слова: бокоплодные мхи, развитие веточек, развитие листьев, филогения.

ВВЕДЕНИЕ

Мхи, или листостебельные мхи, насчитывают в современной флоре около 10 тысяч видов и при этом все они, за исключением одного рода *Takakia*, имеют, как всегда считалось, только цельные простые листья. *Takakia*, имеющая лист рассеченный почти до основания на 4 линейные доли, представляет собой базальную ветвь эволюции мхов; ранее ее относили к печеночникам или выделяли в отдельный отдел, что делают и некоторые современные авторы (Филин, 2009); в данной статье она рассматриваться не будет. Таким образом, в отличие от листостебельных печеночников, второй большой группы высших растений с преобладанием в жизненном цикле гаметофита, характеризующейся огромным разнообразием форм листьев, считается, что у мхов наблюдается необычайное единообразие их строения.

Непосредственно предметом настоящей работы являются листовидные образования в основании веточек бокоплодных мхов, обычно именуемые псевдопарафиллиями. Эта морфологическая структура получала разные трактовки у разных авторов и определение ее гомологии до сих пор не имеет общепризнанного решения. Термин “псевдопарафиллии” был предложен Варнсторфом (Warnstorf, 1906) для листовидных структур во-

круг зачатка веточки у *Rhynchostegium* (Brachytheciaceae). Однако согласно первому крупному обзору строения псевдопарафиллиев на большой выборке семейств мхов (Ireland, 1971) все семейство Brachytheciaceae не имеет псевдопарафиллиев; структуры же так именовавшиеся были интерпретированы как первые веточные, или “чешуевидные листья”. Последующая классификация, предложенная Акиямой (Akiyama, 1990) описывала отдельные типы строения в терминах происхождения: из тканей веточки или из эпидермиса стебля. Данная точка зрения была подвергнута критике Игнатовым и Хеденэсом (Ignatov, Hedenäs, 2007), поскольку зачаток веточки и поверхность стебля, в сущности, имеют общее происхождение, что было показано еще Лейтгебом (Leitgeb, 1868) и Мюллером (Müller, 1898) и существенно конкретизировано Фреем (Frey, 1971) и Бертье (Berthier, 1971). Учитывая важность, в последнее время все возрастающую, признаков данных структур для целей макросистематики (см., напр., Ignatov et al., 2007), Игнатов и Хеденэс предложили вообще отказаться от термина псевдопарафиллий, а описывать строение листовидных структур в основании веточки с максимальной подробностью. Понимание гомологии данных структур, тем не менее, раскрыто

не было, и терминология для такого описания оказалась неразработанной.

В наших предыдущих работах были проанализированы четыре случая, уклоняющихся от наиболее распространенных типов развития (Spigina, Ignatov, 2005, 2008, 2010, 2011). Здесь мы постарались суммировать эти результаты, обсудить гомологию наблюдаемых структур и их зачатков, а также дать их обзор, включив дополнительные данные, полученные на большой выборке родов бокоплодных мхов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из-за мелких размеров и весьма сильно внешне отличающихся картин строения зачатков веточек мхов, они до последнего времени остаются весьма плохо описанными. Усугубляет дело также их расположение на боковых поверхностях стебля, который, как правило, несколько уплощен в дорзовентральном направлении и не позволяет при стандартном изготовлении препарата увидеть почку сверху. Поэтому изучение проводилось с помощью комбинированного применения СЭМ и световой микроскопии (список изученных родов в подписи к рис. 3). Для нескольких ключевых объектов (роды *Amblystegium*, *Brachythecium*, *Calliergon*, *Fontinalis*, *Hypnum*, *Leucodon*, *Thamnobryum*) изучение проводилось на сериях анатомических срезов.

Для СЭМ (LEO-430) применяли два способа подготовки материала. В первом случае сырой материал помещали непосредственно на замораживающий Пельте-стол и изучали при -30°C при низком вакууме. Во втором случае побеги фиксировали в 4%-м глютаральдегиде в течение недели, затем выдерживали в 1%-м водном растворе OsO_4 в течение 6 часов, далее промывали водой и дегидрировали в сериях спиртов и ацетона. Высушивали методом критической точки и напыляли золотом. Для зачатков веточек описывали внешний вид, отмечали положение относительно уровня поверхности материнского стебля, наличие периода покоя, присутствие проксимальных веточных листьев, их расположение, форму, переход к нормальным веточным листьям.

Для анатомических срезов размоченные в воде верхние части побегов с удаленными листьями фиксировали в 2.5%-м глютаральдегиде в течение недели. Затем материал помещали в 1%-й водный раствор OsO_4 на 10 часов, далее промывали, дегидрировали в серии спиртов (30° и 50°) и выдерживали в 2%-м растворе уранилацетата на 70° спирте в течение 10 часов. Материал промывали и проводили через спирты (96° и абсолютный), смесь спирта и ацетона, чистый ацетон и смеси ацетона и аралдитовой смолы. Затем заливали в аралдитовую смолу согласно протоколу произво-

дителя и полимеризовали при $+100^{\circ}\text{C}$ в течение 3-х часов. С помощью микротомы получали серии продольных, поперечных и косых срезов толщиной 2 μm , которые размещали на предметных стеклах и фотографировали под световым микроскопом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основной тип строения зачатка веточки. Изученные варианты развития боковых веточек в разных группах бокоплодных мхов показали, что ранние стадии формирования зачатка следуют одному общему плану (рис. 1А), описанному для ряда групп мхов Бертье (Berthier, 1971). Инициальная клетка веточки отделяется от одной из половин основания формирующегося листа и в результате трех делений под углом около 120° становится зачатком веточки, с апикальной клеткой, окруженной тремя мерофитами. Отличия наблюдаются только в направленности спирали, которая может быть как левой (чаще), так и правой. Во всех родах, исследованных на сериях анатомических срезов, первые деления инициальной клетки веточки проходили единообразно (рис. 2: 7).

В большинстве изученных родов, а именно в 90 из 128 (см. ниже), наиболее наружный веточный лист находится в положении “4 часа” циферблата, а второй – в положении “11 часов” (рис. 1: 1; 2: 1). Отметим сразу, что на побегах одного и того же вида листья веточки могут располагаться по левозакрученной или правозакрученной спирали, что выражается в существовании двух зеркально симметричных вариантов, оба из которых, однако, будут именоваться здесь “4–11 часов” (хотя второй фактически выглядит как “8–1 час”). Учитывая, что “4-часовое” положение соответствует направлению первого деления инициальной клетки веточки, мы будем называть данный вариант основным, а основным положением первого листа считать “4-часовое” (рис. 1: 1А). Изучение анатомии отдельных представителей показывает правомерность экстраполяции, при которой лист в “4-часовом” положении” можно считать морфологически первым. Второй лист формируется из клетки, изначально расположенной по отношению к клетке, дающей первый лист, под углом около 120° (рис. 1: 1В). Однако уже в процессе раннего развития и растяжения зачатка веточки, зачаток второго листа смещается и обычно оказывается отстоящим на больший угол (часто превышающий 180°) от первого, и в итоге находится в положении “11 часов” (рис. 1: 1С), хотя можно подобрать примеры и “8”, “9” и “10 часов”.

***Brachythecium*-тип строения зачатка веточки.** Кроме основного типа, описанного выше, среди бокоплодных мхов встречаются группы, у которых первые нормально развитые, т.е. наиболее

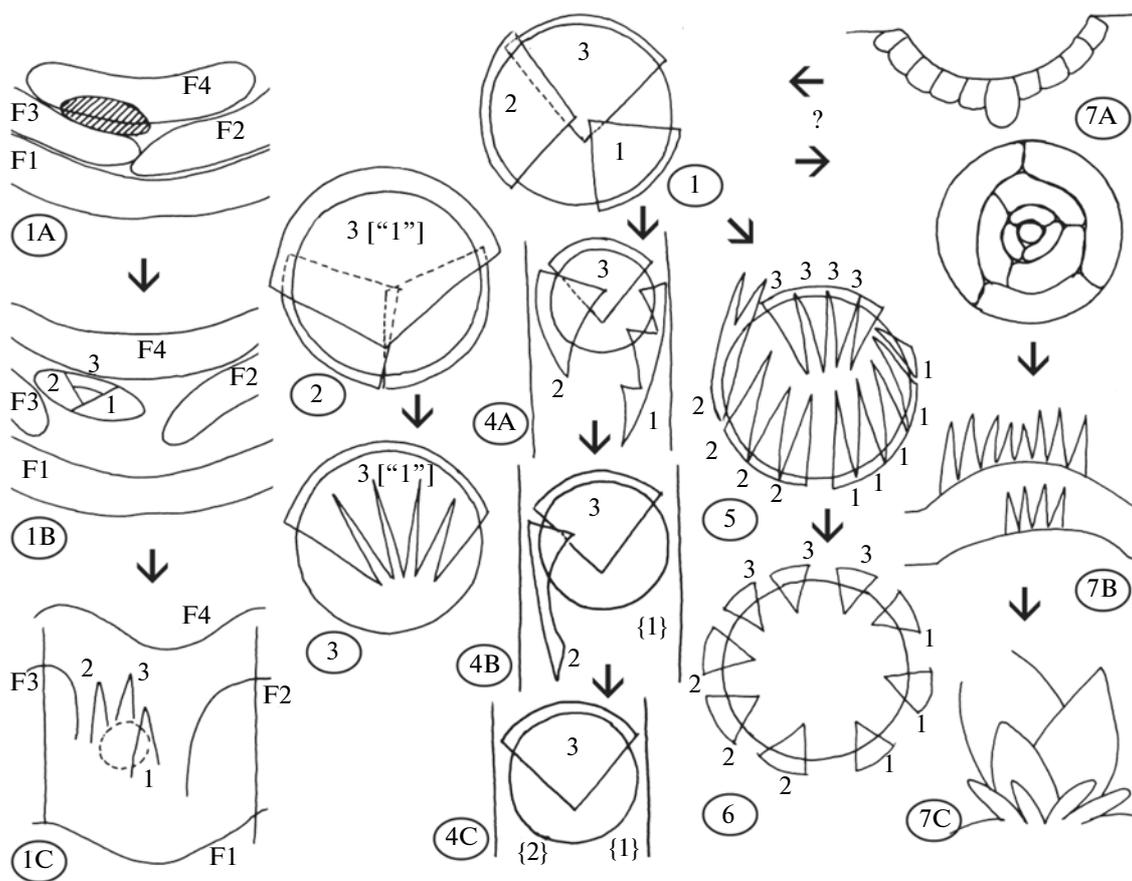
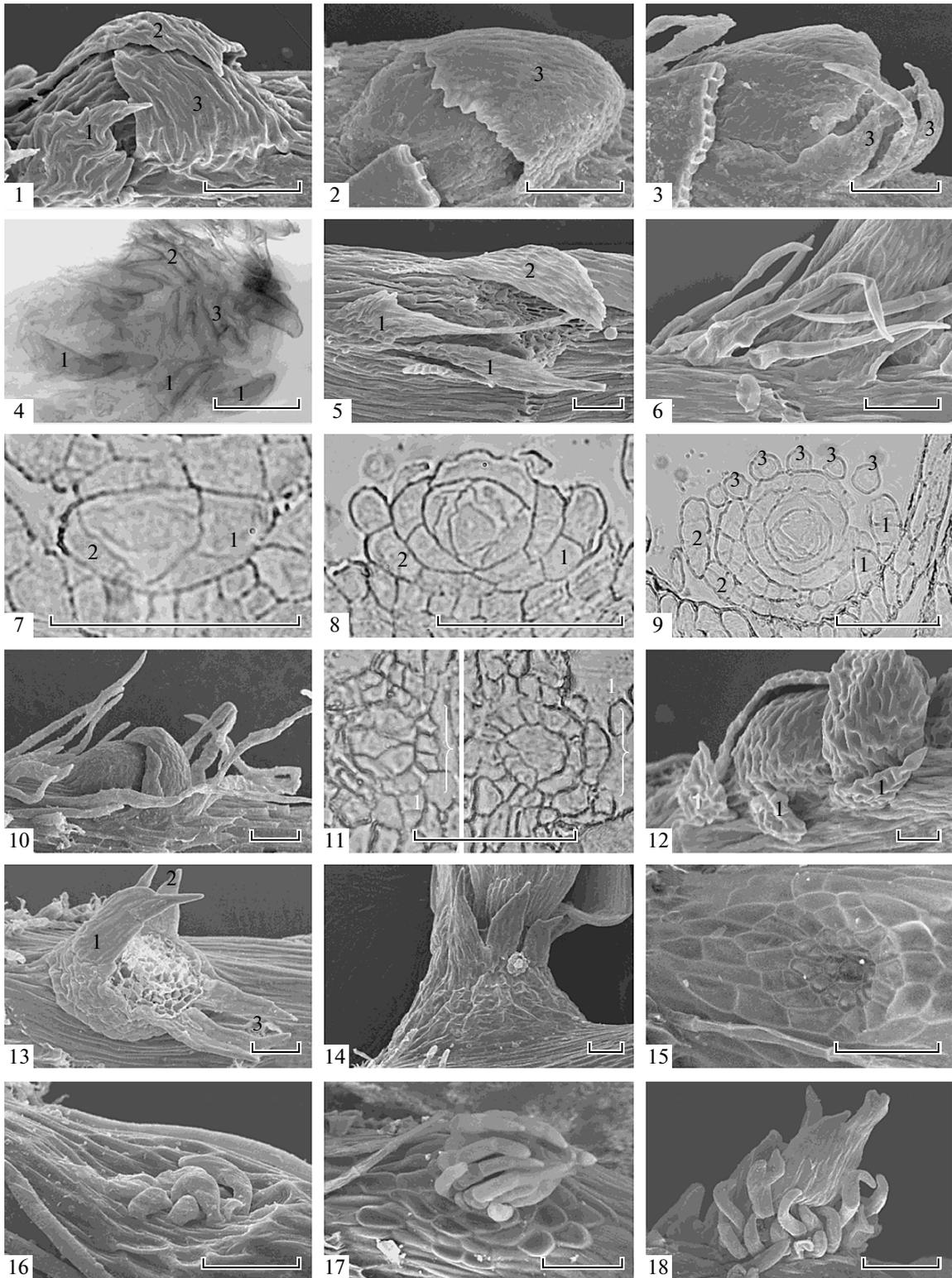


Рис. 1. Схема наиболее распространенных типов зачатков веточек и вариантов преобразования первых веточных листьев. 1 – основной тип развития веточки; 1А–1С – этапы развития (F1–F4 – порядковый номер стеблевых листьев); 2 – *Brachytheciaceae* (*Brachythecium*-тип с цельными листьями); 3 – *Leucodontaceae* (*Brachythecium*-тип с рассеченным 3 листом); 4 – *Fontinalaceae* (этапы редукции от основного к *Brachythecium*-типу; редуцируемые листья часто составные); 5 – *Hypnum cupressiforme* (*Hypnum*-вариант рассечения первых веточных листьев); 6 – *Thamnobryum* (*Hypnum*-вариант рассечения первых веточных листьев до уровня составных листьев); 7 – *Bryum*-тип развития веточки с *Hampeella*-вариантом первых веточных листьев: 7А – фронтальный вид зачатка и его вид на продольном срезе; 7В – начальные стадии выхода зачатка веточки из покоящегося состояния (разные варианты); 7С – последующая стадия, с началом развития широких веточных листьев (ср. рис. 2: 18).

наружные веточные листья располагаются в положении отличным от основного, “4-часового” (рис. 1: 1). Так у представителей *Brachytheciaceae*, *Meteoriaceae*, *Leucodontaceae*, а также у рода *Camptochaete* (*Lembophyllaceae*) (рис. 1: 2; 2: 2) наиболее наружный веточный лист обращен верхушкой вниз. Несмотря на то, что первые деления инициальной клетки идут в том же направлении, что и у большинства видов, на листовых пластинках зачатки 1 и 2 веточных листьев не развивают (см. подробнее Spirina, Ignatov, 2005, 2010). Сходное положение наиболее наружного листа встречается также и в семействе *Fontinalaceae* (рис. 1: 4) однако в отличие от *Brachytheciaceae* и *Leucodontaceae*, где положение наиболее наружного листа строго определено и почти не имеет исключений,

у *Fontinalaceae* этот признак варьирует не только у разных видов, но иногда даже в пределах одного растения (Spirina, Ignatov, 2011). Чаще всего наиболее наружный лист находится в положении “10–11 часов” (соответствуя, таким образом, морфологически второму веточному листу), реже “12 часов” или “4 часа” (соответствуя третьему и первому). При этом редукция первого и, реже, второго веточного листа наблюдается на стеблях хорошо развитых быстрорастущих растений с далеко расставленными листьями. Спирина и Игнатов (Spirina, Ignatov, 2011) выявили, что меньшая степень редукции наблюдается: (1) у видов с более густым листорасположением, т.е. тех, у которых стебель претерпевает меньшее растяжение; (2) близ концов веточек, где рост их замедляется;



(3) в местах более частого ветвления, где растяжение стебля не столь сильное; (4) у образцов, собранных летом, когда рост значительно замедляется и при температуре $+20^{\circ}\text{C}$ практически прекращается, в то время как при $+13...+15^{\circ}\text{C}$ он максимален (Glime, 1987).

***Bryum*-тип строения зачатка веточки.** У большинства верхоплодных и относительно немногих групп бокоплодных мхов редукция первых веточных листьев идет по другому типу развития, названному *Bryum*-типом Акиямой (Akiyama, 1990), связанному с альтернативным способом защиты

Рис. 2. Зачатки веточек бокоплодных мхов. 1 — *Campylium stellatum* (Hedw.) Mönk., основной тип зачатка веточки с расположением первых проксимальных веточных листьев в положении “4–11 часов” (ср. рис. 1: 1); 2–3 — *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr., зачаток веточки; первый проксимальный лист обращен верхушкой книзу и может быть цельным (2) или раздельным на б.м. узкие доли (3); 4 — *Fontinalis neomexicana* Sull. & Lesq. зачаток веточки с составным первым веточным листом (ср. рис. 4A); *Brachelyma subulatum* (P. Beauv.) Cardot — зачаток веточки с рассеченным до основания первым веточным листом; 6–9 — *Hypnum cupressiforme* Hedw.: зачаток веточки, окруженный нитевидными долями рассеченных почти до основания и составных листьев (6), и поперечные срезы растущей веточки (7–9); 10 — *Pterobryon densum* Hornsch., зачаток веточки, окруженный нитевидными долями составных листьев; 11–12 — *Thamnobryum alopecurum* (Hedw.) Nieuwl. ex Gangulee, поперечные срезы растущей веточки с еще единичными зачатками первых веточных листьев (11) и с составным первым веточным листом (12); 13–14 — *Trachyloma indicum* Mitt., проксимальная часть веточки, на которой видна безлистная зона; 15–18 — *Hampeella alaris* (Dixon & Sainsbury) Sainsbury, зачаток веточки в виде ямки с апикальной клеткой на дне (15) и последовательные срезы раннего развития веточки (16–18). Масштабные линейки 50 μm для всех рисунков. Верхушка побегов везде справа, кроме срезов 7–9, 11, где она сверху. Цифры указывают на порядковый номер листа (ср. рис. 1).

апикальной клетки. Последняя располагается при этом не на поверхности стебля или несколько выше ее, будучи окруженной защитными структурами листовой природы, а на дне ямки (рис. 2: 15). Примерами такого типа зачатков веточек могут служить *Hampeella* и *Trachyloma* (рис. 1: 7; 2: 13–18), а также семейство Plagiotheciaceae. Зачатки листьев, образующие склоны ямки, пластинку листа, как правило, не развивают вплоть до начала развития веточки.

Описание основного, *Brachythecium*- и *Bryum*-типа строения зачатка веточки дано здесь, поскольку варианты развития рассеченных и составных листьев так или иначе базируются на этих трех наиболее распространенных типах.

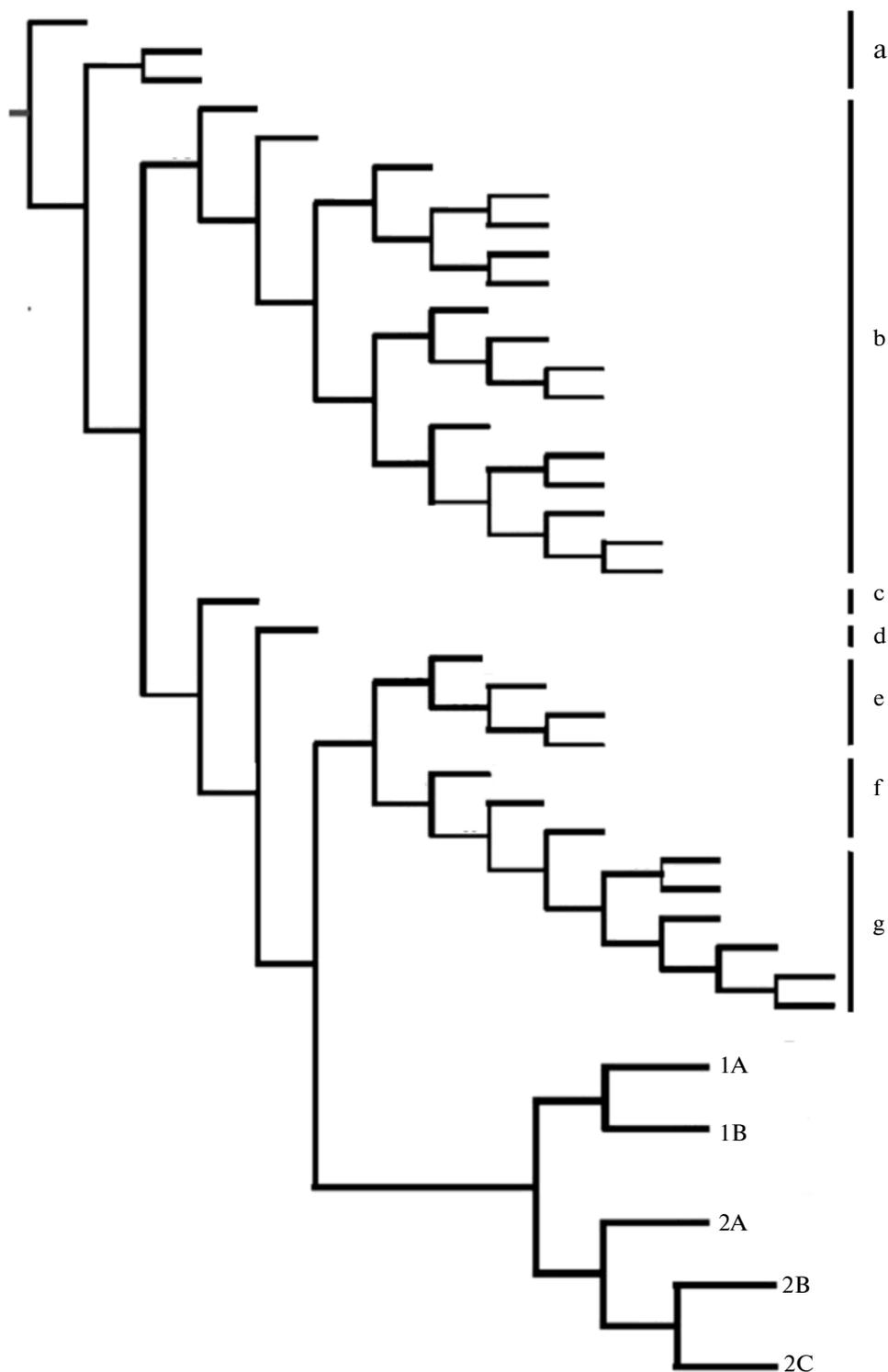
Leucodon-вариант развития раздельных, рассеченных и составных проксимальных веточных листьев. У представителей Leucodontaceae, Fontinalaceae, Lemborphyllaceae в ряде случаев наблюдаются проксимальные веточные листья, разделенные на доли (рис. 1: 3; 2: 3). Глубина такого разделения, а также ширина и форма долей могут варьировать. Иногда эти листья рассечены почти до самого основания листа, хотя и в таких случаях всегда очевидно, что доли принадлежат одному исходному листу. В случае *Leucodon* разделенным оказывается наиболее наружный лист, занимающий положение “12 часов” (и, таким образом, являющийся морфологически третьим). Вблизи верхушки нормально развитых побегов крупных видов рода, таких как *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr., *L. immersus* Lindb. и *L. corensis* Cardot, а также на столонovidных и истонченных побегах, этот лист цельный, но на участках стебля с максимальным диаметром, наиболее наружный веточный лист разделен на доли (рис. 2: 3), число и ширина которых неодинаковы даже в пределах побега. Для указанных трех видов, имеющих сходные размеры, диаметр стебля, превышение которого сопровождалось постоянным наличием раздельных или рассеченных листьев составлял 350 μm, на более тонких побегах листья всегда были цельными. У видов Leucodontaceae со всегда тонкими побегами (диаметром менее 320 μm), например *Leucodon pendulus* Lindb. и *Pterogoniadelphus mon-*

tevidensis (Müll. Hal.) M. Fleisch., разорванных наиболее наружных листьев не наблюдалось никогда.

Рассеченный первый лист встречается также в семействе Fontinalaceae в родах *Brachelyma* и *Fontinalis* (рис. 2: 4–5), причем в последнем он представлен в случаях, занимающих промежуточное положение между полной редукцией первого листа и его нормальным развитием. При этом лист может быть разделен на доли в разной степени, вплоть до основания и в ряде случаев выглядеть как несколько отдельных листьев, расположенных в ряд на стебле; подробнее о таких составных листьях будет сказано ниже, при рассмотрении *Hypnum*-варианта. Про связь наличия рассеченного проксимального веточного листа с факторами растяжения стебля у *Fontinalis* можно сказать то же самое, что и про связь с редукцией его первого веточного листа, обсуждавшуюся выше.

Кроме того, рассеченный или раздельный первый лист как редкий случай встречается в пределах групп, обладающих преимущественно цельными проксимальными листьями (например, у *Amblystegium*, *Warnstorfia*, *Stereodon* и др.).

Hypnum-вариант развития рассеченных и составных проксимальных веточных листьев. Этот вариант включает зачатки веточек, окруженные листовидными структурами в числе, превышающем три (рис. 1: 5–6; рис. 2: 6, 10). Однако и в этом случае первые деления инициальной клетки веточки не отличаются от общего плана (рис. 2: 7–8). Формирование же узколинейных структур происходит на более поздних стадиях развития (рис. 2: 9). Таким образом, на примере *Hypnum cupressiforme* Hedw. (рис. 2: 6–9), *Pterobryon densum* Hornsch. (рис. 2: 10) и др. мы имеем вариант разделения листа на отдельные сегменты в процессе его развития. Формирующиеся таким образом листья могут быть как рассеченными почти до основания, так и состоящими как бы из нескольких листьев, связь которых между собой не очевидна. Тот факт, что они являются потомками одной клетки, может быть установлен как путем анализа серий срезов, так и их положением в ряд, причем



именно в том положении, где у близких видов обычно располагается один из наиболее проксимальных веточных листьев. Подобные листья, формирующиеся на основе единого зачатка, но образованные в развитом состоянии двумя или более пластинками, не имеющими связи на уров-

не поверхности стебля у мхов, мы предлагаем называть составными.

Примером, когда части составного листа наиболее удалены друг от друга и смещены так, что их положение в одном круге не очевидно является *Thamnobryum* (рис. 2: 12), широко треугольные ча-

Рис. 3. Схематическое изображение филогенетического дерева 218 бокоплодных мхов (Троицкий и др., 2007), построенного на основе анализа нуклеотидных последовательностей *rplTS* и *trnL-F*. Включенные в анализ представители 128 родов перечислены ниже, с указанием типа строения проксимальных листьев веточек (роды представляют 46 семейств, названия которых, во избежание громоздкости, не приводятся). Роды, имеющие *Bryum*-тип строения, даны полужирным курсивом, из них – имеющие *Hampeella* – вариант рассечения веточных листьев отмечены звездочкой (*); роды, имеющие *Brachythecium*-тип строения, даны подчеркнутым курсивом, из них – имеющие *Leucodon*-вариант рассечения веточных листьев отмечены звездочкой (*); роды, имеющие основной тип строения, даны простым курсивом, из них – имеющие *Hypnum*-вариант рассечения веточных листьев отмечены звездочкой (*). Порядок расположения названий родов и их подразделение на отдельные клады (обозначены буквами и цифрами) соответствует таковому в дереве.

a – *Hookeria*, *Lopidium**, *Ancistrodes** [*Hampeella**, не включенная в анализ Троицкого и др. (2007), также принадлежит этой части дерева (Buck et al., 2005)]

b – *Isopterygiopsis**, *Orthothecium*, *Platydictya**, *Herzogiella*, *Struckia*, *Myurella**, *Plagiothecium**, *Fabronia**, *Entodontopsis**, *Stereophyllum**, *Lepyrodon**

c – *Habrodon**

d – *Leucodon**

e – *Pterigynandrum**, *Hypnum** (часть видов), *Hypnum* (часть видов), *Eurohypnum*

f – *Phyllogonium*, *Prionodon*, *Pirella**

g – *Brachelyma**, *Dichelyma**, *Fontinalis**

1A – *Rauvella*, *Thuidium*, *Leskea*, *Haplocladium*, *Abietinella*, *Helodium*, *Pseudoleskeopsis*, *Lindbergia*, *Mamillariella*, *Breidleria*, *Stereodon p.p.*, *Pseudocalliergon*, *Drepanocladus*, *Amblystegium*, *Hygroamblystegium*, *Palustriella*, *Cratoneuron*, *Campylidium*, *Hygrohypnum*, *Anacamptodon*, *Serpoleskea*, *Campylium*, *Leptodictyum*

1B – *Rhytidium*, *Pseudoleskeella*, *Ptilium*, *Cryphaea**, *Podperaea**, *Myrinia*, *Ochyraea*, *Tomentypnum*, *Drepanium**, *Campylophyllum**, *Pseudohygrohypnum*, *Stereodon p.p.*, *Homomallium*, *Pylaisia*, *Ectropothecium*, *Pleurozium*, *Entodon*, *Erythrodonium*, *Trachyloma*, *Calliergonella*, *Platygyrium**, *Sematophyllum**, *Gollania*, *Hildenbrandtiella**

2A – *Pterogonium*, *Dolichomitra*, *Lembophyllum*, *Rigodium*, *Heterocladium*, *Isothecium*, *Fallaciella*, *Dolichomitriopsis*, *Platyhypnidium*, *Okamuraea*, *Homalothecium*, *Brachythecium*, *Bryhnia*, *Campiochaete**, *Ctenidium*, *Trachypus*, *Barbella*, *Floribundaria*

2B – *Calliergon*, *Warnstorfia*, *Straminergon*, *Loeskyrium*, *Iwatsukiella*, *Hamatocaulis*, *Scorpidium*, *Hygrohypnella*, *Sanionia*

2C – *Anomodon*, *Claopodium*, *Chaetomitrium*, *Conardia*, *Rigodiadelphus*, *Lescuraea*, *Neodolichomitra*, *Climacium*, *Pleuroziopsis*, *Hylocomiastrum*, *Antitrichia*, *Loeskeobryum*, *Rhytidadelphus*, *Rhytidiastrum*, *Pilotrichella*, *Rhytidiopsis*, *Thelia*, *Haplohymenium*, *Carribaehypnum*, *Mittenothamnium*, *Glossadelphus*, *Taxiphyllum*, *Leptopterigynandrum*, *Neckera*, *Forsstroemia*, *Leptodon*, *Heterocladium**, *Echinodium*, *Porotrichodendron*, *Thamnobryum**

сти составного листа которого выглядят расположенными скорее по спирали, и только изучение серий срезов через зачаток веточки позволяет понять их природу (рис. 1: 6; 2: 11), которая в целом была установлена уже Бертье (Berthier, 1971).

***Hampeella*-вариант развития рассеченных и составных проксимальных веточных листьев.** Наличие узко линейных листовидных структур в основании веточек, кроме вышеописанного *Hypnum*-варианта, обычно встречается у видов, имеющих *Bryum*-тип строения зачатка веточки (рис. 1: 7; 2: 15), который на ранних стадиях развития вообще не окружен какими-либо листовидными образованиями. Листья начинают развивать пластинку синхронно с “выворачиванием” ямки, что вполне понятно, так как в глубине ямки начать развиваться они не могут из-за отсутствия места, а поднявшись над уровнем стебля апикальная клетка нуждается в защите окружающими листьями.

Группы, для которых характерен этот способ защиты апикальной клетки зачатка, имеют в основании развитых веточек участок стебля, полностью лишенный листьев (рис. 2: 13–14). Как правило, наиболее проксимальные веточные листья у таких видов очень узкие (рис. 2: 18), хотя это не является общим правилом (рис. 2: 13–14). Линейные листья, формирующиеся в основании веточек, при таком типе развития могут быть цельны-

ми (лист 1 на рис. 2: 13), рассеченными или составными (листья 2–3 на рис. 2: 13 и рис. 2: 14, 16–18). В многочисленных шиловидных структурах, окружающих апикальную клетку, можно усмотреть типичный для мхов филлотаксис (120°–144° между соседними листьями), если допустить, что несколько соседних шиловидных структур являются частями одного составного листа (рис. 2: 16–18).

ОБСУЖДЕНИЕ

Разнообразие вариантов строения зачатков веточек являлось предметом обсуждения не раз, но Бертье (Berthier, 1971) рассматривал лишь немногие модельные объекты с разной степенью детальности, а другие работы (Ignatov, 1999; Ignatov, Hedenäs, 2007) использовали для изучения лишь внешнее строение зачатков веточек, без привлечения результатов изучения серий анатомических срезов. Дополнительные данные Спириной и Игнатова (Spirina, Ignatov, 2005, 2008, 2010, 2011) позволили разобрать вопрос более полно. В отношении рассеченных и составных проксимальных листьев в настоящее время можно сказать следующее.

***Leucodon*-вариант.** Проксимальные листья веточек не так уж редко оказываются раздельными

или рассеченными, в большинстве случаев без какой-либо регулярности, так что их правомерно было бы назвать также надорванными или разорванными. Стабильно этот признак выдерживается лишь у немногих видов, причем в ряде случаев наличие корреляций разрывов листьев с толщиной стебля (*Leucodontaceae*) или степенью растяжения “междоузлий” (*Fontinalaceae*) позволяет связать эти разрывы с механическим воздействием. Надо сказать, что разрывы и нерегулярная форма первых веточных листьев встречаются у многих видов бокоплодных мхов и не раз таким признакам приписывалось таксономическая значимость, но в силу значительной вариабельности и неопределенности описания они не получили широкого распространения. Тем не менее, для целей сопоставимости морфологических описаний понимание факта возможного разделения листа, который закладывается как единый, на отдельные сегменты необходимо. Интересно, что данный тип получает наибольшее выражение в группах, у которых морфологически 1–2 первых веточных листьев редуцированы.

Нурит-вариант, представленный, в частности, у *Hypnum cupressiforme* был подробно проанализирован (Spirina, Ignatov, 2008). Узколанцетные или шиловидные структуры, обычно именовавшиеся псевдопарафиллиями, хорошо известны у этого вида и имеют важное диагностическое значение. На сериях анатомических срезов, однако, легко видеть, что первые деления инициальной клетки веточки не отличаются от таковых, характерных для всех бокоплодных мхов. Далее в процессе формирования зачатка веточки уже на самых ранних стадиях листья разделяются на отдельные сегменты (рис. 2: 7–9). С одной стороны, связать данные разрывы можно с необычно резким увеличением объема апикальной клетки веточки на расстоянии 20–30 μm от верхушки апикальной клетки стебля. Начало роста листовых зачатков совпадает с резким растяжением по ширине этих зачатков, что можно рассматривать как один из факторов того, что первые 2–5 проксимальных листа веточки оказываются фактически составными листьями, разделенным до основания на линейные сегменты.

Вместе с тем, в отличие от *Leucodon*-варианта, даже на сильно истонченных побегах *Hypnum cupressiforme* первые веточные листья продолжают оставаться глубоко рассеченными, так что в этом случае данный признак закреплен в онтогенезе.

Неравномерное растяжение поверхностных тканей стебля вокруг зачатка веточки делает картину, которая получается во взрослом состоянии, трудно интерпретируемой, не позволяя в большинстве случаев определить, какая из линейных структур какому листу принадлежит, что затрудняло их интерпретацию столь длительное время.

Hampeella-вариант. Отмечен для *Hookeriaceae*, *Plagiotheciaceae*, *Ptychomniaceae*, *Trachylomataceae*. Апикальная клетка при таком типе организации зачатков веточек находится на дне ямки, располагающейся в пазухе листа (рис. 2: 15). Характерной особенностью мхов, имеющих этот тип, является отсутствие правильно перистого ветвления в непосредственной близости к верхушке побега — веточки начинают развиваться довольно далеко от верхушки, в той части стебля, где обычно имеются развитые гаметангии. В этом отношении интересна параллель с верхоплодными мхами (предковыми по отношению к бокоплодным мхам), у которых ветвление имеет “подверхушечный” характер, когда развитие получают лишь те зачатки, которые находятся непосредственно по соседству с органами полового размножения. Пребывание зачатка веточки продолжительное время в покоящемся состоянии является неотъемлемой чертой данного типа ветвления. При этом растения сталкиваются с проблемой выхода из такого состояния — ямка должна вывернуться, а проксимальные веточные листья должны появиться до или, по крайней мере, вскоре после “выворачивания” ее из заглубленного состояния и подъема над уровнем поверхности стебля. По видимому, этот процесс происходит весьма быстро; по крайней мере, у некоторых родов, например *Plagiothecium*, стадию “выворачивания” наблюдать удавалось лишь в крайне редких случаях. У других родов данный процесс поддается реконструкции по сериям наблюдаемых стадий. Интересной особенностью данного типа развития является образование безлистной проксимальной части веточки. Классическая схема развития мхов подразумевает, что каждый мерофит, отделившийся от постоянно делящейся апикальной клетки, дифференцируется, производя: (1) клетки внутренней части стебля; (2) клетки листа и располагающийся ниже его поверхности стебля. Клетки же основания веточки *Bryum*-типа оказываются “вывернутыми наружу” склонами воронки и выглядят безлистыми. Бертье (Berthier, 1971) на примере *Hookeria* показал, что склоны воронки гомологичны 2–3 кругам листьев, развитие пластинок у которых задерживается или и вовсе не происходит. В некоторых случаях совершенно очевидно, что листья, соответствующие периферической части ямки и самой нижней части веточки полностью не развиваются (рис. 2: 17). В других случаях, например у *Trachyloma* (рис. 2: 13–14), можно допустить иную интерпретацию безлистного основания веточки как разросшихся оснований листьев, тем более, что подобный случай известен у *Fontinalis* (Spirina, Ignatov, 2011). Тот факт, что безлистное основание веточки можно считать сформированным основаниями именно морфологически первых веточных листьев подтверждается, в частности, их правильным филлотаксисом (рис. 2: 13).

В большинстве случаев, данный тип развития, с заглуплением апикальной клетки и задержкой ее развития сопровождается образованием очень узких, рассеченных почти до основания первых веточных листьев, поскольку им требуется уместиться вокруг небольшой апикальной клетки на дне воронки и затем принять более расставленное положение. Последнее оказывается необходимым, поскольку апикальная зона веточки по мере ее развития резко утолщается, что можно видеть из того, что веточные листья становятся значительно более широкими вскоре после развития веточки (рис. 2: 18). При этом первые развитые веточные листья резко контрастируют по форме и рассеченности с последующими (рис. 2: 18), что давало дополнительные основания выделять узкие листовидные образования веточек в особую структуру, называемую псевдопарафиллиями, что по нашему мнению, не оправдано.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

При такой интерпретации основных типов развития проксимальных веточных листьев и вариантов формирования рассеченных и составных листьев обнаруживается их известная связь с филогенией бокоплодных мхов. Для данного анализа было взято филогенетическое дерево бокоплодных мхов из работы Троицкого и др. (2007), включающее 218 видов из 128 родов, 46 семейств. Изученные роды, а также строение и расположение у них первых веточных листьев дано в объяснении к рис. 3.

Кратко суммировать распределение типов зачатков веточек и вариантов преобразования первых веточных листьев можно следующим образом:

1) Редукция 1–2 наиболее проксимальных веточных листьев обычно характеризует большие группы, такие как семейства *Brachytheciaceae* и *Meteoriaceae*, родственные между собой, не связанные с ними родством *Leucodontaceae* (Spirina, Ignatov, 2010), и отдельные роды *Lembophyllaceae* (*Camptochaete*). В то же время, есть группы, в которых разный уровень редукции можно наблюдать у близких видов и даже в пределах побегов одного растения (*Fontinalaceae*).

Следует отметить, что за исключением последнего семейства, включающего только водные виды, подавляющее большинство *Leucodontaceae*, *Meteoriaceae*, *Lembophyllaceae* – типичные эпифиты, растущие на стволах деревьев и кустарников в тропических и субтропических районах, часто сталкивающиеся с дефицитом влаги. Большинство видов *Brachytheciaceae* наземные, но растущие преимущественно в сухих местообитаниях. Редукция двух первых веточных листьев у них приводит к образованию над зачатком веточки “верхнего капюшона”, вероятно, имеющего

большую эффективность с точки зрения защиты зачатка веточки.

2) Составные проксимальные листья веточек возникали во многих группах бокоплодных мхов (см. подпись к рис. 3). Адаптивный или конструктивный смысл их большей частью не поддается интерпретации, однако очевидная связь с активным растяжением свидетельствует, скорее в пользу того, что выдержать правильную форму первого листа мхам и конструктивно сложно, и не слишком необходимо: эта часть зачатка веточки защищена и листом, в пазухе которого находится почка. Таким образом, рассеченные и составные листья *Leucodon*-варианта нельзя считать надежными маркерами эволюционных линий. По-видимому, это можно отнести и к *Hypnum*-варианту, в котором один из представителей, *Hypnum cypressiforme*, являет пример очень типичного составного листа, тогда как другие виды (*H. saitoi* Ando, *H. fujiyamae* (Broth.) Paris, *H. imponens* Hedw. и др.) имеют простые проксимальные или лишь умеренно отдельные листья веточек.

3) Роды, характеризующиеся *Bryum*-типом строения зачатков веточек, которые развиваются с задержкой и имеют, по-видимому, неопределенную часть листьев не получающих развития, имеют на филогенетическом дереве наиболее интересное положение – большинство из них являются базальными. Базальная града, включающая представителей *Ptychomniaceae*, *Hookeriaceae*, *Plagiobothriaceae*, *Fabroniaceae*, *Stereophyllaceae*, *Plerogodontaceae* и *Nabrodontaceae* образована преимущественно с *Hampeella*-вариантом строения. Выбываются из этого правила два рода, *Trachyloma* и *Sematophyllum*, которые согласно данным приводимого здесь филогенетического анализа находятся в кладе 1В. Не рассматривая вопрос в деталях, отметим, однако, что данное положение этих двух групп не всегда таково. В ряде филогенетических анализов они оказываются значительно ближе к представителям базальной грады, а иногда и просто в ее пределах. Данный общий тип строения можно считать исходным по отношению ко всем бокоплодным мхам, что еще раз демонстрирует важность призраков развития для уточнения филогенетических построений.

Авторы выражают благодарность А.В. Бабоше и А.С. Рябченко за помощь в работе на СЭМ. Работа отчасти поддержана РФФИ 10-04-00678.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Троицкий А.В., Игнатов М.С., Боброва В.К. и др. Вклад геносистематики в современное представление о филогении и системе моховидных // Биохимия. 2007. Т. 72. Вып. 12. С. 1690–1704.
- Филин В.Р. Надотдел мохообразные // Систематика высших растений. М.: ИЦ Академия, 2009. Т. 4. кн. 1. С. 38–167.

- Akiyama H.* A morphological study of branch development in mosses with special reference to pseudoparaphyllia // *Botanical Magazine (Tokyo)* 1990. 103. P. 269–282.
- Berthier J.* Recherches sur la structure et le développement de l'apex du game'tophyte feuillé des mousses // *Revue Bryologique et Liche'nologique*. 1971. V. 38. P. 421–551.
- Buck W.R., Cox C.J., Shaw A.J., Goffinet B.* Ordinal relationships of pleurocarpous mosses, with special emphasis on the Hookeriales // *Systematics and Biodiversity*. 2005. V. 2. P. 121–145.
- Frey W.* Blatentwicklung bei Laubmoosen // *Nova Hedwigia*. 1971. V. 20. P. 463–556.
- Glime J.M.* Growth model for *Fontinalis duriaei* based on temperature and flow condition // *J. Hattori Bot. Lab.* 1987. V. 62. P. 101–109.
- Ignatov M.S.* Bryophyte flora of the Huon Peninsula, Papua New Guinea. LXIII. On the pseudoparaphyllia in Brachytheciaceae and Meteoriaceae (Musci) // *Acta Botanica Fennica*. 1999. V. 165. P. 73–83.
- Ignatov M.S., Gardiner A.A., Bobrova V.K. et al.* On the relationships of mosses of the order Hypnales, with special reference to taxa traditionally classified in the Leskeaceae // *Pleurocarpous mosses: systematics and evolution*. Boca Raton—NY—London: CRC Press. 2007. P. 177–214.
- Ignatov M.S., Hedenäs L.* Homologies of stem structures in pleurocarpous mosses, especially of pseudoparaphyllia and similar structures // *Pleurocarpous mosses: systematics and evolution*. Boca Raton—NY—London: CRC Press, 2007. P. 269–286.
- Ireland R.R.* Moss pseudoparaphyllia // *Bryologist*. 1971. V. 74. P. 312–330.
- Leitgeb H.* Wachstum des Stammchens von *Fontinalis* // *Sitz. d. K. Ak. Wiss. Math. Natur.* 1868. V. 57(1). P. 308–342.
- Müller C. (Berol)* Musci (Laubmoose). Fortpflanzungsverhältnisse und Entwicklungsgeschichte // *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig: Verlag W. Engelmann. 1898. V. 1(3). P. 155–202.
- Spirina U.N., Ignatov M.S.* A comparison of early stages of branch development in *Brachythecium* and *Calliergon* (Bryophyta) // *Arctoa*. 2005. V. 14. P. 211–222.
- Spirina U.N., Ignatov M.S.* Branch development and pseudoparaphyllia of *Hypnum cupressiforme* (Hypnales, Musci) // *Arctoa*. 2008. V. 17. P. 139–160.
- Spirina U.N., Ignatov M.S.* On the branch development in *Leucodon* (Leucodontaceae, Bryophyta) // *Arctoa*. 2010. V. 19. P. 139–150.
- Spirina U.N., Ignatov M.S.* On the branch development in Fontinalaceae (Bryophyta) // *Arctoa*. 2011. V. 20. P. 119–136.
- Warnstorf C.* Kryptogamenflora der Mark Brandenburg und angrenzender Gebiete. Laubmoose, 2 Bd. Leipzig: Verlag von Gebrüder Borntraeger, 1906. 1160 s.

Morphogenesis of Proximal Branch Leaves in Mosses

M. S. Ignatov^a and U. N. Spirina^b

^a*Tsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences,
Botanicheskaya ul. 4, Moscow, 127276 Russia
e-mail: misha_ignatov@list.ru*

^b*Biological Faculty, Tver State University, ul. Zhelyabova 33, Tver, 170100 Russia*

Abstract—The formation of deeply dissected and compound leaves at the bases of branches, their homology between different groups of mosses, and probable factors responsible for their development are considered. Previous authors differ in the interpretation of such leaves and in most cases describe them as special morphological structures named pseudoparaphyllia. It is shown, however, that this term has been applied both to whole leaves and to separate leaf parts. Among the patterns of leaf formation deviating from the basic type, a special place belongs to the *Hampeella* variant, where deeply dissected and compound leaves are formed due to the delayed development of branch primordia. The families representing this variant occupy a basal position in the phylogenetic tree of pleurocarpous mosses. The *Leucodon* variant, where splitting of leaves into lobes is apparently explained by strong stem extension, is not specific for any definite phylogenetic group and manifests itself in different families. The *Hypnum* variant is also not associated with certain phylogenetic lineages, but it provides an example of more profound specialization.

Keywords: pleurocarpous mosses, branch development, leaf development, phylogeny.

УДК 591.465.12

СТИМУЛЯЦИЯ *in vitro* ОВУЛЯЦИИ ООЦИТОВ ОСЕТРОВЫХ РЫБ ПРОГЕСТЕРОНОМ И ГОМОЛОГИЧНЫМ ГОНАДОТРОПНЫМ ГОРМОНОМ ГИПОФИЗА

© 2012 г. М. Н. Скоблина, Б. Ф. Гончаров

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: skoblina38@mail.ru

Поступила в редакцию 04.03.11 г.

Окончательный вариант получен 20.05.11 г.

Показано, что процент ооцитов осетровых рыб, овулирующих *in vitro* в модифицированном для осетровых рыб растворе Рингера (РМО), существенно зависит от концентрации бикарбоната натрия и концентрации прогестерона. В оптимальных условиях (0.5 г/л бикарбоната натрия и 30 нг/мл прогестерона) он может быть выше 80. Созревшие и овулировавшие в таких условиях ооциты способны к нормальному развитию. В наилучшем случае около 70% развивающихся зародышей (от числа овулировавших ооцитов) достигают стадии вылупления (предельный срок наблюдения). Этот метод получения потомства, основанный на осеменении созревших и овулировавших *in vitro* ооцитов, может быть использован при работе с единичными самками редких и исчезающих видов осетровых рыб.

Ключевые слова: осетровые рыбы, созревание ооцитов, овуляция *in vitro*, среда культивирования, бикарбонат натрия, прогестерон, гонадотропный гормон гипофиза.

Созревание ооцитов амфибий и рыб под влиянием гормонов хорошо воспроизводится *in vitro* (Masui, Clarke, 1979; Goetz, 1983; Гончаров и др., 1997). Изучению механизмов процесса созревания посвящено немало работ (Nagahama, Yamashita, 2008; D’Inca et al., 2010; Pang, Thomas, 2010; Sadler et al., 2010). Гораздо труднее оказалось индуцировать *in vitro* овуляцию ооцитов (Wallace, Selman, 1978; Goetz, 1983; Pinter, Thomas, 1999; Patino et al., 2003), ее механизмы изучены значительно хуже, хотя и в этом отношении в последнее время достигнуты определенные успехи (Patino et al., 2003; Lister, Van Der Kraak, 2008; Sena, Liu, 2008; Bobe et al., 2009; Dhillon, Liu, 2010).

Изучение овуляции у осетровых рыб до недавнего времени было практически невозможно, так как исследователям либо вовсе не удавалось стимулировать этот процесс *in vitro* (Lutes, 1985), либо процент овулирующих ооцитов был очень низким, либо результат существенно варьировал от опыта к опыту. Изучение влияния состава среды культивирования овариальных фолликулов на овуляцию ооцитов севрюги показало, что одним из факторов, влияющих на результат гормональной стимуляции *in vitro*, является осмоляльность среды. Процент ооцитов севрюги, овулирующих *in vitro* под влиянием экстракта гипофизов осетровых рыб или прогестерона, увеличивался при

разведении среды культивирования (Goncharov et al., 2009). В качестве исходных сред в этой работе были использованы модифицированный для осетровых рыб раствор Рингера для холоднокровных (РМО) (Гончаров, 1978) и среда Лейбовитца (L-15) с добавлением бикарбоната натрия. Разбавление этих сред позволяло получать довольно высокий и сопоставимый в двух средах процент овулирующих ооцитов. Проверка способности к развитию показала, что наилучшей является разведенная до 69% среда L-15, содержащая 1.84 г/л бикарбоната натрия. Тем не менее, и в этой среде овуляцию ооцитов *in vitro* удалось получить далеко не у всех самок, поэтому представлялось целесообразным продолжить поиск оптимальной среды.

Ранее Гончаровым с соавторами (1997) было показано, что процент ооцитов, созревающих *in vitro* под влиянием экстракта гипофизов осетровых рыб, возрастает при увеличении осмоляльности среды культивирования. При этом оказалось, что для стимуляции созревания среды с увеличенной концентрацией бикарбоната натрия более эффективны, чем среды с большей осмоляльностью, но меньшим содержанием бикарбоната. В отношении влияния концентрации бикарбоната натрия на гормональную индукцию овуляции были лишь отдельные наблюдения, ко-

торые и подтолкнули нас к изучению этого вопроса.

Для получения высокого процента созревших, овулировавших и способных к оплодотворению и развитию яйцеклеток важны не только условия инкубирования, но и использование оптимальной гормональной обработки. Известно, что овуляцию ооцитов осетровых рыб индуцируют гонадотропный гормон гипофиза и прогестерон. Есть все основания предполагать, что в индукции их овуляции принимают участие простагландины, как это показано для бесхвостых амфибий (Schuetz, 1986; Chang et al., 1995; Sena, Liu, 2008), костистых рыб (Goetz et al., 1989; Goetz, Garczynski, 1997; Lister, Van Der Kraak, 2008) и млекопитающих (Hedin et al., 1987; Bridges et al., 2006; Kurusu et al., 2009),

Ключевым ферментом, превращающим арахидоновую кислоту в простагландины, является простагландин синтаза или индуцибельная изоформа циклоксигеназы (ЦОГ-2) (Vane et al., 1998). Показано, что в процессе индукции *in vitro* созревания и овуляции ооцитов шпорцевой лягушки прогестероном и хорионическим гонадотропином человека происходит увеличение экспрессии мРНК ЦОГ-2 (Sena, Liu, 2008). Полученные на млекопитающих данные свидетельствуют о том, что активность этого фермента зависит от концентрации прогестерона. При этом прогестерон может, как увеличивать образование простагландинов (Hermenegildo et al., 2005; Bridges et al., 2006), так и снижать его (Thorburn et al., 1973; Gleeson et al., 1974; Hellberg et al., 1996; Hedin, Eriksson, 1997; Diaz et al., 2002).

В опытах по индукции созревания ооцитов осетровых рыб обычно используют прогестерон в концентрации 1 мкг/мл. Наши предварительные опыты показали, что она, по крайней мере, на порядок превышает максимально эффективную, а приведенные выше литературные данные свидетельствовали о том, что такая высокая концентрация может через подавление образования простагландинов отрицательно сказываться на индукции овуляции. Таким образом, в этой работе мы исследовали влияние двух факторов, которые могут влиять на гормональную индукцию овуляции ооцитов осетровых рыб *in vitro* – концентрации бикарбоната натрия и концентрации прогестерона. Для того чтобы судить о том, насколько стимулированные *in vitro* процессы созревания и овуляции проходят нормально, мы в большинстве опытов осеменяли зрелые яйцеклетки и следили за ходом их развития. Из-за отсутствия спермы осеменение не проводили только в опытах, сведенных в табл. 2.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проводилась в апреле–мае. Основным объектом служили фолликулы стерляди (*Acipenser ruthenus* L.). Один опыт был поставлен также на фолликулах гибрида русского (*Acipenser gueldens-taedtii* Brandt) и сибирского (*Acipenser baerii* Brandt) осетра. Самки стерляди и гибрида были выращены на Краснодарском (Адыгейском) осетровом рыбноводном заводе. Фолликулы получали от самок стерляди и гибрида, находившихся в этот момент в бассейнах с температурой воды 10°C.

Овариальные фолликулы извлекали из тела самки с помощью специального металлического щупа и помещали в 75% среду L-15 (~15°). Их многократно отмывали этой же средой и хранили в ней при 4°C до опыта от 3–4 ч до суток. Перед распределением по чашкам Петри фолликулы промывали средами, соответствующими тем, в которых их в дальнейшем инкубировали. В среды добавляли пенициллин (500 ед./л) и стрептомицин (0.25 г/л).

В качестве индукторов созревания и овуляции ооцитов использовали прогестерон или препарат гонадотропного гормона гипофиза севрюги (сГТГ), очищенный по модифицированной описанной ранее методике (Burzawa-Gerard et al., 1975). Прогестерон вносили в чашки Петри в виде концентрированного спиртового раствора. Конечная концентрация гормона в среде культивирования была от 16 до 1000 нг/мл, а концентрация спирта 0.05%. сГТГ вносили в виде концентрированного раствора, приготовленного на РМО с 0.5 г/л бикарбоната натрия. Конечная концентрация сГТГ составляла 2 мкг/мл.

Фолликулы инкубировали в 5 мл или 7.5 мл среды в вентилируемых пластиковых чашках Петри диаметром, соответственно, 35 и 55 мм. В чашки помещали, соответственно, по 20–22 или 30–33 фолликула. Инкубацию фолликулов проводили в термостате при температуре $16 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Овуляцию учитывали путем подсчета отделившихся от ооцита оболочек фолликула.

Осеменение проводили по общепринятой в осетроводстве методике полусухим способом (см. Dettlaff et al., 1993). Перед осеменением РМО сливали и добавляли воду и сперму одновременно из расчета 1 : 25. Сперму предварительно проверяли на подвижность.

Для определения достоверности различий в проценте овулировавших ооцитов использовали критерий χ^2 для качественных показателей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние состава среды культивирования на индуцированную гормонами in vitro овуляцию ооцитов стерляди

В табл. 1 представлены результаты опытов по инкубации фолликулов восьми самок стерляди в двух разных средах (РМО, содержащем 0.5 и 2 г/л бикарбоната натрия) в присутствии двух гормональных препаратов (прогестерона и сГТГ). В этом опыте эффективность гормонов в использованных концентрациях в обеих средах была приблизительно одинакова. Видно, что и прогестерон, и сГТГ в среде с уменьшенной концентрацией бикарбоната натрия вызывают овуляцию в большем проценте случаев у всех самок. Влияние концентрации бикарбоната натрия несколько больше сказывалось при использовании прогестерона. Кроме того, было отмечено, что при снижении концентрации бикарбоната натрия не только увеличивается процент овулировавших ооцитов, но и процесс овуляция начинается раньше. Звездочками отмечен уровень значимости различий.

Влияние концентрации прогестерона на овуляцию in vitro ооцитов стерляди

В опытах были использованы три концентрации. Наименьшая (16 нг/мл) составляла примерно половину от той, которую мы использовали в описанных выше опытах, средняя (128 нг/мл) была больше ее примерно в четыре раза, а наибольшая (1 мкг/мл) равнялась той, которая ранее использовалась нами для индукции созревания и овуляции ооцитов. В качестве среды инкубации в этом опыте мы использовали РМО с 0.5 г/л бикарбоната натрия.

Опыты были проведены на фолликулах четырех самок стерляди. Результаты опытов представлены в табл. 2.

Можно видеть, что процент овулировавших ооцитов снижается при увеличении концентрации прогестерона. Исключением является только самка 3, у которой процент ооцитов, овулировавших под влиянием первых двух концентраций, примерно одинаков. Овулировавшие ооциты имели хороший вид и при перенесении в воду активировались и дробились партеногенетически.

Способность к развитию ооцитов стерляди, созревших и овулировавших в разных средах под влиянием прогестерона или гонадотропина себрюги

Все овулировавшие ооциты самок стерляди 1–5 (см. табл. 1) были осеменены. Процент нормально развивающихся зародышей определяли

Таблица 1. Влияние концентрации бикарбоната натрия в РМО на овуляцию ооцитов стерляди, стимулированную прогестероном или сГТГ

	Процент овулировавших ооцитов			
	0.5	2.0	0.5	2.0
Концентрация бикарбоната натрия (г/л)				
Стимулятор:	прогестерон 30 нг/мл		сГТГ 2 мкг/мл	
Самка 1	85 (51)	18** (11)	73 (44)	22** (13)
Самка 2	42 (25)	14** (3)	32 (7)	18 (4)
Самка 3	82 (18)	50* (11)	73 (16)	64 (14)
Самка 4	64 (21)	–	18 (6)	15 (5)
Самка 5	70 (23)	–	64 (21)	21** (7)
Самка 6	85 (28)	–	76 (25)	30** (10)
Самка 7	42 (14)	0** (0)	73 (24)	9** (3)
Самка 8	88 (29)	9** (3)	73 (24)	18** (6)
Самки 1–8	70	18	60	25

В скобках приведено число овулировавших ооцитов. Различия между числом ооцитов, овулировавших в РМО с 0.5 и 2 г/л бикарбоната натрия, достоверны на уровне: * <0.05, ** <0.005. Отсутствие звездочки – различия недостоверны. Пропуски в таблице связаны с отсутствием достаточного числа фолликулов для постановки данного варианта опыта.

Таблица 2. Влияние концентрации прогестерона на овуляцию *in vitro* ооцитов стерляди в РМО с 0.5 г/л бикарбоната натрия

	Процент овулировавших ооцитов		
	16	128	1000
Концентрация прогестерона, нг/мл			
Самка 1	59 (13)	36 (8)	27 (6)
Самка 2	82 (18)	32 (7)	18 (4)
Самка 3	75 (15)	85 (17)	20 (4)
Самка 4	64 (14)	32 (7)	14 (3)
Самка 1–4	70	46	20

Число фолликулов на чашку 20–22. В скобках приведено число овулировавших ооцитов.

Таблица 3. Развитие зародышей стерляди, полученных после осеменения ооцитов, созревших и овулировавших *in vitro* под влиянием разных стимуляторов и в разных средах

№ самки	Стимулятор	Концентрация бикарбоната натрия, г/л	Общее число фолликулов	Число овулировавших ооцитов	Процент* нормальных зародышей на стадии:		
					4	17	36
1	Прог.	0.5	60	51	88 (75)	86 (73)	69 (58)
	Прог.	2	60	11	82 (15)	54 (10)	36 (7)
	сГТГ	0.5	60	44	98 (72)	95 (70)	68 (50)
	сГТГ	2	60	13	77 (17)	69 (15)	38 (8)
2	Прог.	0.5	60	25	72 (30)	64 (27)	36 (15)
	Прог.	2	33	3	67 (6)	0 (0)	0 (0)
	сГТГ	0.5	30	7	57 (13)	0 (0)	0 (0)
	сГТГ	2	33	4	50 (6)	50 (6)	0 (0)
3	Прог.	0.5	22	18	100 (82)	89 (73)	56 (45)
	Прог.	2	22	11	82 (41)	73 (36)	55 (27)
	сГТГ	0.5	22	16	100 (73)	63 (45)	0 (0)
	сГТГ	2	22	14	50 (32)	43 (28)	0 (0)
4	Прог.	0.5	30	21	90 (63)	н/опр	н/опр
	сГТГ	0.5	30	6	67 (13)	н/опр	н/опр
	сГТГ	2	33	5	100 (15)	н/опр	н/опр
5	Прог.	0.5	30	23	78 (60)	н/опр	н/опр
	сГТГ	0.5	33	21	100 (64)	н/опр	н/опр
	сГТГ	2	30	7	86 (20)	н/опр	н/опр

* По отношению к числу овулировавших ооцитов, в скобках — по отношению к общему числу ооцитов в данном варианте опыта.

на стадиях 5 (4 бластомера), 17 (конец гастрюляции) и 36 (вылупление) (Dettlaff et al., 1993). Процент развивающихся зародышей рассчитывали от общего числа взятых в опыт фолликулов и от числа овулировавших ооцитов. К сожалению, полностью проследить развитие зародышей удалось не у всех самок. Полученные результаты представлены в табл. 3. Они оказались не вполне одинаковыми для разных самок. Так у самки 1 существенно более высокий процент нормальных зародышей был получен после осеменения ооцитов, созревших и овулировавших в РМО с 0.5 г/л по сравнению с 2 г/л бикарбоната натрия независимо от использованного гормонального препарата. У самки 2 на фоне низкого процента овуляции во всех вариантах опыта наблюдался большой отход на всех стадиях развития. Только в одном варианте (индукция овуляции прогестероном в РМО, содержащем 0.5 г/л бикарбоната натрия) до стадии вылупления выжило небольшое число зародышей. У самки 3 на фоне достаточно высокого про-

цента ооцитов, овулировавших под влиянием и прогестерона, и сГТГ (особенно в РМО с 0.5 г/л бикарбоната натрия) стадии вылупления достигли только зародыши, развившиеся из ооцитов, созревших и овулировавших под влиянием прогестерона. На фолликулах последних двух самок опыт был несколько сокращен по числу вариантов (три вместо четырех). Кроме того, по техническим причинам качество полученных яйцеклеток было оценено только в самом начале развития. К этой стадии снова наилучший результат был получен в варианте опыта с использованием РМО, содержащем 0.5 г/л бикарбоната натрия, и прогестерона в качестве стимулятора (самка 4). У самки 5 в этой среде эффективность обоих стимуляторов оказалась одинаковой.

В единственном опыте, поставленном на фолликулах гибрида русского и сибирского осетра (табл. 4), наилучшим по уровню овуляции и по потенциалу развития оказался вариант, в котором в качестве среды культивирования был использо-

Таблица 4. Развитие зародышей гибрида русского и сибирского осетра, полученных после осеменения ооцитов, созревших и овулировавших *in vitro* под влиянием разных стимуляторов и в разных средах

Стимулятор	Концентрация бикарбоната натрия, г/л	Общее число фолликулов	Число овулировавших ооцитов	Процент нормальных зародышей на стадии:		
				4	17	36
Прог.	0.5	31	8	75 (19)	38 (10)	38 (10)
сГТГ	0.5	31	28	100 (90)	96 (87)	79 (71)
сГТГ	2	31	4	75 (10)	50 (6)	50 (6)

ван РМО, содержащий 0.5 г/л бикарбоната натрия, а в качестве стимулятора – сГТГ.

ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущей работе (Goncharov et al., 2009), посвященной разработке метода гормональной индукции овуляции *in vitro*, мы обнаружили, что при снижении осмоляльности среды культивирования фолликулов путем разбавления РМО можно получать высокий процент овулировавших ооцитов севрюги, однако в этих условиях нарушается процесс их созревания. Такие ооциты не способны к оплодотворению и/или развитию.

Мы предположили, что часто получаемый в неразведенном РМО *in vitro* низкий процент овулировавших ооцитов может быть связан не с осмоляльностью, а с высоким содержанием бикарбоната натрия в РМО. Это предположение полностью подтвердилось. Снижение концентрации бикарбоната натрия с 2 до 0.5 г/л привело к существенному увеличению процента овулировавших ооцитов независимо от использованного стимулятора (табл. 1).

Пока трудно судить о механизме влияния бикарбоната натрия на овуляцию. Уже довольно давно было установлено, что его концентрация является важным фактором, влияющим на созревание ооцитов осетровых рыб *in vitro*. Увеличение концентрации бикарбоната до определенных пределов повышает чувствительность фолликулов к гонадотропным гормонам гипофиза (Гончаров, 1978), но не влияет на созревание ооцитов, вызываемое прогестероном (Гончаров и др., 1997). Кроме того, при определенном физиологическом состоянии фолликулов их инкубация в РМО, содержащем увеличенную концентрацию бикарбоната натрия (2–3 г/л), приводит к созреванию ооцитов в отсутствие гормонов. Есть все основания полагать, что наблюдаемые эффекты повышенной концентрации этой соли определяются скорее не ее вкладом в осмоляльность среды, и не влиянием на кислотность среды а специ-

фическим вмешательством в сигнальные пути, обеспечивающие некоторые функции клеток. Известно, например, что ион бикарбоната активирует растворимую аденилатциклазу в спермиях (Garbers et al., 1982; Hess et al., 2005) и ранних зародышах млекопитающих (Chen et al., 2010) и эта активация необходима для капацитации спермиев и развития зародышей.

В этой работе для индукции созревания и овуляции ооцитов *in vitro* мы использовали существенно меньшую концентрацию прогестерона – 30 нг/мл вместо 1000 нг/л. Переход на меньшую концентрацию основывался на предположении о том, что у осетровых рыб, так же как у костистых рыб (Goetz et al., 1989; Goetz, Garczynski, 1997; Lister, Van Der Kraak, 2008), и амфибий (Schuetz, 1986; Chang et al., 1995; Sena, Liu, 2008) в индукции овуляции участвуют простагландины, а высокие дозы прогестерона, согласно приведенным ранее литературным данным, полученным, правда, на млекопитающих, могут подавлять их образование. Использование низкой концентрации прогестерона действительно дало хороший результат (у шести из восьми самок процент овулировавших ооцитов был выше 50) (табл. 1), что свидетельствует в пользу высказанного предположения. В настоящее время предположение об участии простагландинов в стимуляции овуляции ооцитов осетровых рыб проверяется.

Следует отметить, что в работах по стимуляции *in vitro* овуляции у ряда видов костистых рыб были эффективны относительно небольшие концентрации мейозиндуцирующего стероида. Так, для японского морского угря (*Anguilla japonica*) это 10–100 нг/мл (Kagawa et al., 2003), а для обыкновенного крокера (*Micropogonias undulatus*) – 290 нг/мл (Yoshizaki et al., 2001; Patino et al., 2003).

Чтобы проверить возможное подавляющее действие больших концентраций прогестерона на овуляцию был поставлен опыт на фолликулах четырех самок стерляди, и при использовании 1 мкг/мл, действительно, был получен суще-

ственно худший результат по сравнению с 128 и 16 нг/мл (табл. 2).

Пока сложно говорить о диапазоне оптимальных для индукции овуляции концентраций прогестерона. Очень вероятно, что он будет различаться у самок, чьи фолликулы находятся в разном физиологическом состоянии. Возможно, что, увеличив или уменьшив концентрацию прогестерона, для самок 2 и 7 (табл. 1) можно было бы получить более высокий процент овулировавших ооцитов. Более того, мы практически уверены, что 30 нг/мл прогестерона оказались недостаточной дозой для индукции овуляции у гибрида русского и сибирского осетров, так как в том же опыте при обработке фолликулов сГТГ был получен очень высокий процент овулировавших ооцитов (табл. 4).

Возможность стабильного воспроизведения овуляции ооцитов осетровых рыб *in vitro* представляет интерес не только для изучения механизмов регуляции этого процесса, но может иметь значение и для решения важных прикладных задач. В первую очередь речь идет о возможности получения потомства редких и исчезающих видов без риска потери сразу всех яйцеклеток. Это может произойти, если инъецировать самке гормональный препарат по схеме, не адекватной ее состоянию. Надежного метода определения физиологического состояния фолликулов, который позволял бы гарантировать результат гормонального воздействия, не существует (Гончаров и др., 1999). Альтернативой гормональной обработки самки является получение зрелых и овулировавших яйцеклеток *in vitro*. Разумеется, важно, чтобы созревшие и овулировавшие яйцеклетки были способны к нормальному развитию.

После нашего исследования на севрюге (Goncharov et al., 2009) сложилось впечатление, что такая простая солевая среда, как РМО не способна содействовать формированию или обеспечивать сохранение способности яйцеклеток к развитию, несмотря на то, что в ней можно индуцировать и созревание, и овуляцию ооцитов. Напомним, что в цитируемой работе существенно лучший результат был получен при использовании разбавленной среды Лейбовитца.

Наше исследование показало, что, уменьшив концентрацию бикарбоната натрия в РМО и используя низкие дозы прогестерона или сГТГ, можно получать зрелые, овулировавшие и способные к нормальному развитию яйцеклетки. Отметим, что этот метод уже был успешно применен нами для получения зрелых яйцеклеток сибирского осетра, которые в дальнейшем были использованы для получения гиногенетического потомства. При этом результаты оказались сопоставимыми с результатами по получению гиногенетического потомства из яйцеклеток, созревших

под влиянием гормонального воздействия *in vivo* (Грунина и др., 2010).

В дальнейшем представляется необходимым более точно определить условия культивирования фолликулов и гормональной обработки, обеспечивающие наилучший результат у самок с разным физиологическим состоянием. Вполне вероятно, что при определенном состоянии фолликулов лучший результат может быть получен при использовании не РМО, а среды Лейбовитца, а при другом – наоборот. В настоящее время при работе с уникальными самками представляется целесообразным для получения *in vitro* зрелых, овулировавших и способных к развитию яйцеклеток параллельно использовать и описанные ранее (Goncharov et al., 2009) и описанные в этой работе оптимальные условия культивирования фолликулов и их гормональной обработки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гончаров Б.Ф. Влияние состава среды культивирования на способность фолликулов осетровых рыб реагировать созреванием на действие гонадотропных гормонов // Вопросы раннего онтогенеза у рыб / Киев: Наукова Думка, 1978. С. 77–78.
- Гончаров Б.Ф., Полуван И.С., Вийо П., Ле Менн Ф. Влияние состава среды культивирования на созревание ооцитов осетровых рыб, индуцируемое гонадотропным гормоном и прогестероном // Онтогенез. 1997. Т. 28. С. 55–64.
- Гончаров Б.Ф., Вийо П., Ле Менн Ф. Морфологические и физиологические характеристики овариальных фолликулов сибирского осетра и их ценность для прогнозирования успеха искусственного размножения // Там же. 1999. Т. 30. С. 51–60.
- Грунина А.С., Скоблина М.Н., Гончаров Б.Ф. и др. Жизнеспособное гиногенетическое потомство сибирского осетра *Acipenser baeri* Brandt (Pisces, Acipenseridae), полученное с использованием яйцеклеток, овулировавших *in vitro* // ДАН. 2010. Т. 431. С. 269–273.
- Bobe J., Nguyen T., Fostier A. Ovarian function of the trout preovulatory ovary: New insights from recent gene expression studies // Comp. Biochem. Physiol. Part A. Mol. Integr. Physiol. 2009. V. 153. P. 63–68.
- Bridges P.J., Komar C.M., Fortune J.E. Gonadotropin-induced expression of mRNA for cyclooxygenase-2 (COX-2) and production of prostaglandins E and F2{alpha} in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor // Endocrinology. 2006. V. 147. P. 4713–4722.
- Burzawa-Gerard E., Goncharov B.F., Fontaine Y.A. L'hormone gonadotrope hypophysaire d'un poisson chondroste'en, l'Esturgeon (*Acipenser stellatus* Pall.). 1. Purification // Gen. Comp. Endocrinol. 1975. V. 27. P. 289–295.
- Chang K.J., Kim J.W., Lee J. et al. Prostaglandin production and ovulation during exposure of amphibian ovarian follicles to gonadotropin or phorbol ester *in vitro* // Gen. Comp. Endocrinol. 1995. V. 100. P. 257–266.

- Chen M.H., Chen H., Zhou Z. *et al.* Involvement of CFTR in oviductal HCO₃-secretion and its effect on soluble adenylate cyclase-dependent early embryo development // *Hum. Reprod.* 2010. V. 25. P. 1744–1754.
- Detlaff T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I. *Sturgeon fishes: Developmental Biology and Aquaculture.* Berlin: Springer Verlag, 1993. P. 300.
- Diaz F.J., Anderson L.E., Wu Y.L. *et al.* Regulation of progesterone and prostaglandin F₂α production in the CL // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002. V. 191. P. 65–80.
- D'Inca R., Marteil G., Bazile F. *et al.* Proteomic screen for potential regulators of M-phase entry and quality of meiotic resumption in *Xenopus laevis* oocytes // *J. Proteomics.* 2010. V. 73. P. 1542–1550.
- Garbers D.L., Tubb D.J., Hyne R.V. A requirement of bicarbonate for Ca²⁺-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 8980–8984.
- Gleeson A.R., Thorburn G.D., Cox R.I. Prostaglandin F concentrations in the utero-ovarian venous plasma of the sow during the late luteal phase of the oestrous cycle // *Prostaglandins.* 1974. V. 5. P. 521–529.
- Goetz F.W. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes // *Fish physiology.* V. IXB / Eds. Hoar W.S. *et al.* N.Y.: Acad. Press, 1983. P. 117–170.
- Goetz F.W., Garczynski M. The ovarian regulation of ovulation in teleost fish // *Fish Physiol. Biochem.* 1997. V. 17. P. 33–38.
- Goetz F.W., Duman P., Berndtson A., Jankowsky E.G. The role of prostaglandins in the control of ovulation in yellow perch, *Perca flavescens* // *Fish Physiol. Biochem.* 1989. V. 7. P. 163–168.
- Goncharov B.F., Skoblina M.N., Trubnikova O.B., Vassetzky S.G. Hormonal induction of ovulation *in vitro* in sturgeon fishes // *Biology, Conservation and Development of Sturgeon* / Eds. Carmona R. *et al.* Springer, 2009. P. 175–185.
- Hedin L., Eriksson A. Prostaglandin synthesis is suppressed by progesterone in rat preovulatory follicles *in vitro* // *Prostaglandins.* 1997. V. 53. P. 91–106.
- Hedin L., Gaddy-Kurten D., Kurten R. *et al.* Prostaglandin endoperoxide synthase in rat ovarian follicles: content, cellular distribution, and evidence for hormonal induction preceding ovulation // *Endocrinology.* 1987. V. 121. P. 722–731.
- Hermenegildo C., Oviedo P.J., García-Martínez M.C. *et al.* Progestogens stimulate prostacyclin production by human endothelial cells // *Hum. Reprod.* 2005. V. 20. P. 1554–1561.
- Hellberg P., Larson L., Olofsson J. *et al.* Regulation of the inducible form of prostaglandin endoperoxide synthase in the perfused rat ovary // *Mol. Hum. Reprod.* 1996. V. 2. P. 111–116.
- Hess K.C., Jones B.H., Marquez B. *et al.* The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization // *Dev. Cell.* 2005. V. 9. P. 249–259.
- Kagawa H., Tanaka H.I., Unuma T. *et al.* Role of prostaglandin in the control of ovulation in the Japanese eel *Anguilla japonica* // *Fish. Sci.* 2003. V. 69. P. 234–241.
- Kurusu S., Jinno M., Ehara H. *et al.* Inhibition of ovulation by a lipoxigenase inhibitor involves reduced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production in gonadotropin-primed immature rats // *Reprod.* 2009. V. 137. P. 59–66.
- Lister A.L., Van Der Kraak G. An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2008. V. 159. P. 46–57.
- Liu Z., Su X., Li T. *et al.* Molecular cloning and expression of prostaglandin F₂α receptor isoforms during ovulation in the ovarian follicles of *Xenopus laevis* // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010. V. 93. P. 93–99.
- Lutes P.B. Oocyte maturation in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: some mechanisms and applications // *North American Sturgeons: Biology and Aquaculture Potential* / Eds. Binkowski E.P. and Doroshov S.I. Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers, 1985. P. 87–92.
- Masui Y., Clarke H.J. Oocyte maturation // *Int. Rev. Cytol.* 1979. V. 57. P. 185–282.
- Nagahama Y., Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish // *Dev. Growth Differ.* 2008. V. 50. Suppl. 1. P. 195–219.
- Pang Y., Thomas P. Role of G protein-coupled estrogen receptor 1, GPER, in inhibition of oocyte maturation by endogenous estrogens in zebrafish // *Dev. Biol.* 2010. V. 342. P. 194–206.
- Patino R., Yoshizaki G., Bolamba D., Thomas P. Role of arachidonic acid and protein kinase C during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic croaker // *Biol. Reprod.* 2003. V. 68. P. 516–523.
- Pinter J., Thomas P. Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid 17, 20β, 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1999. V. 115. P. 200–209.
- Sadler S.E., Angleson J.K., Dsouza M. IGF-1 receptors in *Xenopus laevis* ovarian follicle cells support the oocyte maturation response // *Biol. Reprod.* 2010. V. 82. P. 591–598.
- Schuetz A.W. Hormonal dissociation of ovulation and maturation of oocytes: ovulation of immature amphibian oocyte by prostaglandin // *Gamete Res.* 1986. V. 15. P. 99–113.
- Sena J., Liu Z. Expression of cyclooxygenase genes and production of prostaglandins during ovulation in the ovarian follicles of *Xenopus laevis* // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2008. V. 157. P. 165–173.
- Thorburn G.D., Cox R.I., Currie W.B. *et al.* Prostaglandin F and progesterone concentrations in the utero-ovarian venous plasma of the ewe during the oestrous cycle and early pregnancy // *J. Reprod. Fert.* 1973. Suppl. 18. P. 151–158.
- Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M. Cyclooxygenases 1 and 2 // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998. V. 38. P. 97–120.
- Wallace R.A., Selman K. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. I. Preliminary observations on oocyte maturation *in vivo* and *in vitro* // *Dev. Biol.* 1978. V. 62. P. 354–369.
- Yoshizaki G., Patino R., Thomas P. *et al.* Effects of maturation-inducing hormone on heterologous gap junctional coupling in ovarian follicles of Atlantic croaker // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2001. V. 124. P. 359–366.

Stimulation in vitro of Oocytes of Acipenserids with Progesterone and Homologous Gonadotropic Hormone of Hypophysis

M. N. Skoblina and B. F. Goncharov

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: skoblina38@mail.ru*

Abstract—We showed that the percentage of oocytes of acipenserids ovulating in vitro in Ringer solution modified for sturgeons (RMS) considerably depends on the concentration of sodium bicarbonate and the concentration of progesterone. Under optimal conditions (0.5 g/L of sodium bicarbonate and 30 ng/mL of progesterone), it can be higher than 80. Oocytes that matured and ovulated under such conditions are capable of normal development. In the best case, approximately 70% of developing embryos (of the number of ovulated oocytes) reach the stage of hatching (dead-line of observation). This method of producing offspring based on the insemination of oocytes that have matured and ovulated in vitro can be used in work with single females of rare and disappearing species of acipenserids.

Keywords: acipenserids, maturation of oocytes, ovulation in vitro, cultivation medium, sodium bicarbonate, progesterone, gonadotropic hormone of the hypothesis.

УДК 597.828:591.34

КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ *R. arvalis*. ЧАСТЬ 2: РАЗВИТИЕ ГОЛОВНЫХ СТРУКТУР¹

© 2012 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 17.09.10 г.

Окончательный вариант получен 27.09.10 г.

Анализ динамики вариабельности формирующихся головных структур головастика остромордой лягушки (*R. arvalis*) позволил выявить периоды, на которых происходит сужение пределов изменчивости их характеризующих признаков. Эти, так называемые “критические периоды”, для одних структур в процессе индивидуального развития сменяются критическими периодами для других структур. Однако для некоторых головных структур исследование индивидуальной изменчивости не позволило выявить критические стадии развития в эмбриогенезе. Возможно, это связано с анализом непродолжительного периода развития и на более поздних стадиях будет возможно выделить критические периоды в формировании таких структур.

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

Представление о действии естественного отбора исключительно на поздние этапы эмбриогенеза основано еще на работах Геккеля о консервативности раннего развития и онтогенетически более позднем формированием специфических для каждого таксона черт (Richardson, 1999). Аналогичный подход используют и некоторые молекулярно-генетические исследователи (Slack et al., 1993). Тем не менее, нельзя не учитывать, что ранние стадии развития, включая деление и гастрюляцию, могут сильно различаться даже среди родственных видов (Wray, 1995; Chipman, 2002). При этом наблюдающиеся ранее морфологические различия по мере развития “сходятся”, формируя так называемую филотипическую стадию, которая может совпадать с геккелевскими консервативными стадиями (Hall, 1997; Richardson, 1998). Понятие “филотипическая стадия” в современном виде определяет стадии с большим числом консервативных морфологических признаков, по сравнению с количеством специализированных признаков (Hall, 1997).

Одним из методов, позволяющим выделить такие периоды в раннем развитии может быть использование тератогенов (Shenefelt, 1972). При их воздействии происходит закономерное кратковременное повышение чувствительности зародышей

на раздражение даже ничтожной силы и, как следствие, включение цепей морфогенетических реакций и/или нарушение темпов развития отдельных закладок органов у эмбрионов (Stockard, 1921; Goldschmidt, 1938). Так формируется пластичность развития, при генетической ассимиляции которой возможны эволюционные преобразования развития (Waddington, 1953, 1956). Такой подход сближает представления классических работ Светлова о “критических периодах развития”, как о периодах детерминации (Светлов 1960, 1978) с современной теорией “филотипических стадий развития” и данных генетики развития (Richardson, 1999), в частности данных по паттерну экспрессии гомеобоксных генов (Slack et al., 1993).

Еще в 1956 году Уоддингтон писал: “Есть промежуточные периоды развития, когда эмбрионы наиболее сходны; возможно, потому, что в это время быстро закладываются основные структуры эмбрионов и для эволюции очень трудно что-то изменить в этот период без ввергания всего развития в полный беспорядок” (Waddington, 1956, с. 9). С точки зрения исследования эволюционных преобразований онтогенеза важно выявить такие стадии и не только на ранних этапах эмбриогенеза, но и на ранних этапах органогенеза. Классическим методом выявления критических периодов в развитии является оценка возрастания смертности и/или доли аномалий развития. На это указывалось и в работах Светлова и его последователей, работавших в основном с эмбрионами рыб (Трифоновна, 1954). Этот же подход применяется и в современ-

¹ Предлагаемая статья является второй частью серии статей. Часть 1 посвящена изучению критических периодов в эмбриогенезе остромордой лягушки на основе анализа общих размеров зародыша, а часть 3 — на основе пропорциональных характеристик.

ных работах, подтверждающих представление о некоторых стадиях развития, в частности стадии вылупления и предметаморфозных стадиях, как критических в развитии амфибий (Журавлева, 2009; Greulich, Pflugmacher, 2003; Mortensen et al., 2006; Gross et al., 2009).

Однако мы применили иной подход, основываясь на анализе изменчивости формирующихся структур, используя оценку вариабельности нормального развития зародышей. Впервые этот метод был предложен Дорфманом и Черданцевым, в чьих работах было введено представление об “узловых стадиях развития”, соответствующих “критическим периодам” (с. 167, Дорфман, Черданцев, 1977).

В нашей предыдущей статье, используя этот метод, мы показали, что развитие остромордой лягушки характеризуется несколькими периодами сужения пределов вариабельности анализируемых признаков (Северцова, Северцов, 2010). Эти периоды соответствовали общеизвестным критическим (узловым) периодам в эмбриогенезе: стадиям поздней гаструлы, стадии вылупления и, возможно, стадии почки задней конечности. Однако мы анализировали только признаки, характеризующие размеры тела и изменения, тесно связанные с процессами роста. В предлагаемой работе нам хотелось проанализировать динамику вариабельности признаков, характеризующих не столько рост, сколько дифференциацию структур переднего отдела тела головастика. Этот интерес, прежде всего, связан с тем, что как показывают наблюдения аномальные и погибшие головастики во время критических периодов развития (например, вылупления) не имели ярко выраженных аномалий этих структур. Наиболее часто отмечались искривления позвоночника (Северцова, Северцов, 2010).

Задачей данного исследования было выявление критических периодов в формировании головных структур головастика на отрезке онтогенеза со стадии хвостовой почки до стадии почки задней конечности.

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 глубокую 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 постоянный водоем пополняется 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 градусов. Стадии развития определялись согласно таблицам Дабагян и Слепцовой (1975), разработанным для травяной лягушки, но часто аппроксимируемым и на развитие 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 до 39 головастика фиксировали каждые 3–4 часа 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): длина морды (Dl) – от основания жабр до наиболее выступающей части морды; высота морды (Vis) – от края ротовой присоски до точки наиболее выступающей части морды; ширина головы (Wg) – расстояние, измеренное по линии жаберных щелей у головастика, лежащего на спине; длина головы (Dlg) – расстояние, измеренное у головастика, лежащего на спине от линии жаберных щелей до наиболее выступающей точки морды; ширина ротовой присоски (W) – расстояние между валиками ротовой присоски; высота ротовой присоски (H) в сагиттальном направлении; ширина ротового отверстия (R) – расстояние между уголками ротового отверстия; расстояние между зрачками глаз (eye). Помимо вышеперечисленных признаков нами использовались признаки, подробный анализ которых проводился в статье, посвященной критическим периодам ростовых процессов зародышей остромордой лягушки (Северцова, Северцов, 2010). Эти признаки отмечены на рис. 1 серым цветом: общая длина зародыша (Lo); длина тела зародыша (Lb); длина хвостовой пластины (Lx) и ширина хвостовой пластины (Wx).

Полученные данные обрабатывали при помощи программ Excel и STATISTICA 6.0. Рассчитывался коэффициент вариации для каждой стадии каждой кладки. На основе однофакторного дисперсионного анализа вычислялся коэффициент

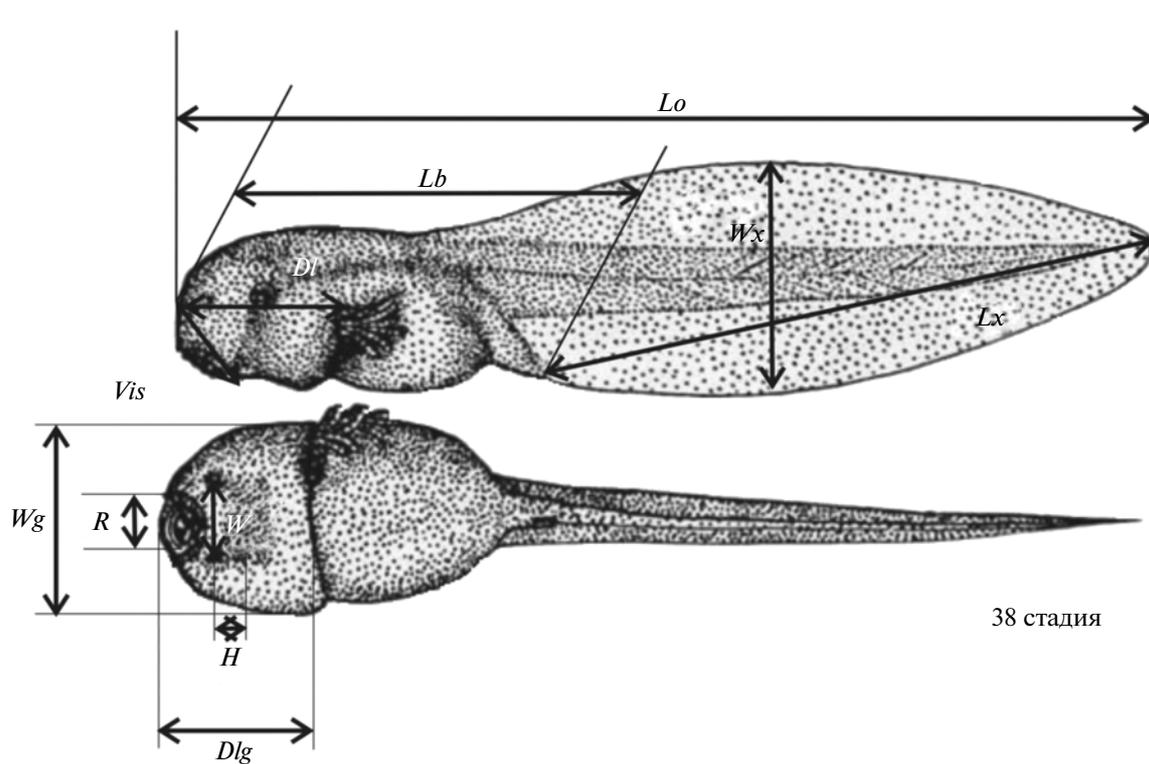


Рис. 1. Морфометрические признаки на примере 38 стадии развития остромордой лягушки (*Rana arvalis*). Обозначения признаков см. в тексте.

внутриклассовой корреляции по Фишеру (η^2 (%)), с помощью которого определялась доля (в %) внутрикладочной и межкладочной изменчивости. Так же рассчитывались общие коэффициенты вариации ($Cv_{\text{общ}}$), рассматриваемые нами как обобщенная характеристика варибельности развития зародыша в целом, и коэффициенты детерминации (R^2), выступающие как показатели согласованности развития формирующихся структур зародыша.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В этой статье проанализированы признаки, характеризующие развитие размеров тела головастика, его ротового аппарата и месторасположения глаз. Поскольку морфометрия этих структур проводилась на довольно поздних стадиях, то мы, для обеспечения репрезентативности выборок, объединили данные для трех анализированных популяций из районов Бутово, Востряково и Луцино.

Как показывает анализ динамики изменения значений коэффициентов вариации (Cv) для некоторых признаков можно выделить стадии, которые можно рассматривать в качестве узловых стадий (рис. 2). На стадии 36 мы наблюдаем сужение межкладочной изменчивости значений Cv для признака длина морды. При этом значения Cv меняются

от 5 до 9 и в большинстве пар межкладочных сравнений различия оказываются не значимыми. Кроме того, для данного признака, значение коэффициента внутриклассовой корреляции близок к 50% (рис. 4). На следующей стадии, стадии 37, значение η^2 (%) уменьшается до 18%, что позволяет предположить, что на этой стадии очень важным оказывается определенный размер структуры, что подтверждается и сравнением между кладками средних значений “длины морды” головастика. Изменчивость признака “высота морды” (Vis) находится примерно на том же уровне, что и для признака Dl : даже к стадиям 35–36 мы наблюдаем аналогичное сужение пределов варибельности развития (рис. 2). Однако с уверенностью выделить эту стадию в качестве узловой мы не можем, поскольку различия между Cv на 36-й стадии оказываются в большинстве случаев значимыми, а данных для анализа 35-й стадии недостаточно. Отсутствие узловых стадий на исследуемом отрезке развития подтверждает и анализ внутриклассового коэффициента корреляции: его значения меняются от 93% на 34-й стадии развития до 21% на 36-й стадии (рис. 4). По признаку “ширина головы” (Wg) мы наблюдаем сужение пределов изменчивости к 36–37 стадиям развития, причем происходит это во всех кладках, кроме одной, относящейся к группе кладок из района Востряково (рис. 2). На 36 стадии эта кладка погибла. Значе-

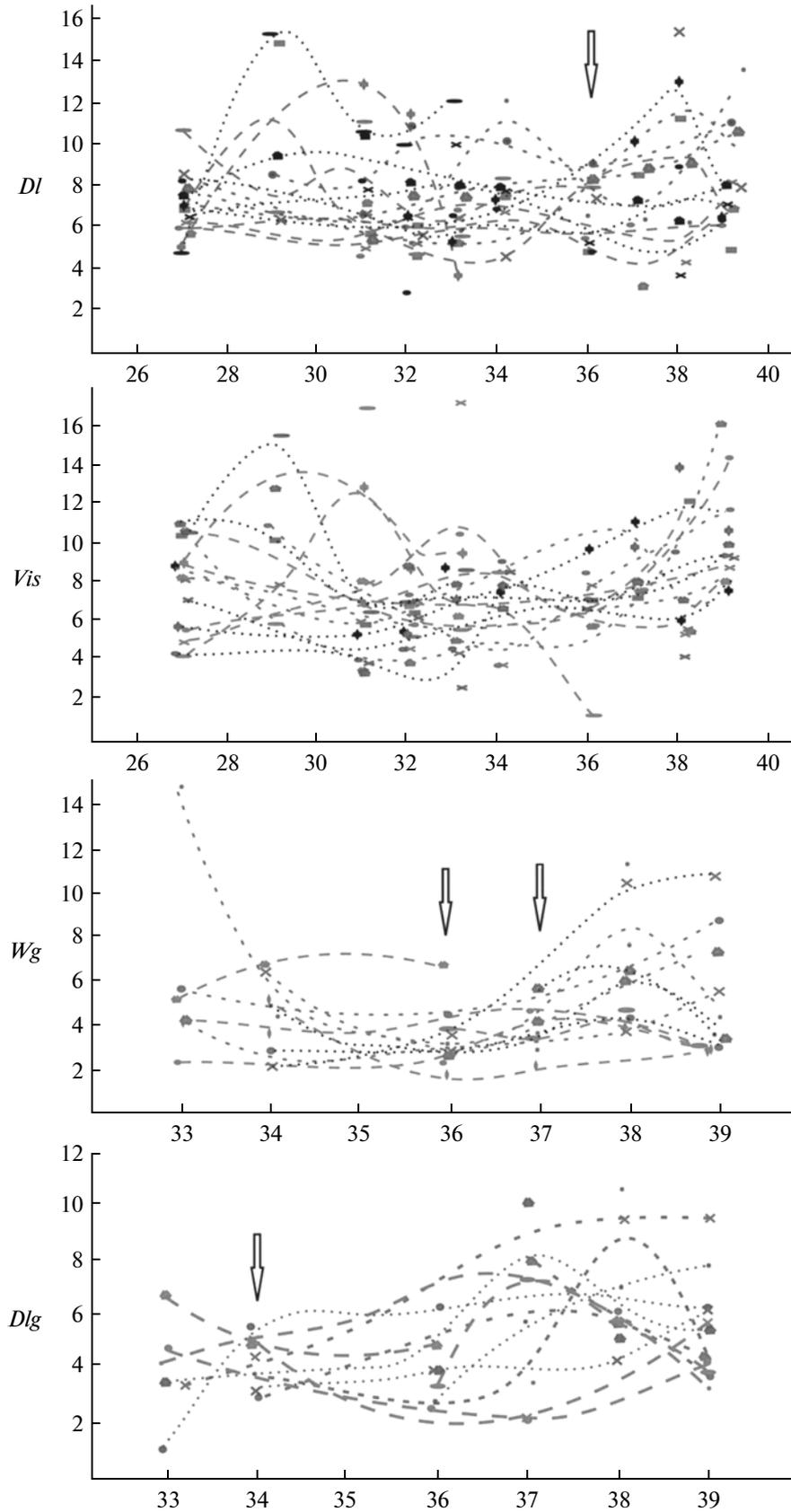


Рис. 2. Динамика значений коэффициентов вариации (C_v) признаков длина морды (Dl), высота морды (Vis), ширина головы (Wg), длина головы (Dlg). По оси X – номера стадий, по оси Y – значения C_v .

ния коэффициентов внутриклассовой корреляции принимают значения, близкие к 50% на 36 и 37 стадиях (рис. 4). Более ранний этап развития можно рассматривать в качестве узлового для признака “длина головы” (*Dlg*). Значения C_v для исследованных кладок оказываются близкими на 34-й стадии развития (рис. 2) и на этой же стадии значение коэффициента η^2 (%) оказывается близким к 50% (рис. 4). Еще один признак, имеющий сужение пределов вариабельности на конкретной стадии развития, является признак “ширина ротовой присоски” (*W*). На 33 стадии развития мы наблюдаем близкие значения C_v для разных кладок (рис. 3) и значения коэффициента внутриклассовой корреляции около 50% (рис. 4). Остальные же признаки, включенные в анализ: “высота ротовой присоски” (*H*), “ширина ротового отверстия” (*R*) и “расстояние между глаз” (*eye*), — не имеют узловых стадий на анализируемом отрезке развития остромордой лягушки. Межкладочные различия в вариабельности признака “высота ротовой присоски” оказываются существенными — это вообще один из наиболее изменчивых признаков, среди включенных в анализ (рис. 3). Тем не менее, на стадии 37 мы наблюдаем значение коэффициента η^2 (%) равное 50%, хотя различия в значениях C_v оказываются значимыми (рис. 4). Они уменьшаются к 39-й стадии, к которой значения коэффициента внутриклассовой корреляции приобретают значения около 21%. Близкую картину мы наблюдаем при анализе признака “ширина ротового отверстия” — высокая изменчивость признака снижается к 39-й стадии (рис. 3), а значения коэффициента η^2 (%) становится равным 33% (рис. 4). Однако при анализе этого признака, прежде всего, следует учесть недостаточное количество данных, особенно для головастика из района Бутово. Анализ признака “расстояние между глаз” так же затруднен из-за небольшого отрезка развития, включенного в исследование. На этом отрезке, т.е. с 36-й по 39-ю стадии, включительно, выделение узловой стадии достоверно не возможно. Можно только предположить, что, как и для предыдущего признака, на эту роль может претендовать 39-я стадия.

Таким образом, из восьми признаков, анализируемых со стадии расплытия (33–34 стадии) до стадии почки задней конечности (39 стадия), только у половины можно выделить так называемые узловые стадии. Эти стадии характеризуются сужением пределов варьирования признака, что отражается в уменьшении различий в значениях C_v при межкладочном сравнении. Кроме того, на таких стадиях развития, наблюдаются значения коэффициентов внутриклассовой корреляции близкое к 50%. На основании этих критериев нами были выделены следующие узловые стадии: для признаков “длина морды” (*DI*) и “ширина головы” (*Wg*) — 36-я стадия; для признака “длина го-

ловы” (*Dlg*) — 34 стадия, а для признака “ширина ротовой присоски” (*W*) — 33 стадия развития. Для остальных признаков, *Vis*, *H*, *R* и *eye*, — выделение узловых стадий на исследуемом отрезке развития, затруднительно. При их анализе следует учитывать, что рассматриваемый в данной работе период развития головастика оказался непродолжительным: фактически от момента закладки анализируемых структур до стадии почки задней конечности. Для этих признаков анализируемый отрезок развития составляет от 7 стадий (*Vis*) до 4-х стадий (*eye*). Возможно, узловые стадии будут наблюдаться на более поздних этапах развития.

Наши предыдущие исследования были посвящены изучению узловых стадий для признаков, характеризующих общий размер развивающегося головастика (Северцова, Северцов, 2010). В частности для признака “общая длина тела” (*Lo*) была выделена 32–33 стадии, для признака “длина туловища” (*Lb*) — 36 стадия; для признака “длина хвостовой пластины” (*Lx*) — и 32–33 стадии, и 36 стадия, а для признака “ширина хвостовой пластины” (*Wx*) — 34 стадия развития. Эта группа признаков рассматривается нами как характеристика ростовых процессов онтогенеза. Признаки же включенные в анализ данной статьи являются показателями не только роста, но и дифференциации, отражением формирования и развития структур зародыша.

На основании такого подхода, все 12 признаков, изучаемые с 27 (а для ряда признаков с 33 и даже с 36-й стадий) по 39 стадии развития были разделены на две группы. К первой мы отнесли признаки: *Lo*, *Lb*, *Lx* и *Wx*, а ко второй: *DI*, *Vis*, *Dlg*, *Wg*, *W*, *H*, *R* и *eye*. Как видно из рисунка 5А, между этими группами признаков наблюдаются различия. Признаки первой группы, характеризующие ростовые процессы демонстрируют несущественное, по мере развития, снижение общей вариабельности при значительном увеличении коррелированности. При этом коррелированность ростовых процессов резко возрастает с 29 по 32 стадии и с 34 по 36-ю, т.е. как раз на предузловых и узловых стадиях. Вторая группа признаков, напротив, характеризуется существенным возрастанием вариабельности по мере развития при низкой коррелированности. Особенно существенно изменчивость увеличивается с 37 по 38-ю стадии. Возможно, причиной такого соотношения вариабельности и согласованности развития является неоднородность признаков второй группы по своему значению. Как показано выше среди признаков этой группы присутствуют признаки, для которых была выделена узловая стадия в развитии на изучаемом отрезке онтогенеза. Имеются так же признаки, для которых не была обнаружена узловая стадия. Разделение признаков второй группы по этому критерию позволило продемонстрировать, что именно признаки, не имеющие узловых стадий (*Vis*, *H*, *R* и

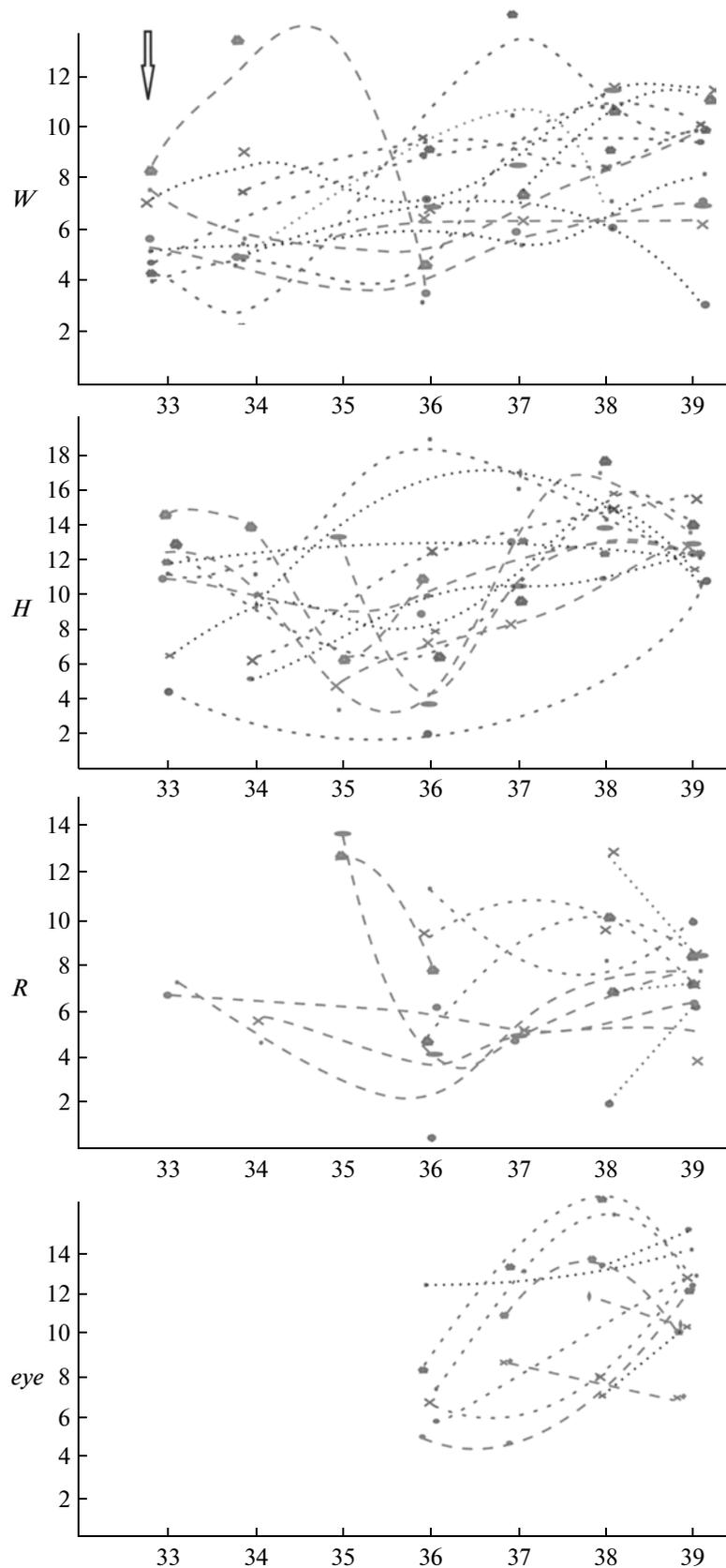


Рис. 3. Динамика значений коэффициентов вариации (C_v) признаков ширина ротовой присоски (W), высота ротовой присоски (H), ширина ротового отверстия (R), расстояние между глазами (eye). По оси X – номера стадий, по оси Y – значения C_v .

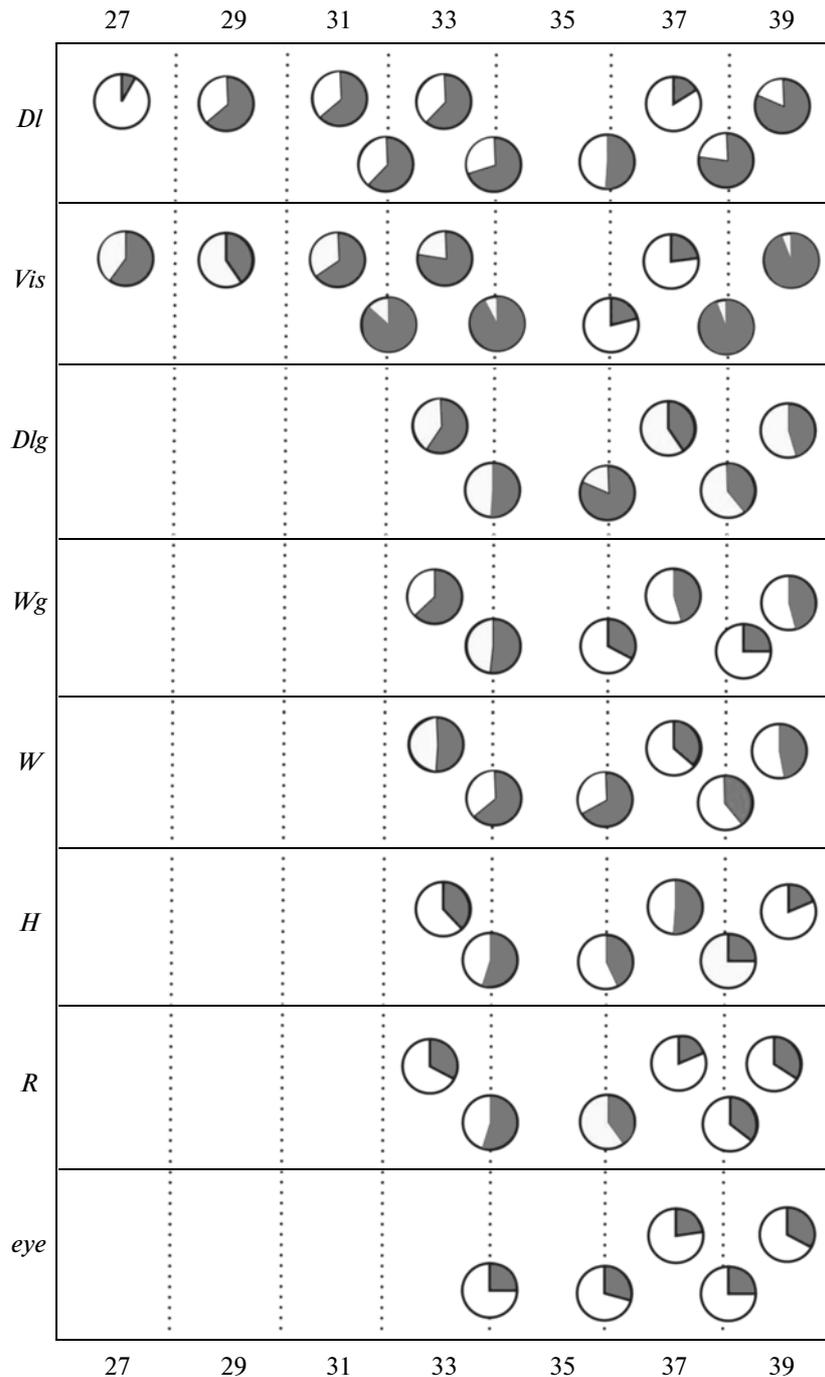


Рис. 4. Постадийная динамика значений коэффициента внутриклассовой корреляции по Фишеру (η^2 (%)). По оси X – номера стадий.

eye) характеризуются увеличением вариабельности развития при низкой ее согласованности (рис. 5Б). У признаков, для которых была выделена узловая стадия, при невысоком возрастании вариабельности, все-таки наблюдается и увеличение согласованности развития.

Таким образом, на основании анализа динамики изменчивости развития 12 признаков зароды-

шей остромордой лягушки можно выделить так называемые узловые стадии развития. Эти стадии характеризуются временным сокращением вариабельности формирующихся структур и увеличением согласованности развития, что может быть интерпретировано, как механизм сдерживания изменчивости развития. Поскольку такую картину мы наблюдаем для всех признаков, для которых

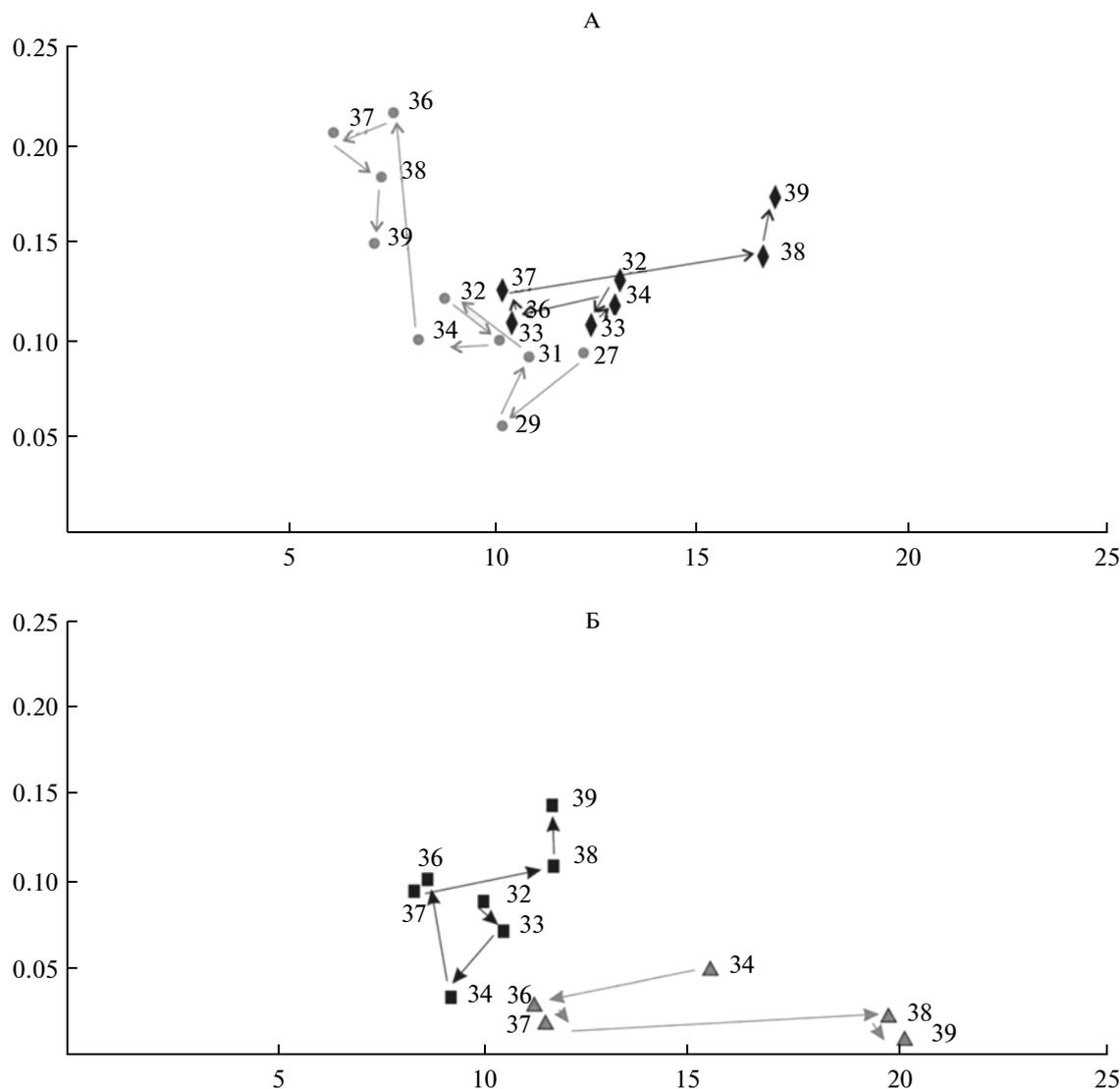


Рис. 5. Постайдовый анализ изменения значений обобщенных коэффициентов вариации ($Cv_{\text{общ}}$) (по оси X) от коэффициента детерминации (R^2) (по оси Y). Цифрами обозначены номера стадий. Рис. 5А для признаков: ● — *Lo, Lb, Lx, Wx* и ◆ — *DI, Vis, Wg, Dlg, W, H, R, eye*. Рис. 5Б для признаков: ■ — для признаков *DI, Wg, W, Dlg* и ▲ — для признаков *Vis, H, R, eye*.

мы можем выделить узловые стадии, то этот механизм, по-видимому, является универсальным для ростовых и дифференциальных процессов. Аналогичное увеличение морфологических корреляций было показано для *Danio rerio*, на стадиях, которые авторы интерпретировали как филотипические стадии развития (Schmidt, Starck, 2010).

Исследуемый период онтогенеза является насыщенным по эмбриологическим событиям. На стадии вылупления личинок из оболочек выделены узловые стадии для признаков, характеризующих общую длину зародыша, длину его хвостовой пластины и ширину ротовой присоски, с помощью которой личинки крепятся к галлертам. Со стадии расплывания становятся важными признаки, характеризующие ширину хвостовой пласти-

ны и размерные характеристики головы. Фактически, критический период для одних структур сменяется критическим периодом для других структур. Следовательно, становится понятным, почему для ряда признаков нами не были выделены узловые стадии.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дабаян Н.В., Слепцова Л.А. Травяная лягушка (*Rana temporaria* L.) // Объекты биологии. 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.
- Журавлева Н.Г. Влияние абиотических и биотических факторов среды на выживаемость эмбрионов и молоди рыб // Вестник МГТУ. 2009. Т. 12. № 2. С. 338–343.
- Светлов П.Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез // Вопросы цитологии и общей физиологии / Под ред. Полянского Ю.И. М.-Л., 1960. С. 263–285.
- Светлов П.Г. Физиология (механика) развития. Л.: Наука, Т. 1. Процессы морфогенеза на клеточном и организменном уровнях. 279 С. Т. 2. Внутренние и внешние факторы развития. 1978. 263 с.
- Северцова Е.А., Северцов А.С. Критические периоды в эмбриогенезе *R. arvalis*. Часть 1: линейные размеры зародыша // Онтогенез. 2011. в печати.
- Трифонов А.Н. Изменение жизнестойкости икры рыб при смене стадий развития и при адаптации к неблагоприятным воздействиям // Тезисы докладов на XVI годичной научной сессии Института. 16–19 марта 1954. Свердловск. № 2. С. 9–11.
- Chipman A.D. Variation, plasticity and modularity in anuran development // Zoology. 2002. V. 105. P. 97–104.
- Greulich K., Pflugmacher S. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure // Aquat. Toxicol. 2003. V. 19. № 65 (3). P. 329–336.
- Gross J.A., Johnson P.T., Prahl L.K., Karasov W.H. Critical period of sensitivity for effects of cadmium on frog growth and development // Environ. Toxicol. Chem., 2009. V. 28. № 6. P. 1227–1232.
- Hall B.K. Phylotypic stage or phantom: is there a highly conserved embryonic stage in vertebrates? // Trends Ecol. Evol. 1997. V. 12. P. 461–463.
- Mortensen A.S., Kortner T.M., Arukwe A. Thyroid hormone-dependent gene expression as a biomarker of short-term 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) exposure in European common frog (*Rana temporaria*) tadpoles // Biomarkers. 2006. V. 11. № 6. P. 524–537.
- Richardson M.K. Heterochrony and the phylotypic period // Dev. Biol. 1995. V. 172. P. 412–421.
- Richardson M.K., Minelli A., Coates M., Hanken J. Phylotypic stage theory // Tree. 1998. V. 13. № 4. P. 158.
- Richardson M.K. Vertebrate evolution: The developmental origins of adult variation // BioEssays. 1999. V. 21. P. 604–613.
- Schmidt K., Starck J.M. Developmental plasticity, modularity, and heterochrony during the phylotypic stage of the zebra fish, *Danio rerio* // J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol., 2010. V. 15. № 314(2). P. 166–78.
- Shenefelt R.E. Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment // Teratology. 1972. V. 5. P. 103–111.
- Slack J.M., Holland P.W., Graham C.F. The zootype and the phylotypic stage // Nature. 1993. V. 361. P. 490–492.
- 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.
- Waddington C.H. Genetic assimilation of an acquired character // Evolution. 1953. V. 7. P. 118–126.
- Waddington C.H. Principles of Embryology. Allen & Unwin, London, 1956.
- Wray G.A. Punctuated evolution of embryos. // Science. 1995. V. 267. P. 1115–1116.

Crucial Stages of Embryogenesis of *Rana arvalis*: Part 2. Development of Head Structures

E. A. Severtsova and A. S. Severtsov

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

Abstract—Analysis of the dynamics of variation in developing head structures of moor frog (*R. arvalis*) tadpoles has made it possible to reveal periods in which the limits of variation in relevant traits are narrowed. In the course of individual development, these so-called crucial periods for certain traits are followed by such periods for other traits. However, crucial stages for some head structures have not been revealed, which can be explained by a relatively short period of development considered in the study. Analysis of individual variation at later stages may provide the possibility to identify crucial periods for these structures.

Keywords: crucial period of development, variation, *Rana arvalis*.

УДК 591.392

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЧАСТИЧНОГО УДАЛЕНИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ БЛАСТОМЕРОВ В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ВЬЮНА *Misgurnus fossilis* L.

© 2011 г. Е. Г. Ивашкин¹*, В. Г. Черданцев²

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

*E-mail: veliger@ya.ru

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет
119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Поступила в редакцию 12.08.10 г.

Окончательный вариант получен 31.01.11 г.

Развитие зародышей вьюна успешно регулируется после удаления части цитоплазматического материала из одной клетки на стадиях 2-х или 4-х бластомеров или полного удаления одной или двух клеток на стадии 8–16-и бластомеров, причем регуляция складывается из двух фаз. С помощью цейтраферной съемки и морфометрического анализа показано, что в первой фазе происходит быстрое, в течение одного-двух клеточных циклов, и практически полное восстановление исходного соотношения объемов бластодиска и желточного мешка, а во второй фазе морфогенез модифицируется в соответствии с новыми особенностями строения зародыша, созданными операцией. Оставшаяся цитоплазма оперированного бластомера после нескольких этапов цитокинеза сливается с краевым желточным синцитием (перибластом), образующим на стадии бластулы заметное расширение на месте операции, которое становится местом формирования зародышевого щитка. По данным морфометрического анализа, восстановление относительного объема бластодермы у оперированных зародышей ведет к уменьшению величины активного натяжения границы раздела бластодермы и желтка и увеличению отношения поверхности бластодермы к ее объему в момент инициации эпиболии. В результате конвергенция клеток бластодермы к месту операции и оформление зародышевого щитка начинаются при меньшей степени эпиболии, чем в контроле.

Ключевые слова: эмбриогенез, костистые рыбы, вьюн, дробление, удаление бластомеров, регуляция, морфогенез, морфометрия.

Эволюционно устойчивой особенностью эмбриогенеза костистых рыб является ранняя сегрегация сначала желтка и цитоплазмы, а затем клеток, представляющих эмбриональную (бластодерма) и три экстраэмбриональных фракции — перидерму (клеточную оболочку), перибласт (желточный синцитий) и желточный мешок (Morgan, 1895; Oppenheimer, 1947; Игнатьева, 1979; Trinkaus, 1993). Сегрегация заходит так далеко, что клетки бластодермы не синтезируют собственных аминокислот, а получают их из желточного мешка путем активного транспорта. Из-за этого, в частности, изолированная от желтка бластодерма не может жить *in vitro* в солевом растворе без добавления питательной среды (Trinkaus, Drake, 1956).

Казалось бы, такой (меробластический) тип развития требует строгого соблюдения количественных пропорций эмбрионального и экстраэмбрионального материала, однако у костистых рыб соотношение объема цитоплазмы и желтка варьирует в чрезвычайно широких пределах. У лосося

объем бластодиска составляет 1/30, у хариуса — 1/25, сига — 1/8, ряпушки — 1/4, снетка — 1/3 объема желтка. Его увеличение всегда ведет к смещению формирования зародышевого кольца (ЗК) и закладки зародышевого щитка (ЗЩ) на более ранние стадии эпиболии — у лосося и форели ЗК и ЗЩ возникают, когда бластодерма покрывает 1/10–1/15 часть яйца, а у снетка — практически в момент завершения обрастания желтка (Мешков, Лебедева, 1977). При этом создается впечатление, что ответ на изменение соотношения объемов бластодиска и желтка детерминирован не только на генетическом, но и на эпигенетическом уровне, являясь следствием геометрии и механики самого морфогенеза (Черданцева, Черданцев, 1985; Черданцев, 2003).

На эту мысль, в частности, наводят опыты с удалением или, наоборот, инъекцией небольшого количества желтка в желточный мешок зародышей вьюна, так как уменьшение относительного объема желтка ускоряет, а увеличение замедляет эпибо-

лию (Корвин-Павловская и др., 1996, 2006; Слепцова и др., 2004). В этих опытах получается примерно такая же связь между уменьшением доли свободной от желтка цитоплазмы и сдвигом формирования ЗЩ на более ранние стадии эпиболии, какую мы наблюдаем на сравнительно-морфологическом уровне. Наконец, то же самое можно наблюдать, анализируя нормальную индивидуальную изменчивость морфогенеза вьюна (Неклюдова и др., 2007; Черданцев, неопубликованные наблюдения).

О том, что такая связь детерминирована на эпигенетическом уровне, можно говорить потому, что у костистых рыб эпиблия связана с пространственно-временным чередованием фаз утолщения и растяжения краевой зоны бластодермы. Задержка эпиболии в любой данной области делает ее центром конвергенции клеток, мигрирующих в краевую зону, что создает условия для формирования ЗЩ (Cherdantseva, Cherdantsev, 2006).

Это объясняет, каким образом (по крайней мере, в принципе) морфогенез бластодермы костистых рыб отвечает на уменьшение ее относительного объема, но вопрос, каким образом регулируется (и регулируется ли вообще) относительный объем цитоплазмы бластодиска до полной сегрегации эмбрионального и экстраэмбрионального материала, остается открытым. Начиная с классической работы Моргана (Morgan, 1895) на *Fundulus heteroclitus*, в многочисленных опытах было показано, что при удалении бластомеров на ранних стадиях дробления относительный объем бластодермы уменьшается, что, однако, мало препятствует формированию нормальных эмбриональных структур (Lewis, 1912; Hoadley, 1928; Nicholas, Oppenheimer, 1942; Oppenheimer, 1947). Единственным исключением являются опыты на золотой рыбке, в которых при удалении одного из первых двух бластомеров иногда развивались зародыши, лишенные осевых структур (Tung, Tung, 1944). У вьюна при удалении содержимого одного из первых двух бластомеров возможна полная регуляция развития (Корж, 1981).

Во всех этих опытах авторы фиксировали лишь их результат — наличие или отсутствие регуляции — почти не обращая внимания на то, какими путями он достигался. При отсутствии не только количественных данных, но и простых наблюдений за тем, что происходит непосредственно после операции, остается неясным, пытается ли зародыш восстановить исходный объем свободной от желтка цитоплазмы или же дальнейший морфогенез приспособляется к его новому, уменьшенному объему.

Ответ на этот вопрос является основной задачей этой работы. Первоначально мы предполагали, что при удалении цитоплазмы бластомеров относительный объем бластодермы уменьшится

очень сильно и регуляция будет состоять в изменении структуры морфогенетических движений клеток бластодермы применительно к новым условиям. Оказалось, однако, что регуляция является двухфазным процессом. В первой, относительно быстрой фазе, занимающей всего несколько первых циклов дробления, зародыш восстанавливает объем свободной от желтка цитоплазмы, близкий к ее исходному объему. Во второй, более медленной фазе, морфогенез адаптируется к изменению формы бластодермы, возникающему из-за перераспределения цитоплазмы между эмбриональной фракцией клеток и экстраэмбриональными фракциями зародыша. Двухфазный характер регуляции иллюстрирует общий принцип, согласно которому регуляция включает в себя не только возвращение на исходный путь развития, но и движение к одному и тому же результату разными путями (Черданцев, 2003).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Половые продукты самцов и самок вьюна *Misgurnus fossilis* L. получали с помощью стандартной методики (Костомарова, 1975). После оплодотворения развитие икры до необходимой стадии проходило в отстоянной прокипяченной воде при температуре от 18 до 21°C. Для проведения операций зародышей помещали в чашку Петри с 5 мл 1× раствора Гольтфретера. Экспериментальные манипуляции с зародышами проводили без их извлечения из желточной оболочки, ограничиваясь ее проколом над местом операции.

Цитоплазматический материал удаляли с помощью микроинъектора, имеющего в своей конструкции микровинт, регулирующий положение подпружиненного поршня, который, в свою очередь, ходит в заполненной водой шприце, согласно методике, описанной ранее (Слепцова и др., 1990б, 2004; Корвин-Павловская и др., 1996). Диаметр использованных в опыте микропипеток подбирали в соответствии с размером бластомеров, от 20 до 90 мкм.

Цитоплазму отсасывали до тех пор, пока бластомер не переставал выделяться над поверхностью желточной клетки. При этом допускалось удаление некоторого количества желтка. При операциях на стадиях 8-ми и 16-ти бластомеров клетки удаляли целиком, вместе с мембраной. Эксперименты проводили в следующих вариантах: удаление большей части цитоплазматического материала одной клетки на стадиях 2-х (серия 2) и 4-х бластомеров (серия 4), а также удаление одной краевой клетки на стадиях 8-ми (серия 8) и 16-и бластомеров (серия 16). Через 30 минут после операции зародышей переносили в отстоянную кипяченую воду.

Выживаемость в разных вариантах опыта (см. пояснения в тексте)

Вариант опыта	Всего зародышей	Кол-во зародышей, достигших стадии бластулы	Кол-во зародышей, достигших стадии личинки
2	175	117 (67%)	55 (31%)
4	225	191 (85%)	148 (66%)
8	70	61 (87%)	45 (64%)
16	35	32 (91%)	20 (57%)
контроль	244	234 (96%)	213 (87%)

Во всех экспериментальных сериях в качестве контроля использовали икру той же кладки, что и в соответствующем опыте.

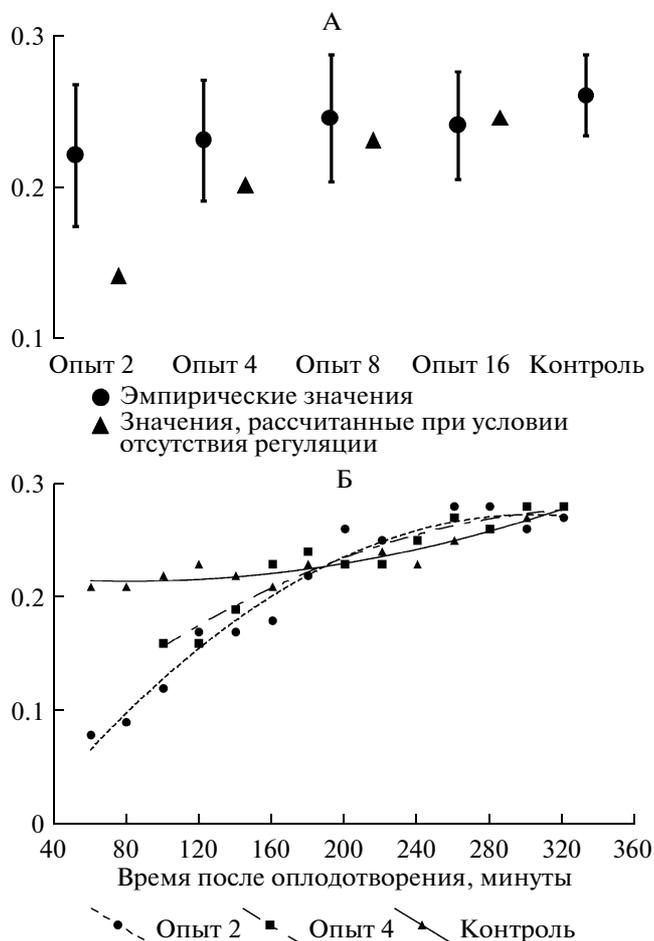


Рис. 1. Восстановление исходного соотношения объемов бластодиска и желтка в опытах с удалением цитоплазматического материала бластомеров: А – отношение объемов бластодермы и всего зародыша на стадии высокой бластулы в разных вариантах опыта (опыт 2, $n = 31$; опыт 4, $n = 37$; опыт 8, $n = 21$; опыт 16, $n = 24$; контроль, $n = 36$); Б – изменение относительных объемов бластодермы отдельных зародышей в вариантах опыта 2, 4 и контроле (на основе покадрового анализа цейтраферной съемки).

Операции и цейтраферную съемку проводили под стереомикроскопом МБС-10 и окулярной камерой SkopeTek DCM-130. Для последующей морфометрии зародыши фотографировали под стереомикроскопом Zeiss Stemi SV11 Apo. Изображения обрабатывали в программе Adobe Photoshop CS, а для морфометрического анализа использовали пакет программ Zeiss AxioVision. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ Statistica 6.0.

Расчет объемов бластодермы и желтка производили на основе измерения площадей оптических сагиттальных срезов зародышей. Под относительным объемом бластодермы понималось отношение ее сагиттальной площади к площади всего зародыша, а на более ранних стадиях развития, когда сегрегация цитоплазмы и желтка еще не закончена, – отношение сагиттальной площади свободной от желтка цитоплазмы бластомеров к площади всего зародыша.

Отношение площади бластодермы к ее объему оценивали на основе измерения периметра наружной поверхности бластодермы на сагиттальном оптическом срезе и ее площади.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего было проведено более 1500 микроопераций. Выживаемость зародышей зависела от стадии развития, на которой были произведена операция. Самой высокой была выживаемость в серии 4, а самой низкой – в серии 2 (табл. 1). Гибель зародышей на постгастрюляционных стадиях в серии 16 была несколько выше, чем в сериях 4 и 8.

На стадии высокой бластулы, когда у костистых рыб сегрегация бластодермы от экстраэмбриональных фракций (прежде всего, от перибласта) близка к завершению (Trinkaus, 1993), заметное уменьшение относительного объема бластодермы наблюдалось только в серии 2 (рис. 1А), и то, из-за очень большой изменчивости, оно было на грани статистической достоверности ($p = 0.043$).

Последовательное измерение относительного объема бластодермы у одних и тех же зародышей по данным цейтраферной видеосъемки (рис. 1Б) показывает, что в сериях 2 и 4 относительный объ-

ем цитоплазмы бластодиска возвращается близко к своей исходной величине в течение одного-двух циклов синхронных делений дробления. Из сравнения наклона индивидуальных траекторий в сериях 2 и 4 видно (см. рис. 1Б), что чем сильнее нарушено исходное отношение объемов цитоплазмы и желтка, тем быстрее оно восстанавливается.

В сериях 2 и 4, из-за того, что бластомеры глубоко утоплены в желток, практически невозможно удалить их целиком, вместе с клеточной мембраной, так как при этом повреждается не наружная мембрана данного бластомера, а наружный гелевый слой всего зародыша, что ведет к осмотическому шоку и быстрой, в течение нескольких минут, гибели. Только в тех случаях, когда поверхностная мембрана поврежденного бластомера затягивала нанесенное ей повреждение, он восстанавливал свой объем, всасывая в себя цитоплазму желточного мешка.

Потомки этого бластомера делились медленнее, чем потомки соседних, не затронутых операцией клеток (рис. 2А–2Г). В некоторых случаях замедление дробления также наблюдалось и у потомков клетки, прилегающей к поврежденному бластомеру.

Таким образом, выделяются две пары клеток, и потомки одной пары, не затронутой операцией, продолжают делиться в обычном ритме синхронных делений дробления, причем веретена пятого деления ориентируются не тангенциально, а по нормали к наружной поверхности, так что одна группа дочерних клеток формирует внутренний, а другая – наружный слой клеток бластодермы (см. рис. 2Г). Такая последовательность ориентации веретен воспроизводится в дроблении костистых рыб с большой точностью, так как выделение наружного и внутреннего слоя является первым шагом к сегрегации перидермы (клеточной оболочки) и собственно эмбриональных клеток (Черданцева, Черданцев, 1985; Trinkaus, 1993).

Бластомеры второй пары – оперированный, и тот, который теснее других с ним контактирует, – успевают за это время пройти всего один цикл дробления, образуя всего один слой клеток (см. рис. 2Г). В дальнейшем они уменьшаются в объеме и границы клеток становятся неразличимыми. На стадии высокой бластулы видно, что из материала этих бластомеров образуется краевой перибласт (желточный синцитий), отличающийся от нормального краевого перибласта только тем, что он вытянут вдоль меридиана желточного мешка (рис. 2Д). На стадии поздней бластулы он втягивается под край бластодермы (рис. 2Е) точно так же, как это делает нормальный перибласт при нормальном ходе развития (Trinkaus, 1993).

Один из часто наблюдавшихся вариантов образования дополнительного краевого перибласта в серии 2 представлен на рис. 2Ж–2М. Цитоплазма

поврежденного бластомера перестает дробиться, но остается живой и способной к активному сокращению своей поверхности (рис. 2Ж–2И). В результате она оказывается у края бластодермы (рис. 2К) и полностью сливается с нормальным краевым перибластом, а точка, в которой оказывается, соответствует точке окончательного замыкания окружности бластодермы (рис. 2Л–2М). Таким образом, вся бластодерма и часть перибласта возникают в этом случае из материала только одного из первых двух бластомеров, однако относительный объем бластодермы лишь немного ($p < 0.01$) меньше, чем у контрольных зародышей. Статистически достоверные различия абсолютных объемов желточного мешка и бластодермы вообще отсутствовали, так как эти величины варьировали сильнее, чем их отношение.

Непрерывное наблюдение за развитием после операции ($n = 8$) показало, что в 75% случаев место формирования дополнительного краевого перибласта совпадало с местом закладки зародышевого щитка (рис. 3А, 3Б).

При нормальном ходе развития геометрические центры системы бластодерма–перибласт и собственно бластодермы совпадают друг с другом и с анимальным полюсом яйца (Костомарова, 1975). У оперированных зародышей, из-за утолщения перибласта в оперированном секторе, его плоскость не совпадает с плоскостью бластодермы (рис. 3В). Угол отклонения главной оси симметрии бластодермы от главной оси симметрии краевого перибласта довольно значителен и равен $14.2 \pm 6.3^\circ$ ($n = 35$). Это означает, что в зоне утолщения краевого перибласта (как правило, это зона формирования зародышевого щитка) степень эпиболии меньше, чем на противоположном (вентральном) полюсе бластодермы.

Для анализа морфогенетических последствий удаления целых бластомеров мы объединили зародышей серий 8 и 16 с теми зародышами серии 4, у которых дробление оперированного бластомера полностью восстанавливалось. У всех таких зародышей, ввиду отсутствия дополнительного краевого перибласта, главные оси симметрии бластодермы и перибласта совпадали друг с другом, как при нормальном ходе развития. Мы анализировали их на стадии поздней бластулы, когда основным морфологическим критерием дорсо-вентральной полярности является различие величины краевого угла между наружной поверхностью краевой зоны бластодермы и поверхностью желточного мешка. На дорсальной стороне величина этого угла меньше, чем на вентральной стороне зародыша, что указывает на более высокую величину активного натяжения границы раздела бластодермы с желтком (Черданцева, Черданцев, 1985; Неклюдова и др., 2003; Cherdantseva, Cherdantsev, 2006).

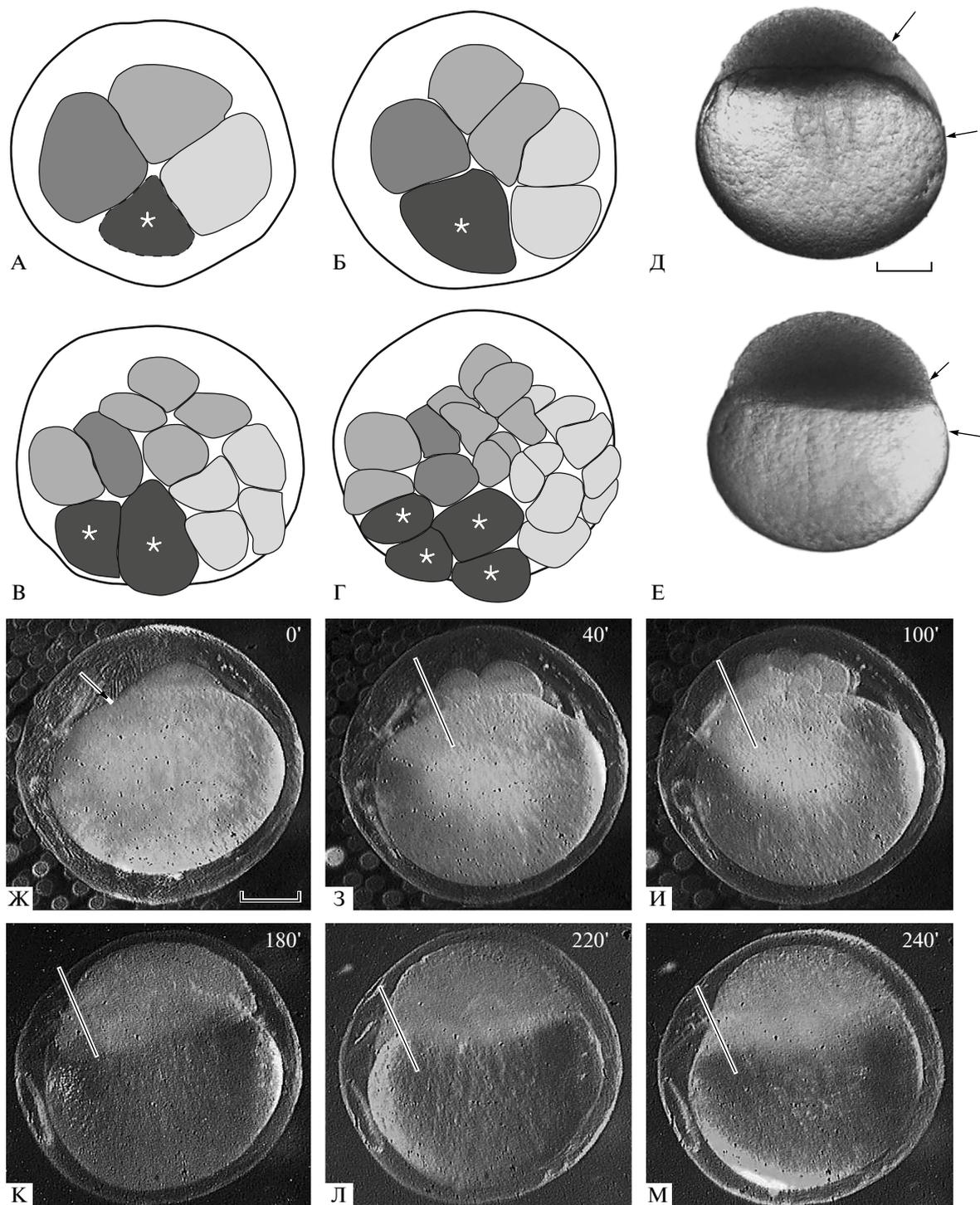


Рис. 2. Ранние последствия удаления цитоплазматического материала blastомеров: А–Г – прорисовка клеточных границ последовательных стадий дробления зародыша, оперированного на стадии 4-х blastомеров, вид с животного полюса. Видно отставание дробления blastомеров-потомков клеток, затронутых операцией. Оперированная клетка и ее потомки помечены звездочками; Д, Е – образование дополнительного краевого перибласта: Д – зародыш на стадии поздней blastулы, у которого ранее был удален цитоплазматический материал одного blastомера на стадии 2-х клеток; Е – нормальный зародыш. Стрелки – дополнительный перибласт и расширение перибласта на будущей дорсальной стороне; Ж–М – последовательные кадры центрифферной съемки зародыша, оперированного на стадии 2-х blastомеров. Время указано в минутах от момента операции. Стрелка – место операции, черта – потомки оперированной клетки, формирующие дополнительный перибласт. Масштабные планки на рисунке соответствуют 200 мкм.

В выделенной группе оперированных зародышей площадь контакта бластодермы с желточным мешком заметно больше (ср. рис. 4А, 4Б), а величина дорсального и вентрального краевого угла достоверно ($p < 0.01$) выше, чем у контрольных зародышей, причем на дорсальной стороне различия между опытом и контролем выражены сильнее (ср. рис. 4В, 4Г). Это означает, что у оперированных зародышей падает активное натяжение границы раздела бластодермы с желтком (возможно — активное натяжение перибласта, см. Черданцева, Черданцев, 1985).

Для этой же группы зародышей на сагиттальных оптических срезах мы измерили отношение периметра наружной поверхности бластодермы к ее площади, считая его показателем, характеризующим отношение площади поверхности бластодермы к ее объему. Небольшие, но все же статистически достоверные ($p < 0.01$) различия между опытом и контролем были получены для стадии 9, в момент инициации эпиболии, когда площадь поверхности раздела бластодермы с желтком начинает увеличиваться за счет ее изгиба (Неклюдова и др., 2003). Величина отношения периметра бластодермы к ее площади оказалась равной 0.029 ± 0.001 в контроле и 0.039 ± 0.002 в опыте — таким образом, в момент начала эпиболии отношение поверхности бластодермы к ее объему выше у оперированных зародышей.

По данным центрифферной съемки (см. рис. 2А–2Г), во всех экспериментальных сериях ЗЩ закладывался на более ранних этапах эпиболии. Из 36 зародышей, оперированных на стадии 4-х бластомеров, у 14 (39%) ЗЩ начинал оформляться тогда, когда окружность бластодермы находилась выше экваториальной плоскости зародыша (степень эпиболии меньше 40%). В контроле это было отмечено лишь для 6 из 20 зародышей (20%).

Как правило, более ранняя (относительно эпиболии) закладка ЗЩ была заметна на глаз (рис. 5А–5Г). Для количественной оценки соотношения хода эпиболии и формирования ЗЩ, мы выбрали коэффициент $E = (D - d)/H$, где D характеризует степень эпиболии бластодермы (расстояние от ее верхнего полюса до ее нижнего края), d — степень развития (меридиональную высоту) ЗЩ, H — абсолютный размер зародыша (рис. 5Д).

Различие величины этого коэффициента у оперированных зародышей серии 2 и контролем оказалось высоко достоверным ($p \ll 0.001$, $n = 20$). В опыте величина E было почти вдвое ниже (рис. 5Е), т.е. образование ЗЩ действительно начиналось при меньшей степени эпиболии бластодермы, чем у контрольных зародышей.

К этому следует добавить, что у оперированных зародышей ЗЩ очерчен гораздо более грубо и при его формировании наружная поверхность бластодермы гораздо сильнее изменяет (уменьшает) свою

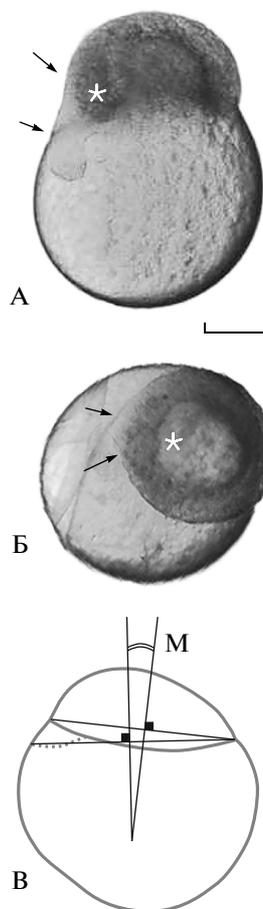


Рис. 3. Дополнительный перибласт: А–Б — дополнительный перибласт определяет место закладки ЗЩ. Зародыш, оперированный на стадии 2-х бластомеров, А — сагиттальный оптический срез, Б — вид с анимального полюса. Стрелки — дополнительный перибласт, звездочки — место образования ЗЩ. Масштабная планка на рисунке соответствует 200 мкм; В — схема измерения угла (М), на который поворачивается анимально-вегетативная ось при образовании дополнительного перибласта (пояснения в тексте).

кривизну, чем в контроле (ср. рис. 5В, 5Г). Это также говорит о “преждевременной” закладке ЗЩ.

ОБСУЖДЕНИЕ

То, что нормальный зародыш может развиваться, фактически, только из одного из первых двух бластомеров, как это происходило у нас в серии 2, само по себе не представляет ни особого интереса, ни, тем более, новизны. Во-первых, это уже было показано для выюна (Корж, 1981), а во-вторых, эквивалентность областей бластодермы костистых рыб и, как следствие, почти неограниченная способность развития к регуляции давно и хорошо известна (Morgan, 1895; Oppenheimer, 1979; Неклюдова и др., 2003).

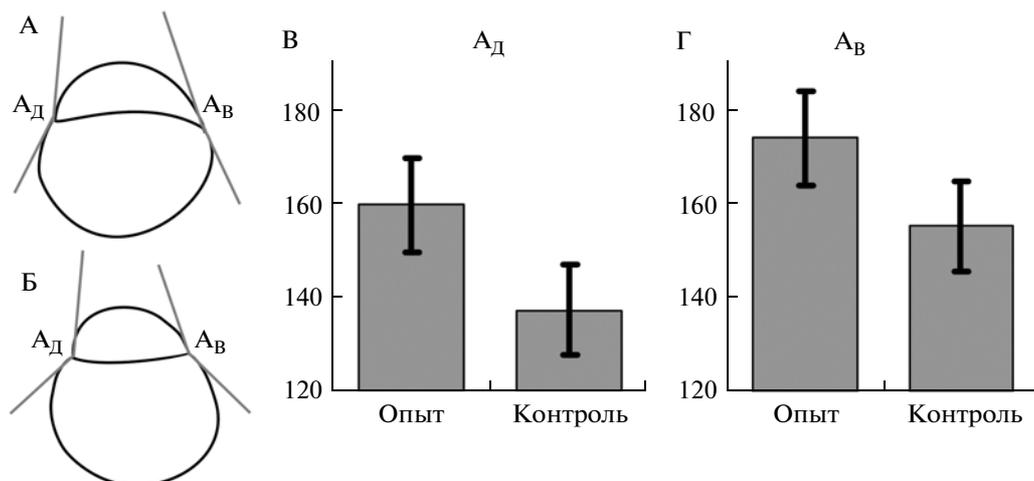


Рис. 4. Различия дорсальных и вентральных краевых углов на границе раздела бластодерма с желточным мешком: А–Б – схема измерений в опыте (А) и контроле (Б). A_d – краевой угол на дорсальной, A_v – на вентральной стороне зародыша, В, Г – различия средних значений дорсальных (В) и вентральных (Г) краевых углов в опыте 8 и контроле ($n = 20$).

Здесь можно только отметить, что регуляторная способность эмбриогенеза выюна, по-видимому, выше, чем у других изученных представителей костистых рыб, таких как *Fundulus* (Oppenheimer, 1979), *Carassius* (Tung, Tung, 1944), или *Brachidanio rerio* (Черданцева, Черданцев, 1985). Сравнение экспериментально-эмбриологических данных, полученных разными исследователями на разных объектах лишено смысла, но мы можем сравнить широту изменчивости нормального морфогенеза. Выюн является пока что единственным представителем костистых рыб, для которого показано, что многократное переопределение направления дорсо-вентральной оси зародыша входит в состав нормальной изменчивости его развития (Черданцева, Черданцев, 2007).

В этой работе мы пытались не просто констатировать возможность регуляции развития после удаления цитоплазмы blastомеров (серии 1, 4), или целых blastомеров (серии 8, 16), но и понять, каким, собственно, образом она происходит. Оказалось, что регуляция складывается из двух фаз: быстрой фазы, занимающей всего несколько циклов синхронных делений дробления, и медленной фазы, заканчивающейся уже во время гастрюляции.

Смысл и направление регуляций в этих двух фазах различны. В первой фазе зародыш стремится вернуть относительный объем blastодиска к его прежнему значению. Теоретически он может восстанавливаться за счет перехода в blastодиск цитоплазмы желточного мешка и за счет увеличения осмотического давления, причем эти возможности скорее дополнительные, чем альтернативные. Если бы давление внутри blastодермы и желточного мешка не менялось, то трудно было бы объяснить отсутствие статистически достоверных различий

между абсолютным объемом желточного мешка в контроле и опыте. Вопрос нуждается в дальнейшем исследовании, как и вообще вопрос о механизмах, регулирующих внутреннее давление и соотношение объема разнородных фракций цитоплазмы.

Впервые образование дополнительного перибласта было описано Е.М. Черданцевой (1983) в опытах с умеренным (порядка 10g) центрифугированием зародышей данио (*Brachidanio rerio*) во время раннего дробления. Один из краев blastодиска сильно растягивался в тангенциальной плоскости, цитотомия прекращалась и продолжались только деления ядер с образованием синцития, в котором желтка было больше, чем собственно в blastомерах. У края blastомера возникал вытянутый в меридиональном направлении язык “искусственного”, как он был назван в цитируемой работе, перибласта, который затем втягивался внутрь, и именно в этом месте развивался ЗЩ. Описанная последовательность событий до мелочей совпадает со сделанными в нашей работе наблюдениями и позволяет предположить, что именно увеличения отношения концентрации желтка к концентрации свободной от него цитоплазмы является основной причиной образования дополнительного перибласта. То же самое может относиться и к образованию краевого перибласта при нормальном ходе развития (Черданцева, Черданцев, 1985).

Вторая (медленная) фаза регуляции является, по сути дела, “регуляцией последствий регуляции”, так как морфогенез вынужден приспособляться к последствиям тех усилий, которые были затрачены на регуляцию в ее первой фазе. Здесь уже нельзя говорить о возвращении на исходный путь развития – напротив, новые морфологические особенности, возникающие в первой фазе

регуляции, служат для пространственно-временной разметки дальнейших морфогенетических движений.

В первую очередь это относится к образованию ЗЩ. При нормальном ходе развития он чаще всего образуется у того края бластодермы, форма которого в наибольшей степени отклоняется от сферической формы (Cherdantseva, Cherdantsev, 2006). В этой зоне возникают активные механические напряжения, избыток которых компенсируется стягиванием к ней (конвергенцией) клеток бластодермы. Скорость эпиболии одинакова для всей окружности бластодермы, анимально-вегетативная ось ориентирована перпендикулярно границе раздела бластодермы с желтком мешком, но соотношение активных и пассивных напряжений на противоположных полюсах бластодермы различно, что и определяет дорсо-вентральную полярность (подробнее см. Cherdantseva, Cherdantsev, 2006).

У тех оперированных зародышей, у которых в первой фазе регуляции образуется дополнительный краевой перибласт, поверхность раздела бластодермы с желтком еще до начала гаструляции скошена по отношению к анимально-вегетативной оси (см. рис. 3В). Поскольку один из краев бластодермы находится на более высокой широте яйца, граница бластодермы не вписывается в единую окружность, и для минимизации геометрических различий ее кривизна на более высокой широте должна уменьшаться. Это, в свою очередь, становится причиной активной миграции клеток в эту зону, что, как и при нормальном ходе развития, ведет к образованию ЗЩ. Нельзя сказать, что утолщение краевого перибласта индуцирует образование ЗЩ в том смысле, в каком это слово обычно употребляется в эмбриологии. Оно просто создает различия кривизны, а значит – различия величины активного натяжения границы раздела бластодермы с желтком на ее противоположных полюсах. Движение клеток в сторону поверхности с повышенным активным натяжением увеличивает их локальную концентрацию, так что внутреннее давление под этой поверхностью возрастает, компенсируя избыток ее активного натяжения.

Судя по величине отношения периметра наружной поверхности бластодермы к ее площади на сагиттальных оптических срезах, в момент начала эпиболии оперированные зародыши имеют более высокое отношение площади бластодермы к ее объему. Это хорошо согласуется с ростом величины краевых углов на границе раздела бластодермы с желтком (ср. рис. 4А, 4Б), так как оба факта говорят о падении активного натяжения поверхности бластодермы во второй фазе регуляции.

Эпиболия всегда связана с увеличением площади поверхности, разделяющей бластодерму и желточный мешок (Trinka, 1993). Нормальная гео-

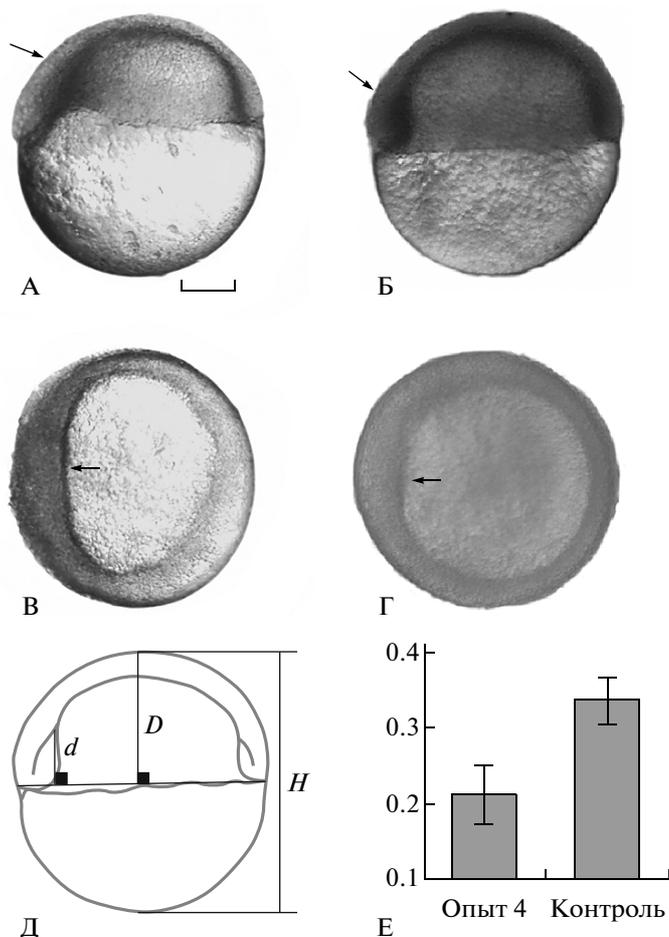


Рис. 5. Изменение связи между эпиболией и формированием ЗЩ после удаления цитоплазматического материала: А, В – зародыш после удаления содержимого одной клетки на стадии 4-х бластомеров, Б, Г – контроль; А, Б – сагиттальные оптические срезы, В, Г – вид с анимального полюса, стрелки – место закладки ЗЩ; Д – схема морфометрических измерений (пояснения в тексте), Е – различия величины коэффициента *E*, характеризующего соотношение темпов эпиболии и формирования ЗЩ у контрольных зародышей и зародышей, оперированных на стадии 4-х клеток (*n* = 20).

метрия системы бластодерма–желток позволяет этой поверхности увеличивать свою площадь, оставаясь плоской, так как краевые углы на границе раздела достаточно далеки от 180°. Иначе обстоит дело с оперированными зародышами, у которых лимит на увеличение площади поверхности раздела без изменения ее формы практически исчерпан. В опыте зародыши оказываются гораздо ближе к порогу, за которым дальнейший рост площади плоской поверхности раздела уже невозможен, и она, для того чтобы продолжать обрастание желтка, должна выгнуться в сторону наружной поверхности. В этой фазе эпиболии поверхность раздела может увеличивать свою площадь даже при неподвижности краевых точек этой поверхности. Та-

ким образом, в случаях, когда удаление бластомеров не ведет к изменению способа формирования перибласта, его основным последствием во второй фазе регуляции является преждевременный (по сравнению с обычным ходом эпиболии) изгиб поверхности раздела, геометрически отделяющий краевую зону бластодермы от ее центральной части (подробнее см. Неклюдова и др., 2003).

“Преждевременность” изгиба означает, что он происходит при меньшей разности натяжения наружной и внутренней поверхности бластодермы, величина которого определяет скорость радиальной интеркаляции клеток (Неклюдова и др., 2003). Радиальная интеркаляция является одной из причин формирования из клеток бластодермы полноценного эпителиального пласта, и именно этот процесс должен замедляться у оперированных зародышей, у которых, действительно, упаковка клеток на оптическом срезе бластодермы кажется более рыхлой.

Таким образом, настоящей причиной сдвига формирования ЗЩ на более раннюю стадию развития является замедление эпиболии, а точнее изменение относительного вклада в нее двух процессов – пассивного растяжения поверхности бластодермы и активного увеличения ее площади за счет радиальной интеркаляции клеток. В опыте вклад пассивного растяжения гораздо выше, что хорошо соответствует визуальному впечатлению, возникающему при сравнении формы наружной поверхности зародышей в опыте и контроле.

Полученные данные говорят о том, что давно описанная для костистых рыб эволюционно устойчивая связь между относительным объемом бластодермы и стадией эпиболии, на которой закладывается ЗЩ, является прямым и неизбежным следствием геометрии и механики эпиболии. Об этом говорит практически полный параллелизм между таксономическими различиями и различиями, которые можно вызвать путем экспериментального изменения (уменьшения) относительного объема бластодермы. В обоих случаях смещение формирования ЗЩ на более ранние этапы эпиболии объясняется ее задержкой из-за увеличения доли вклада в эпиболию пассивного растяжения поверхности бластодермы. В группах с меньшим относительным объемом бластодермы наблюдается такой же преждевременный изгиб поверхности раздела бластодермы с желтком, какой мы наблюдали у оперированных зародышей. Отбору не нужно заботиться о том, чтобы приспособить морфогенез к новым начальным условиям, поскольку все нужные изменения не выходят за пределы нормы реакции самого морфогенеза, которую, как мы видим, не следует отождествлять с генетической нормой реакции.

Авторы выражают сердечную признательность сотрудникам Биологического факультета МГУ

им. М.В. Ломоносова Елене Георгиевне Корвин-Павловской, Людмиле Алексеевне Слепцовой и Елене Михайловне Черданцевой за помощь и советы в работе. Работа была поддержана грантом РФФИ № 04-08-00057.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Игнатъева Г.М.* Ранний эмбриогенез рыб и амфибий. М.: Наука. 1979, 175 с.
- Корвин-Павловская Е.Г., Неклюдова И.В., Слепцова Л.А. и др.* Исследование регуляционных процессов в раннем развитии вьюна при уменьшении объема желтка зиготы // Вестн. Моск. Ун-та. 1996. Сер. 16, Биология. № 4. С. 32–36.
- Корвин-Павловская Е.Г., Неклюдова И.В., Белоусов Л.В.* Кинетика реакции поверхности желточной клетки на точечный прокол и механическую деформацию // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 2. С. 100–108.
- Корж В.П.* Микроинъекции макромолекул и митохондрий в яйцо вьюна // Онтогенез. 1981. Т. 12. № 2. С. 187–192.
- Костомарова А.А.* Вьюн // Проблемы биологии развития. Объекты биологии развития. М.: Наука. 1975. С. 308–323.
- Мешков М.М., Лебедева О.А.* Видовая специфика темпа индивидуального развития лососевидных рыб (Salmonoidei) // Эволюция темпов индивидуального развития животных. М.: Наука. 1977. С. 200–215.
- Неклюдова И.В., Корвин-Павловская Е.Г., Черданцев В.Г.* Дорсо-вентральные различия морфологических потенциалов бластодермы вьюна в опытах с эксплантацией ее фрагментов // Онтогенез. 2003. Т. 30. № 5. С. 353–361.
- Неклюдова И.В., Корвин-Павловская Е.Г., Черданцев В.Г.* Пространственно-временная динамика морфогенетических потенциалов бластодермы в раннем морфогенезе вьюна // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 5. С. 355–371.
- Слепцова Л.А., Дабагян Н.В., Бенимов А.О.* Рыбы. Вьюн // Пособие к большому практикуму по эмбриологии. Ч. 1. Под ред. Белоусова Л.В., Дабагян Н.В., Чунаевой М.З. М.: Изд-во МГУ. 1990. С. 5–34.
- Слепцова Л.А., Иванова Е.Е., Голиченков В.А.* Развитие икринок вьюна после экспериментального увеличения клеточной массы дорсальной и вентральной областей бластодерм // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 3. С. 1–8.
- Черданцев В.Г.* Морфогенез и эволюция. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2003. 360 с.
- Черданцева Е.М.* Опыты с центрифугированием оплодотворенных яиц *Brachidanio rerio* // Биол. авиакосм. мед. 1983. Т. 6. № 3. С. 21–25.
- Черданцева Е.М., Черданцев В.Г.* Детерминация дорсо-вентральной полярности у костистой рыбы *Brachidanio rerio* // Онтогенез. 1985. Т. 16. № 4. С. 270–280.
- Черданцева Е.М., Черданцев В.Г.* Этапы формирования дорсовентральной полярности в раннем морфогенезе костистых рыб // Клеточные, молекулярные и

- ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ МОРФОГЕНЕЗА. М.: КМК. 2007. С. 170–172.
- Cherdantseva E.M., Cherdantsev V.G.* Geometry and mechanics of teleost gastrulation and the formation of primary embryonic axes // *Int. J. Devel. Biol.* 2006. V. 50. P. 157–168.
- Hoadley L.* On the localization of developmental potencies in the embryo of *Fundulus heteroclitus* // *J. Exp. Zool.* 1928. V. 52. № 1. P. 7–44.
- Lewis W.H.* Experiments on localization in the eggs of a teleost fish (*Fundulus heteroclitus*) // *Anat. Rec.* 1912. V. 6. № 1. P. 1–6.
- Morgan T.H.* The formation of the fish embryo // *J. Morphol.* 1895. V. 10. № 2. P. 419–472.
- Nicholas J.S., Oppenheimer J.M.* Regulation and reconstitution in *Fundulus* // *J. Exp. Zool.* 1942. V. 90. № 1. P. 127–157.
- Oppenheimer J.M.* Organization of the teleost blastoderm // *Quart. Rev. Biol.* 1947. V. 22. № 2. P. 105–118.
- Oppenheimer J.M.* Fifty years of *Fundulus* // *Ibid.* 1979. V. 54. P. 385–395.
- Trinkaus J.P.* The yolk syncytial layer of *Fundulus*: Its origin and history and its significance for early development // *J. Exp. Zool.* 1993. V. 265. P. 258–274.
- Trinkaus J.P., Drake J.W.* Exogenous control of morphogenesis in isolated *Fundulus* blastoderms by nutrient chemical factors // *J. Exp. Zool.* 1956. V. 132. № 2. P. 311–347.
- Tung T.C., Tung W.F.W.* The development of egg fragments, isolated blastomeres and fused eggs // *Proc. Zool. Soc. L.* 1944. V. 114. P. 46–64.

Morphogenetic Consequences of Partial Removal of Blastomere Cytoplasm during Early Embryonic Development of the Loach, *Misgurnus fossilis* L.

E. G. Ivashkin^a and V. G. Cherdantsev^b

^a*Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*
e-mail: veliger@ya.ru

^b*Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

Abstract—The development of loach embryos is successfully regulated (normalized) after partial removal of the cytoplasm from one blastomere at the two- or four-cell stage or complete removal of one or two blastomeres at the stage of 8–16 cells. Using time-lapse video imaging and morphometric analysis, it has been shown that this regulation is a two-stage process. At the first stage, the ratio between the volumes of the blastodisk and yolk sac is rapidly (within one or two cell cycles) restored almost to the initial level; at the second stage, morphogenesis of the embryo is modified according to its new structural features acquired after the operation. After several rounds of cytokinesis, the cytoplasm remaining in the operated blastomere fuses with the marginal yolk syncytium (periblast), which at the blastula stage forms a distinct extension at the operation site. This extension marks the site of embryonic shield formation. The results of morphometric analysis show that restoration of the initial blastoderm volume in operated embryos leads to a reduction of active tension at the blastoderm–yolk boundary and an increase in the ratio of blastoderm surface to its volume at the moment of epiboly initiation. As a result, the convergence of blastoderm cells to the operation site and the embryonic shield formation begin at a lesser degree of epiboly, compared to the control.

Keywords: embryonic development, teleost fishes, loach, cleavage, blastomere removal, regulation, morphogenesis, morphometry.

УДК 577.25

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТРАНСМИТТЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РАННЕМ РАЗВИТИИ МОРСКОГО ЕЖА *Paracentrotus lividus*

© 2012 г. Д. А. Никишин, М. Н. Семенова, Ю. Б. Шмуклер

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: yurishmukler@yahoo.com

Поступила в редакцию 16.08.11 г.

Окончательный вариант получен 11.01.12 г.

Известно, что нейротрансмиттеры, в т.ч. серотонин и ацетилхолин, выполняют целый ряд донервных функций в раннем развитии морских ежей. Для выявления конкретных рецепторных компонентов, вовлеченных в эти процессы, был проведен анализ баз данных, и среди EST-клонов, полученных из ранних зародышей *Paracentrotus lividus*, выявлены нуклеотидные последовательности, гомологичные серотониновому рецептору 4 типа и α_6 - и α_{10} -субъединицам никотинового холинорецептора. Экспрессия этих транскриптов в раннем развитии продемонстрирована методом ОТ-ПЦР. Эти результаты являются первым молекулярно-биологическим свидетельством экспрессии рецепторов серотонина и ацетилхолина в раннем развитии морских ежей.

Ключевые слова: серотониновый рецептор, никотиновый холинорецептор, морские ежи, раннее развитие.

В истории изучения эмбриональных функций нейротрансмиттеров ацетилхолин (АХ) — первый, чье присутствие было обнаружено в гаметах и ранних зародышах (Numanói, 1953). Единственное объяснение этому нетривиальному для той поры факту, выдвинутое его открывателем, состояло в том, что этот нейротрансмиттер запасен впрок для реализации функций на более поздних стадиях развития. Эта неудовлетворительная по многим соображениям гипотеза, особенно если учесть обнаружение в ранних зародышах ацетилхолинэстеразы (Piomboni et al., 2001), долгое время оставалась единственной.

Систематические исследования эмбриональных функций нейротрансмиттеров, начатые Бузниковым и его сотрудниками, продемонстрировали участие этих веществ в ряде процессов раннего развития, в частности, в регуляции клеточного цикла, контроле состояния цитоскелета и межбластомерных взаимодействиях (Бузников, 1967; Vuznikov et al., 1996), существуют также данные об участии серотонина в установлении лево-правой асимметрии зародышей (Fukumoto et al., 2005). Специфический эмбриостатический эффект антагонистов АХ был показан на зародышах морских ежей (Бузников, 1967), а затем подтвержден на зародышах шпорцевой лягушки (Shmukler et al., 1986). В последнем случае механизм, вероятно, опосредован мускариновыми холинорецепторами (м-ХР). Позже были найдены и эффекты, связанные с никотиновыми холинорецепторами (н-ХР)

поверхностной мембраны зародышей морских ежей (Vuznikov et al., 1997).

Параллельно в лаборатории К. Фалуджи с помощью эмбриофизиологических и иммунохимических методов были обнаружены как м-, так и н-ХР в гаметах морского ежа (Falugi, Prestipino, 1989; Falugi, 1993, см. также Falugi et al., in press). Однако до сих пор нет молекулярно-биологических доказательств экспрессии холинорецепторов в раннем развитии морских ежей. Парадоксально, что также отсутствуют соответствующие данные относительно серотонергической системы — наиболее изученной у зародышей морских ежей, являвшихся основным объектом исследования донервных функций нейротрансмиттеров. Данная работа призвана заполнить этот пробел.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение гамет средиземноморского морского ежа *Paracentrotus lividus* (о. Кипр), искусственное оплодотворение и инкубация зародышей проводились стандартными методами (см. Vuznikov, Podmarev, 1990). Зародыши (100 мкл) фиксировали в 1 мл RNAlater (Ambion, США), тотальную РНК выделяли гуанидинтиоцианатным методом с помощью TRI Reagent (Sigma, США) и обрабатывали ДНКазой I (Fermentas, США) по протоколам фирм производителей. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре BioPhotometer (Eppendorf, Германия). 1 мкг РНК использовали для обратной

транскрипции, проведенной с помощью набора Синтез первой цепи кДНК (рендом) (Силекс, Россия) в 25 мкл реакционной смеси по протоколу производителя. ПЦР проводили на амплификаторе MJ Mini (BIO RAD, США) с использованием 1 мкл кДНК, 10 пмоль специфических олигонуклеотидов (Литех, Россия) и набора Амплификация ДНК с Colored Taq полимеразой (Силекс, Россия) по протоколу фирмы производителя. Параметры амплификации: денатурация 30 с при 95°C, отжиг 30 с при $T_{отж}$, элонгация 30 с при 72°C, 30 циклов. Анализ продуктов проводили с помощью агарозного гель-электрофореза и системы детекции Gel Doc XR (BIO-RAD, США). Для исключения ложноположительного результата проводили отрицательные контроли – ПЦР без матрицы и ПЦР без обратной транскрипции. В качестве положительного контроля использовали ген актина.

Специфические олигонуклеотиды подбирали в программе Lasergene PrimerSelect (DNASTar, США): актин (AM566072) прямой 5'-GAGAC-GAGGCCAGAGCAAGAGA-3', обратный 5'-CAGCGGTGGTGGTCAAAGAGTAGC-3', длина продукта 450 пн, $T_{отж}$ 60°C; н-ХР- α_6 (AM219455) прямой 5'-ACTTCGCACCCGCCAACC-3', обратный 5'-GAGCCAAAAGCCTATCAGCATCAG-3', длина продукта 164 пн, $T_{отж}$ 56°C; н-ХР- α_{10} (AM596500) прямой 5'-ATTGATATGGAC-GAGAAAAACC-3', обратный 5'-CATACCGCT-GAAACCACTGT-3', длина продукта 189 пн, $T_{отж}$ 50°C; 5-НТ₄ (AM600436) прямой 5'-ATGCCGGAT-GAGACCAATACCA-3', обратный – 5'-GGCCAG-GCTGACCACGAA-3', длина продукта 219 пн, $T_{отж}$ 56°C.

Нуклеотидные последовательности из международных баз данных NCBI Nucleotide и EST анализировали средствами NCBI BLAST.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для выявления рецепторов, экспрессирующихся в раннем развитии *P. lividus*, средствами BLAST (NCBI) была проанализирована база данных EST (*P. lividus*). С помощью алгоритма tblastx был проведен поиск в базе данных нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки, гомологичные человеческому никотиновому рецептору (α_7 -субъединица н-ХР). Из множества EST клонов, имеющих гомологию с этой последовательностью, были отобраны клоны, полученные из яиц или ранних зародышей (клоны, обозначенные EGG или CLEB). Сравнение этих последовательностей выявило, что они являются вариантами двух последовательностей: AM219455 и AM596500, которые, как показал анализ базы данных мРНК *Strongylocentrotus purpuratus* методом tblastx, кодируют белки, гомологичные белкам ХР_001193674 и ХР_001192769, сходным с α_6 - и α_{10} -субъединицами

н-ХР-рецептора (н-ХР- α_6 и н-ХР- α_{10}), соответственно (рис. 1А).

Выявление экспрессии рецепторов серотонина производили иным способом. С помощью алгоритма blastn в базе данных EST (*P. lividus*) был проведен поиск нуклеотидных последовательностей, гомологичных известным последовательностям рецепторов серотонина *S. purpuratus*. Был найден один EST клон, AM600436, имеющий гомологию с серотониновым рецептором и полученный из ранних зародышей. Кодируемая им аминокислотная последовательность обладает значительной гомологией с гипотетическим белком LOC589531 *S. purpuratus* (рис. 1А). Анализ аминокислотной последовательности LOC589531 методом blastp показал, что он является семидоменным рецептором, сопряженным с G-белком (GPCR) и имеет наибольшую гомологию с рецепторами серотонина 4 типа (5-НТ₄) млекопитающих (рис. 1Б).

Таким образом, анализ баз данных выявил три последовательности, которые предположительно экспрессируются на ранних стадиях эмбрионального развития, и кодируют белки, гомологичные α_6 - и α_{10} -субъединицам н-ХР и 5-НТ₄-рецептору.

Для экспериментальной проверки этих результатов к отобраным последовательностям были подобраны специфические олигонуклеотиды и проведен ОТ-ПЦР анализ экспрессии этих последовательностей в раннем эмбриогенезе *P. lividus*. Библиотеки кДНК для проведения ПЦР были получены из неоплодотворенных яйцеклеток, а также на стадиях зиготы, двух бластомеров, мезенхимной бластулы и призмы. Результаты показаны на рис. 2. Продукты ПЦР ожидаемой величины были получены во всех пробах и для всех генов, в том числе и для контрольного гена актина. Таким образом, нами показано, что в раннем эмбриогенезе морского ежа *P. lividus* действительно экспрессируются мРНК, кодирующие белки, гомологичные α_6 - и α_{10} -субъединицам н-ХР и 5-НТ₄.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные об экспрессии в раннем эмбриогенезе морского ежа мРНК метаболитного рецептора 5-НТ₄, а также субъединиц н-ХР с некоторыми оговорками соответствуют ранее накопленным сведениям. Действительно, на ранних зародышах морских ежей показано, что антагонисты серотонина специфически блокируют деления дробления (Бузников, 1967), а их эмбриостатическое действие ослабляется добавлением дибутирил-цАМФ (Шмуклер и др., 1984). Экзогенный серотонин вызывает повышение внутриклеточного уровня цАМФ (Садокова, 1989). В клетках ранних зародышей морского ежа иммуноцитохимически обнаружена активность аденилатциклазы, локализованная после оплодо-

творения в эндоплазматическом ретикулуме, а во время первого деления дробления — в микроворсинках контактной области, при этом наиболее выраженная реакция наблюдается в местах наибольшего сближения бластомеров (Ростомян и др., 1985). Обнаружение экспрессии мРНК 5-НТ₄ делает этот рецептор весьма вероятным кандидатом на ключевую роль в серотонергических процессах раннего эмбриогенеза морского ежа, поскольку этот тип рецептора способен активировать аденилатциклазу (Barnes, Sharp, 1999).

Экспрессия мРНК α_6 - и α_{10} -субъединиц на всех исследованных в данной работе стадиях развития указывает на возможность присутствия н-ХР у ранних зародышей морского ежа *P. lividus*, что соответствует иммуногистохимическим данным (Falugi, 1993). Именно эти рецепторы, вероятно, обеспечивают эмбриостатический эффект антагонистов н-ХР на “форболовой модели” — блокаду раннего развития морских ежей, происходящую предположительно через рецепторы поверхностной мембраны (Buznikov et al., 1997).

В то же время в опытах с использованием пэч-кламп (в конфигурации whole-cell) на дробящихся зародышах *P. lividus* никотин и агонисты н-ХР эпибатидин и метилкарбамилхолин лишь в некоторых случаях вызывали небольшие входящие токи, тогда как агонисты 5-НТ₃-рецептора (5НТQ, SR 57277A, квивазин, метилквивазин) стабильно индуцировали входящие токи, наиболее выраженные в период формирования борозд первого и второго делений дробления, и при микроапликации, и при добавлении лиганда в экспериментальную камеру (Shmukler et al., 2008). Причина такой ситуации может заключаться в своеобразии рецепторов зародышей морских ежей, которые, вероятно, существенно отличаются по чувствительности к лигандам, разработанным и протестированным на млекопитающих. Кроме того, лиганды 5-НТ₃-рецепторов обладают относительно высокой эффективностью в отношении 5-НТ₄-рецепторов (Glenpon et al., 2004). Это удивительно, поскольку 5-НТ₄-рецептор является метаботропным, тогда как 5-НТ₃-рецептор — канальный ионотропный и по структуре сходен с н-ХР. Сходство 5-НТ₃- и н-ХР весьма значительно, в частности, аминокислотная последовательность 5-НТ_{3A}-рецептора крысы (P35563) совпадает с последовательностью α_{10} -субъединицы н-ХР крысы (NP_072161) на 89%, а с последовательностью предшественника α_6 -субъединицы (NP_476532) на 96%.

В заключение отметим, что решение вопроса о природе эмбриональных нейротрансмиттерных рецепторов у ранних зародышей морских ежей, наличие которых подтверждено теперь не только фармакологическими и электрофизиологическими, но и молекулярно-биологическими методами, требует дальнейших исследований. В частности,

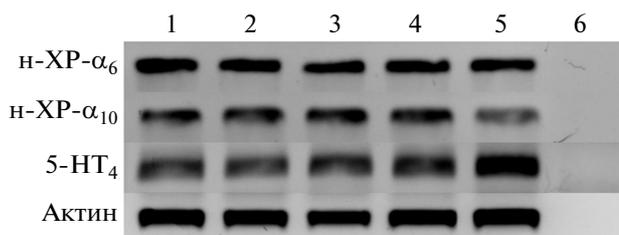


Рис. 2. ОТ-ПЦР анализ экспрессии трансмиттерных рецепторов в раннем развитии *P. lividus*.

Стадии развития: 1 — неоплодотворенная яйцеклетка; 2 — зигота; 3 — два бластомера; 4 — мезенхимная бластула; 5 — призма, 6 — негативный контроль (ПЦР без матрицы).

необходимо получение полной последовательности рецепторов, а также изучение экспрессии соответствующих белков.

Благодарности. Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-00144 и № 11-04-01469. Авторы благодарят сотрудников лаборатории биофизики развития кафедры эмбриологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, а также лаборатории молекулярно-генетических основ онтогенеза ИБР РАН за большую методическую помощь в проведении данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. М.: Наука, 1967. 265 с.
- Ростомян М.А., Абрамян К.С., Бузников Г.А., Гусарева Э.В. Электронно-цитохимическое выявление аденилатциклазы у ранних эмбрионов морского ежа // Цитология. 1985. Т. 27. С. 877–881.
- Садокова И.Е. Участие серотонина в регуляции уровня циклических нуклеотидов у ранних зародышей морских ежей // Онтогенез. 1989. Т. 20. № 1. С. 63–69.
- Шмуклер Ю.Б., Бузников Г.А., Григорьев Н.Г., Мальченко Л.А. Влияние циклических нуклеотидов на чувствительность ранних зародышей морских ежей к цитотоксическим нейрофармакологическим препаратам // Бюлл. эксп. биол. мед. 1984. Т. 97. № 3. С. 354–355.
- Barnes N.M., Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function // Neuropharmacology. 1999. V. 38. P. 1083–1152.
- Buznikov G.A., Shmukler Yu.B., Lauder J.M. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? // Cell. Molec. Neurobiol. 1996. V. 16. № 5. P. 532–559.
- Buznikov G.A., Koikov L.N., Shmukler Yu.B., Whitaker M.J. Nicotine antagonists (piperidines and quinuclidines) reduce the susceptibility of early sea urchin embryos to agents evoking calcium shock // Gen. Pharmacol. 1997. V. 29. № 1. P. 49–53.
- Buznikov G.A., Podmarev V.G. Sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis*, *S. nudus*, *S. intermedius* // Animal

- species for developmental studies. V. 1. Invertebrates. N.-Y.—London: Consultants Bureau, 1990. P. 253–285.
- Falugi C. Localization and possible role of molecules associated with the cholinergic system during “non-nerve” developmental events // *Eur. J. Histochem.* 1993. V. 37. № 4. P. 287–294.
- Falugi C., Prestipino G. Localization of putative nicotinic cholinergic receptors in the early development of *Paracentrotus lividus* // *Cell Mol. Biol.* 1989. V. 35. № 2. P. 147–161.
- Falugi C., Diaspro A., Ramoino P., Russo P., Aluigi M.G. The sea urchin, *Paracentrotus lividus*, as a model to investigate the onset of molecules immunologically related to the α -7 subunit of nicotinic receptors during embryonic and larval development // *Current Drug Targets*, in press.
- Fukumoto T., Kema I.P., Levin M. Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. № 9. P. 794–803.
- Glennon R.A., Dukat M., Westkaemper R.B. Serotonin receptor subtypes and ligands // *Psychopharmacology*: the Fourth Generation of Progress. Lippincott Williams & Wilkins, 1995.
- Numanoi H. Studies on the fertilization substances. IV. Presence of acetylcholine-like substance and cholinesterase in echinoderm-germ cells during fertilization // *Scient. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo.* 1953. V. 3. № 2. P. 193–200.
- Piomboni P., Baccetti B., Moretti E., Gambera L., Angelini C., Falugi C. Localization of molecules related to cholinergic signaling in eggs and zygotes of the sea urchin, *Paracentrotus lividus* // *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 2001. V. 33. № 1–2. P. 187–193.
- Shmukler Yu.B., Grigoriev N.G., Buznikov G.A., Turpaev T.M. Regulation of cleavage divisions: participation of “pre-nerve” neurotransmitters coupled with second messengers // *Comp. Biochem. Physiol.* 1986. V. 83. C. № 2. P. 423–427.
- Shmukler Yu.B., Silvestre F., Tosti E. 5-HT-receptive structures are localized in the interblastomere cleft of *Paracentrotus lividus* early embryos // *Zygote.* 2008. V. 16. № 1. P. 79–86.

Expression of Transmitter Receptor Genes in Early Development of Sea Urchin *Paracentrotus lividus*

D. A. Nikishin, M. N. Semenova, and Yu. B. Shmukler

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilov 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: yurishmukler@yahoo.com

Abstract—Neurotransmitters (including serotonin and acetylcholine) perform a number of pre-nerve functions in early sea urchin development. To detect the particular receptor components involved in these processes, we carried out a database search and nucleotide sequences homologous to serotonin receptor type 4, and the α_6 - and α_{10} -subunits of nicotinic acetylcholine receptor were found among EST-clones from early *Paracentrotus lividus* embryos. Expression of these transcripts during early development was demonstrated using RT-PCR. These results are the first molecular biology evidence of serotonin and acetylcholine receptor expression in sea urchin early embryogenesis.

Keywords: serotonin receptor, nicotinic cholinergic receptor, sea urchins, early development.

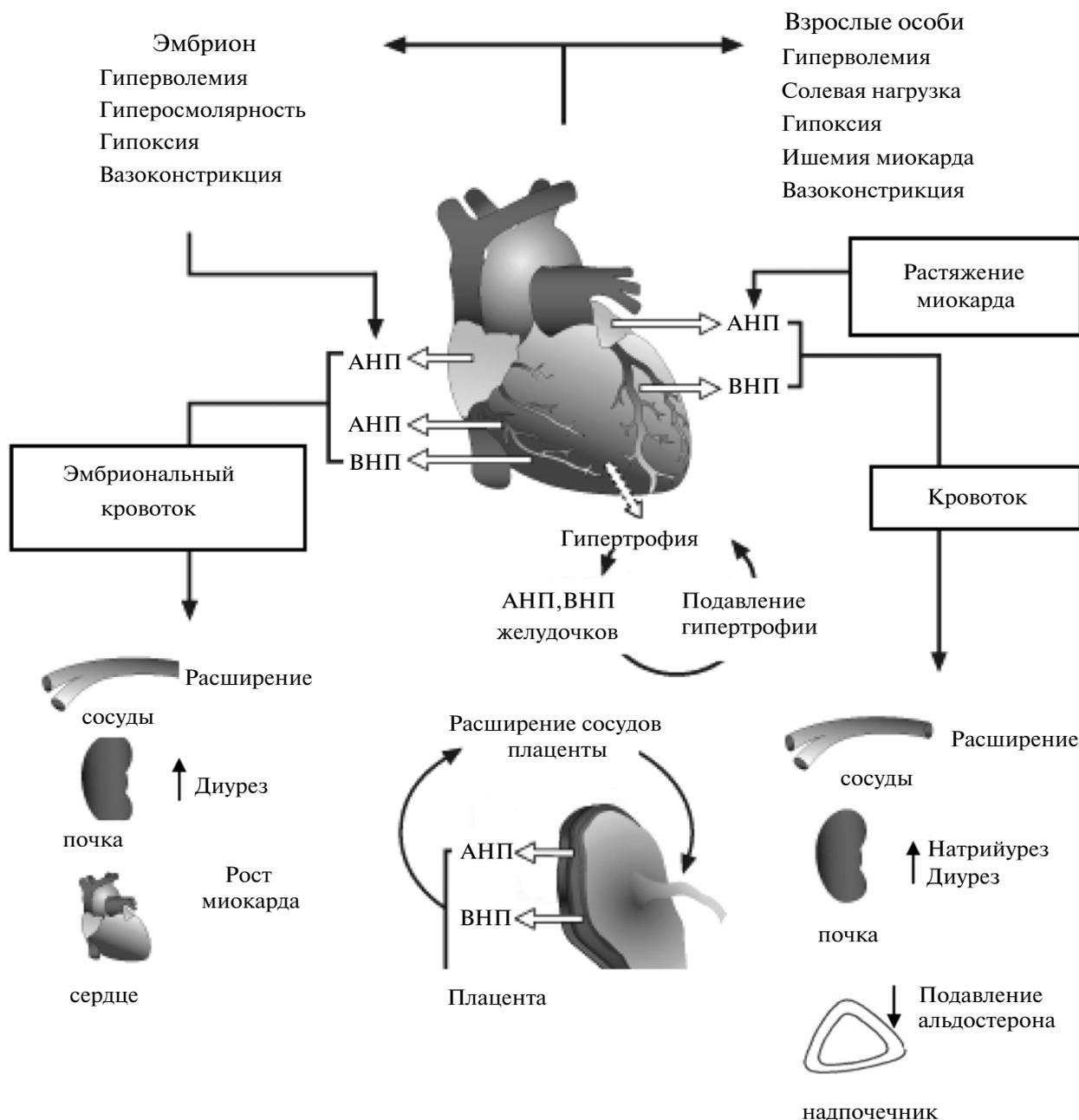


Рис. 2. Схема функционирования системы натрийуретических пептидов сердца в эмбриогенезе (слева) и у взрослых особей (справа). В верхней части указаны некоторые стимулы, усиливающие секрецию пептидов, в нижней – их биологические эффекты. По Камерон, Элмерс (Cameron, Ellmers, 2003).

солевого гомеостаза и регуляция кровяного давления путем стимуляции натрийуреза, диуреза и снижения периферического сопротивления. Они не только напрямую подавляют выделение ренина, альдостерона и антидиуретического гормона, но и противодействуют действию ангиотензина-II и антидиуретического гормона в органах

мишенях. Таким образом, основные физиологические эффекты сердечных пептидов сводятся к антагонизму с ренин-ангиотензин-альдостероновой системой (рис. 2).

Интерес к механизмам действия сердечных пептидов получил дополнительный толчок после

того, как было установлено, что у экспериментальных животных с гипертензией любого генеза и у больных с застойной сердечной недостаточностью и с другими сердечнососудистыми и гемодинамическими нарушениями концентрация сердечных гормонов в плазме значительно повышена (Vesely, 2001). По мнению исследователей и клиницистов, уровень сердечных гормонов может служить в будущем важным диагностическим и прогностическим показателем (Nir et al., 2009).

Натрийуретические пептиды обнаружены в сердце у всех позвоночных животных. У рыб (например, угрей) они регулируют потребление и выведение соли и воды при переходе из пресных водоемов в соленую морскую среду, а у наземных животных — чувство жажды (Wu et al., 2009). Пептиды синтезируются в предсердных кардиомиоцитах, в саркоплазме которых наряду с миофибриллами обнаруживаются специфические секреторные гранулы диаметром 50–500 нм (рис. 3). Самым сильным стимулом для выделения пептидов из депо является растяжение миокарда. Секретию стимулируют также многочисленные воздействия, опосредованные растяжением предсердий: повышение объема циркулирующей крови, гипертензия и солевые нагрузки, физические нагрузки, гипоксия, ишемия миокарда, сосудосуживающие гормоны и медикаменты (Maack, 2006). В мышечных клетках желудочков сердца взрослых особей ни пептидов, ни гранул в норме не обнаруживается (Christoffersen et al., 2002).

Свое действие в органах мишенях оба пептида осуществляют через два типа рецепторов. Тип А (NPR-A) — трансмембранный рецептор с молекулярной массой около 120 кД. Внеклеточный домен связывается с гормонами, внутриклеточный содержит киназную и гуанилатциклазную части. Повышение уровня ц-ГМФ активирует протеинкиназу, которая фосфорилирует целевой белок. Фосфодиэстераза, снижая уровень ц-ГМФ, модулирует силу и продолжительность ответа. Рецепторы С-типа (клиренсные, NPR-C) имеют внеклеточный домен связывания, трансмембранный и цитозольный домены, их молекулярная масса 67–77 кД (Woodard, Rosado, 2007) (рис. 4). Они, располагаясь в почках, сосудистом эндотелии, сердце, легких и других органах, удаляют из крови около половины циркулирующих натрийуретических пептидов путем рецептор-опосредованной интернализации. Остальное метаболизируется в крови нейтральной эндопептидазой EC 3.4.24.11 (McFarlane et al., 2003). Время полужизни для АНП приблизительно 3–5 мин, для ВНП значительно больше — около 23 мин, а неактивный N-концевой пептид ВНП циркулирует от 60 до 120 мин (Potter et al., 2006).

Большинство знаний о гормонах основываются на определении их концентрации в плазме

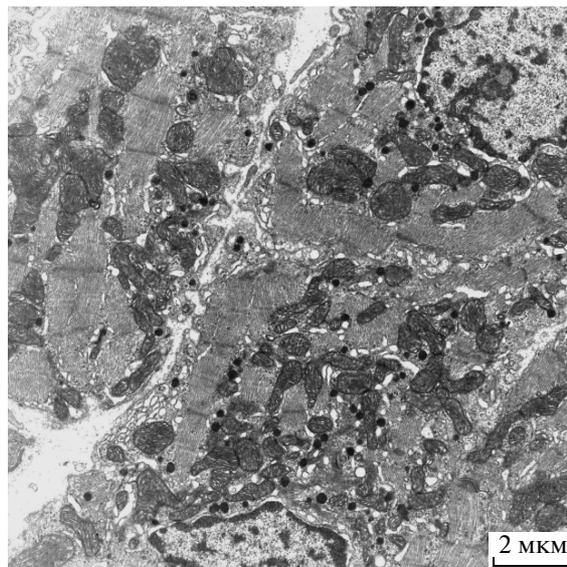


Рис. 3. Миоэндокринные кардиомиоциты правого предсердия крысы с многочисленными секреторными гранулами. Электронограмма. Масштаб 2 мкм. Из архива авторов.

крови, которая представляет собой баланс секреции и метаболического распада. Однако для натрийуретических пептидов до сих пор не разработаны современные точные, чувствительные и калиброванные способы определения их концентрации в плазме крови и тканях (Clerico, Emdin, 2004). Связано это отчасти с недостаточностью накопленных сведений о механизмах синтеза и выделения секреторного продукта в миоэндокринных клетках предсердий, отчасти с многообразием форм гормонов и их дериватов в кровеносном русле. Пико- и фемтомолярные концентрации гормонов в крови и тканях усложняют технологические задачи (Goetze, 2009).

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СИНТЕЗА И ВЫДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДОВ

Синтез. Внутриклеточные пути синтеза, накопления и выведения натрийуретических пептидов в кардиомиоцитах изучены лишь отчасти из-за методических трудностей их идентификации и визуализации. Благодаря развитию молекулярно-генетических технологий стали доступны для понимания отдельные этапы этих процессов.

АНП и ВНП у человека закодированы небольшими генами в 1-й хромосоме, у мыши — в 4-й, у крысы — в 5-й. Структура гена проста и схожа с таковой других пептидных гормонов по размеру и составу (Lanfear, 2010). Ген, кодирующий препрогормон АНП (152 аминокислоты), состоит из трех экзонов (кодирующих последовательностей) и разделяющих их двух интронов (рис. 5). Экзон 1

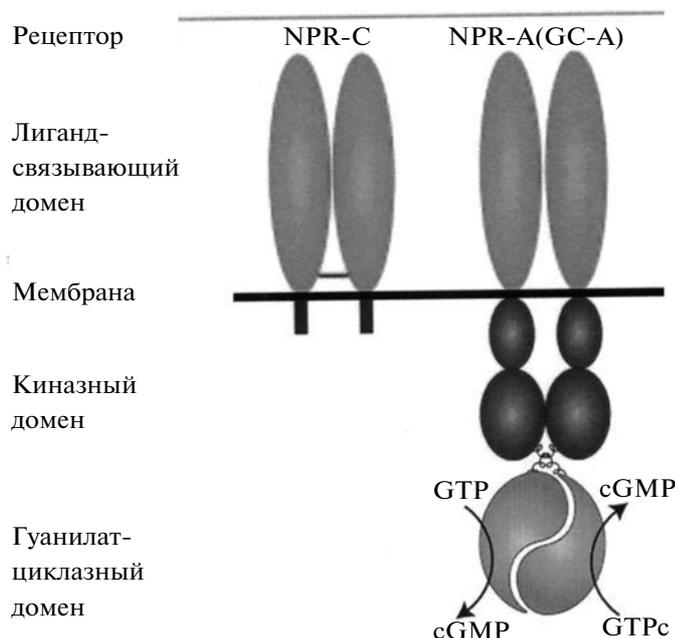


Рис. 4. Схема строения рецепторов нарийуретических пептидов. Пояснения в тексте. По Поттер с соавторами (Potter et al., 2006).

кодирует сигнальный пептид из 26 аминокислотных остатков, который отщепляется от пре-прогормона в эндоплазматической сети с образованием прогормона АНП (126). Экзон 1 также кодирует первые 16 аминокислот прогормона. Экзон 2 кодирует основную часть прогормона (17–125 у людей). Экзон 3 кодирует последний тирозин (т.е. 126-ю аминокислоту прогормона) у людей и три последние аминокислоты (тир-арг-арг) у мышей, крыс, кроликов и коров (Vesely, 2001). Прогормон – основная форма хранения и накопления АНП в кардиомиоцитах. Это простая молекула, которая распадается при выделении из клеток на два основных фрагмента – N- и C-терминальные пептиды. Последний (99–128) является активной формой гормона АНП. Он состоит из 28 аминокислотных остатков с кольцевой структурой, образованной дисульфидными мостиками между цистеиновыми остатками (рис. 1). Именно кольцо определяет биологическую активность и взаимодействие с рецепторами клеток-мишеней. N-терминальный фрагмент прогормона (1–98) не обладает биологической активностью, но в крови он распадается на несколько полипептидов с гипотензивным, натрийуретическим, диуретическим и калийуретическим действием. Первые 30 аминокислот составляют долгоживущий АНП, с 31 по 67 – сосудистый дилататор, 79–98 – калийуретический

пептид (рис. 5). Натрийуретический эффект первых двух отличается от АНП тем, что они подавляют почечную $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ азу вторично через усиление синтеза простагландина E_2 , что АНП не делает. Пост-трансляционные превращения ВНП происходят в клетках по такой же общей схеме: пре-прогормон ВНП (134) → отщепление сигнального пептида с образованием прогормона ВНП (108) → специфическая протеаза разделяет его на N-терминальный фрагмент прогормона (1–76) и активный гормон ВНП (77–108). Оба фрагмента в эквимолярных концентрациях выделяются в кровь (Goetze, 2009).

Вазоактивные вещества (катехоламины, ангиотензин-II) усиливают транскрипцию натрийуретических генов через p38 MAPK протеинкиназу. Растяжение миоцитов повышает уровень внутриклеточного кальция, изменяет кальций-связывающие белки, что усиливает экспрессию натрийуретических генов (Kudoh et al., 2003). Эти же гены активируются ишемическим транскрипционным фактором (hypoxia inducible transcription factor 1-alpha), что имеет значение при ишемической болезни сердца (Weidemann et al., 2008).

Накопление. Предсердные натрийуретические пептиды накапливаются в секреторных гранулах кардиомиоцитов в виде прогормона АНП (126),

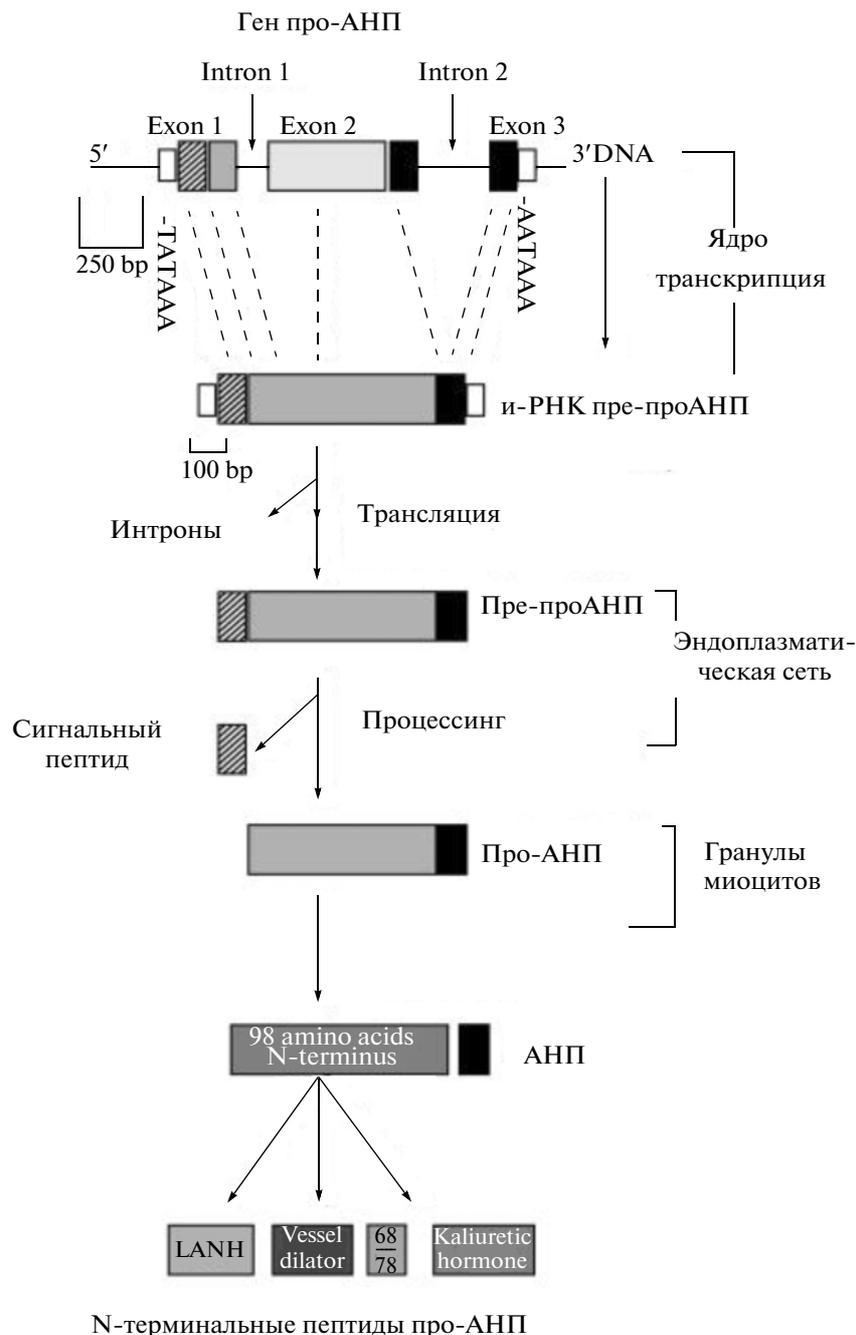


Рис. 5. Схема синтеза и процессинга молекулы атриального натрийуретического пептида (АНП) в кардиомиоцитах предсердий. По Весели (Vesely, 2006).

прогормона ВНП (108) и зрелого конечного продукта ВНП (32). Большинство исследователей отрицает наличие в гранулах зрелого АНП (28) (Vesely, 2001). Под электронным микроскопом секреторные гранулы у разных видов позвоночных животных выглядят одинаково, но различаются по диаметру. Это округлые тельца с электронно-плотной гомогенной или слегка зернистой сердцевиной, окруженной одинарной мембраной (рис. 3, 6). Между сердцевиной и мембраной ино-

гда обнаруживается светлый ободок – хало (halo). Некоторые исследователи подразделяют гранулы по морфологии (учитывая целостность мембраны, наличие и толщину ободка, плотность и структуру сердцевины) на формирующиеся, зрелые и растворяющиеся формы. Соотношение этих разновидностей дает возможность оценить секреторную активность клеток (Коростышевская, Максимов, 1989; Рахчеева и др., 2009). Как правило, секреторные гранулы группируются в

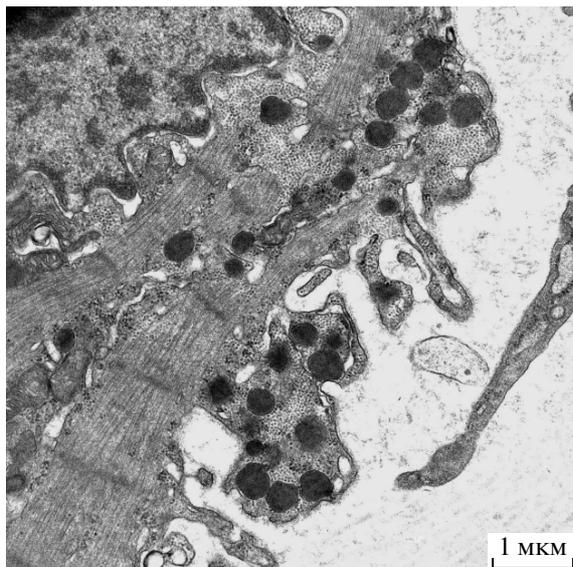


Рис. 6. Скопление секреторных гранул на периферии кардиомиоцита правого предсердия у крысенка (21 день жизни) линии НИСАГ с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией. Электронограмма. Масштаб 1 мкм. Из архива авторов.

околоядерной зоне, но при некоторых патологических состояниях (гипертензия, гиперволемиа и др.) гранулы заполняют саркоплазму между миофибриллами и скапливаются под сарколеммой (рис. 6).

У мышей с генетическим отсутствием АНП в клетках предсердий нет секреторных гранул (John et al., 1995), ВНП в предсердиях не определяется, а в желудочках его концентрация минимальная (Tse et al., 2001). У мышей, нокаутных по гену ВНП, гранулы в предсердиях имеются (Tamura et al., 2000). Сердечные натрийуретические пептиды имеют принципиально сходное строение, но некоторые аспекты их транскрипции, посттранскрипционные и трансляционные этапы, приводящие к секреции зрелых гормонов, могут значительно различаться как между собой, так и в ответ на различные стимулы, которые действуют на кардиомиоциты (O'Donnell et al., 2003). Внутриклеточные этапы “созревания” гормона: гликозилирование, эндопротеолиз – изучены плохо; доподлинно неизвестно, где это происходит и какие ферментные системы задействованы, одинаковы ли эти процессы в предсердиях и желудочках (Vesely D., 2001).

Анализ белкового состава секреторных гранул из кардиомиоцитов предсердий крыс выявил наличие в них около 100 разных белков. Из них 61 белок хорошо изучен и точно определен. Белки можно подразделить на 7 функциональных категорий, отвечающих за: 1. транспорт гранул, прилипание и слияние с мембраной, 2. передачу сиг-

налов, 3. связывание кальция, 4. клеточную архитектуру и формообразование, 5. процессинг пептидов/белков, 6. синтез гормона, 7. протонный транспорт (Muth et al., 2004). Большая часть этих белков связаны с мембраной гранул и двумя мажорными (95%) белками – peptidylglycine-alpha-amidating monoxygenase (пептидилглицин альфа-амидированная монооксигеназа – ПАМ) и прогормоном АНП (1-126). Прогормон АНП обнаруживается в растворимой сердцевине гранул, но большое его количество остается тесно связанным с мембранами даже после тщательного отмывания. В мембранной фракции молярное соотношение прогормона АНП и ПАМ приблизительно 30 : 1. ПАМ – бифункциональный фермент, известный как каталитический посттрансляционный биоактиватор сигнальных пептидов. Однако здесь основная функция ПАМ не ферментативная, а структурная. По-видимому, фермент участвует в упаковке прогормона АНП внутри секреторных гранул и, возможно, подготавливает прогормон к протеолитическому процессингу (O'Donnell et al., 2003).

Конденсация про-АНП является кальций-зависимым процессом. Поверхностные участки агрегатов про-АНП обогащаются липидами и белками внутри мембран транс-зоны аппарата Гольджи, обволакивая агрегаты и уменьшая энергию для замыкания секреторного пузырька и отпочкования его от цистерн Гольджи (Baertschi et al., 2001). В процессе формирования гранул принимают участие хромогранины, но их роль в сердце точно не установлена (Крылова, 2007). Морфологически процесс формирования гранулы выражается в накоплении хлопьевидного материала средней электронной плотности в расширенной цистерне пластинчатого комплекса. Можно проследить постепенные этапы уплотнения и отделения формирующейся гранулы от конца цистерны. Как правило, такие гранулы мельче по размеру, чем зрелые и растворяющиеся формы (рис. 7).

По гипотезе Баерши с коллегами (Baertschi et al., 2001) само содержимое определяет размер и, возможно, форму секреторных гранул. В нормальных предсердных кардиомиоцитах у новорожденных крысят прогормон АНП выявляется в секреторных гранулах диаметром 120 и 175 нм, которые передвигаются в цитоплазме с максимальной скоростью 0.3 мкм/с. Удаление N-терминального фрагмента прогормона или точечная мутация в этой области вызывает изменение формы, размера, но не скорости перемещения в саркоплазме секреторных гранул. Под электронным микроскопом более крупные гранулы приобретают неправильные “мягкие” очертания, имеют плотную сердцевину, окруженную бледным содержимым неравномерной ширины. Такие гранулы не могут правильно контактировать с мембраной клетки из-за отсутствия поверхностных кон-

денсированных структур и недостаточной плотности или неправильного расположения рецепторов связывания. Именно кальций-связывающий N-терминальный фрагмент прогормона отвечает за агрегацию белка в транс-зоне Гольджи в присутствии высоких концентраций кальция. Удаление С-терминального фрагмента молекулы прогормона АНП, где содержится сам гормон и его дисульфидный мостик, не влияет на форму, размеры, способность к слиянию и скорость перемещения секреторных гранул (Vaertschi et al., 2001).

Долгое время механизм превращения прогормона АНП (в гранулах клеток) в зрелый гормон в плазме крови оставался загадкой. Недавно в сердце была открыта новая мембранная трипсिनоподобная сериновая протеаза, получившая название корин (corin). Именно этот фермент разделяет молекулу прогормона по аргинину в 98-й позиции в момент выделения его из клеток. Это очень крупная протеаза из 1042 аминокислотных остатков с молекулярной массой 150–200 кД. У человека ее большой ген с 22 экзонами находится в хромосоме 4p12-13. У нокаутных по гену корина мышей прогормон в сердце есть, а зрелого гормона нет, и как следствие, у них развивается тяжелая гипертензия (Wu et al., 2009).

Выделение. Различают два основных механизма секреции гормонов. Базальный уровень секреции происходит вне стимуляции и обеспечивается выделением синтезированного продукта пассивным пузырьковым транспортом. При регулируемом типе секреции гормоны выделяются под действием стимулов путем энергозависимого экзоцитоза гранул, в плотной сердцевине которых содержится гормон. Сортировка секреторного продукта на тот или другой тип выделения происходит в транс-зоне комплекса Гольджи (Ogawa et al., 1999). Иида и Шибата (Iida, Shibata, 1994) на культуре предсердных миоцитов крыс показали, что вне стимуляции около 40% вновь синтезированного АНП секретируется, а остальное направляется на запас или для более позднего выделения.

Визуализировать процессы выделения секрета из миоэндокринных клеток методически очень трудно. Растворяющиеся формы гранул (с частично или полностью разрушенной оболочкой и зернистым содержимым пониженной плотности), скопление гранул в непосредственной близости от сарколеммы — лишь косвенные показатели интенсивности процесса (рис. 6). Для фиксации экзоцитоза секреторного продукта нужно применять специальные методики (быстрое замораживание, обработка таниновой кислотой). На рутинных электронограммах он обнаруживается, как правило, при стимуляции секреторной активности (рис. 8).

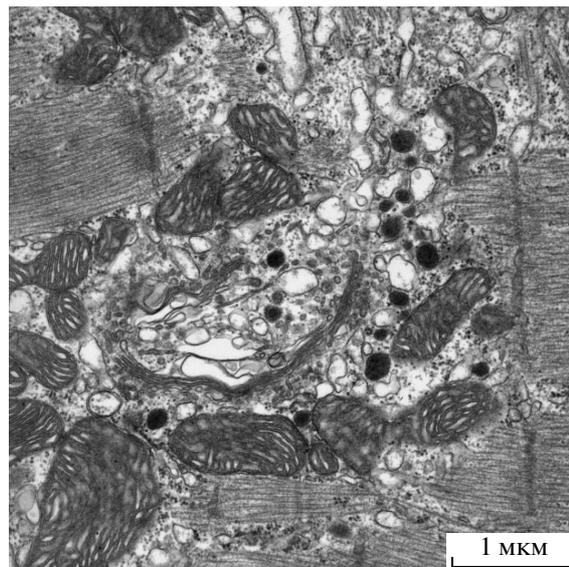


Рис. 7. Формирование секреторных гранул в области Гольджи кардиомиоцита правого предсердия крысенка (21 день жизни) линии Вистар. Электронограмма. Масштаб 1 мкм. Из архива авторов.

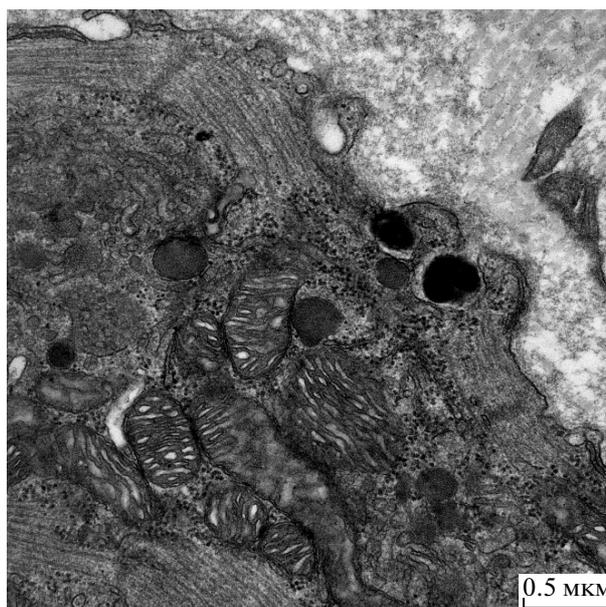


Рис. 8. Выделение секреторного продукта путем экзоцитоза из кардиомиоцита правого предсердия у крысенка (21 день жизни) линии НИСАГ с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией. Электронограмма. Масштаб 0.5 мкм. Из архива авторов.

На сегодня основная концепция гормональной функции сердца такова: секреция в предсердиях — регулируемый процесс, в желудочках — базальный.

Секреция АНП напрямую регулируется механическим растяжением стенки предсердия, а ча-

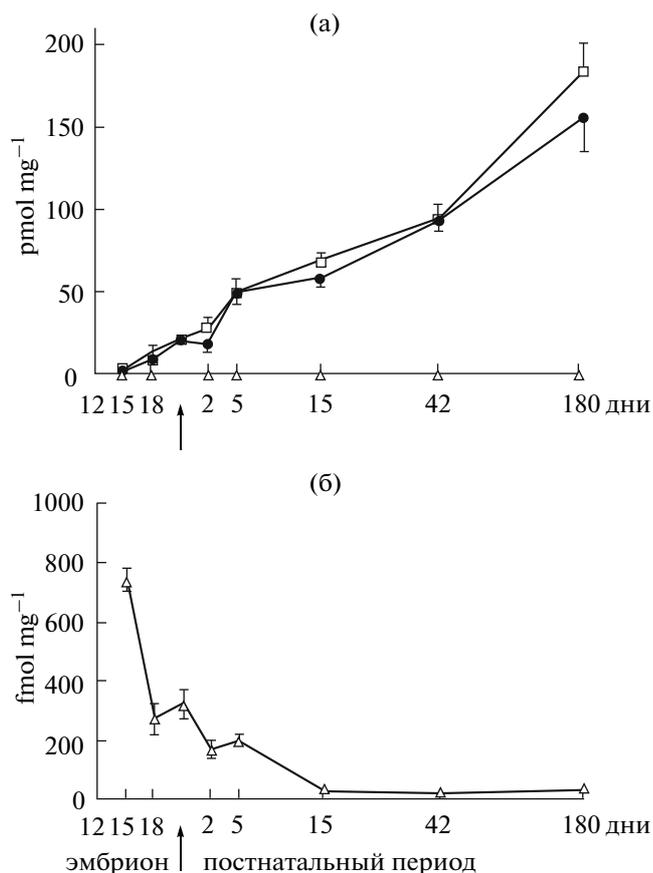


Рис. 9. Динамика концентрации атриального натрий-уретического пептида в ткани правого (светлые метки) и левого (темные метки) предсердий (а) и желудочков (б) сердца хомяка по ходу эмбриогенеза и постнатального развития. По Наваратнам с соавторами (Navaratnam et al., 1989).

стота сокращения менее важна как физиологический стимул для секреции. Сопряжение “растяжение-секреция” обусловлено входом ионов кальция через потенциал-зависимые каналы. Предполагается, что выделение Ca^{2+} из саркоплазматической сети, которое вызывает активацию кальций-кальмодулин киназы, тоже принимает участие во внутриклеточных процессах выделения АНП при механическом растяжении (O'Donnell et al., 2003).

Острая (в течение минут) реакция на растяжение приводит к усиленному выделению накопленного в предсердиях АНП, достаточного для повышения уровня гормона в крови. ВНП при этом тоже выделяется, но он составляет всего 1–2% от концентрации АНП в тканях, а потому его концентрация в крови не меняется. Стимулированная секреция, в основном, использует ранее синтезированный и накопленный гормон, а вновь синтезированный — в значительно меньшей степени. Усиление продукции пептидов характерно для более длительных воздействий, на-

пример, при изменении гормонального фона (избытке эндотелина-I, ангиотензина-II, адренергических агонистов, глюкокортикоидов, тиреоидных гормонов, простагландинов, вазопрессина и др.). Стимуляция транскрипции генов АНП и ВНП происходит вторично к повышению объема жидкости, но в плазме заметно повышается только концентрация АНП (de Bold et al., 1996).

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ СТАНОВЛЕНИЕ ГОРМОНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ СЕРДЦА

У взрослых основным местом синтеза гормона являются предсердия, в левом желудочке его всего 0.5–3% (Ruskoaho, 1992). В эмбриогенезе вклад желудочков в общую секрецию сердечных пептидов много существенней, чем у взрослых особей, а у отдельных видов — основной. Это четко продемонстрировано на графиках изменения концентрации АНП в предсердиях (пикомоль/мг ткани) и желудочках (фентомоль/мг) крыс в период с 12 дня гестации до 6-месячного возраста (Navaratnam et al., 1989). Видно, что в предсердиях экспрессия АНП неуклонно растет, а в левом желудочке — прогрессивно снижается и после двух недель жизни практически не определяется (рис. 9).

Динамика содержания и-РНК пептидов по ходу эмбриогенеза у мышей показала, что экспрессия ее появляется на 8–9-й день гестации с наибольшим пиком на 12-й день и меньшими пиками в период 14–16 суток развития. Эти сроки совпадают с основными морфогенетическими этапами формирования сердца: на 9-й день начинается регулярное сердцебиение примитивного сердца, в течение 12-го дня происходит активное формирование перегородки с образованием четырех камер, и на 15-й день сдвигается ось сердца (Cameron, Ellmers, 2003). Иммуногистохимическая метка к АНП обнаруживается в секреторных гранулах желудочковых кардиомиоцитов у мышей на 11-е сутки эмбриогенеза, но только в малодифференцированных (43%) и зрелых (14%) клетках. В недифференцированных миоцитах метки нет (Zhang, Pasumarthi, 2007). Исследования Делуф с коллегами (Deloof et al., 1995) показали, что у эмбрионов крыс, по крайней мере, начиная с 17-го дня, внутриклеточный процессинг АНП протекает так же, как и у взрослых особей.

Изменения давления в правом предсердии, скорости клубочковой фильтрации и баланса жидкости у новорожденных подразумевает физиологическую роль АНП в процессе родоразрешения. Поскольку после родов концентрация гормонов в крови новорожденного падает из-за потери материнского источника, то, соответственно, очень быстро усиливается продукция гормона в предсердиях новорожденного (Cameron, Ellmers, 2003).

Концентрация АНП в плазме у новорожденных детей очень высокая вне связи с массой тела, давлением крови, содержанием натрий/креатинина и альдостерон/креатинина в моче (Ito et al., 1990). В плазме из пупочной артерии она значительно выше (51 ± 21.4 фмоль/мл), чем в пупочной вене (18.1 ± 13.5 фмоль/мл), что говорит о том, что плацента захватывает гормон. Есть данные, что плацента человека имеет рецепторы к АНП (Mulay, Varma, 1989). Концентрация АНП в периферической вене до 5 суток жизни остается высокой (60.7 ± 29.4 фмоль/мл). У детей старшего возраста этот показатель не отличается от такового взрослых людей 20–34 лет (14.4 ± 7.4 и 10.0 ± 4.8 фмоль/мл, соответственно) (Kikuchi K. et al., 1988). Это связывают с отрицательным балансом соли и воды в постнатальном периоде, так как у плодов и новорожденных содержание воды в теле очень высокое. В течение нескольких дней после рождения за счет усиления натрийуреза и диуреза уменьшаются общий объем жидкости и внеклеточного пространства до уровня взрослого организма (Stephenson, Pipkin, 1990).

Исследователи признают, что у млекопитающих гормональная система сердца начинает функционировать с середины эмбриогенеза и активно участвует в регуляции артериального давления и водно-солевого баланса у эмбрионов так же, как и у взрослых особей (рис. 2). Показано, что концентрация АНП в плазме плода крысы в 4 раза выше, а N-терминального фрагмента АНП – в 20 раз выше, чем в плазме самки. Одни авторы считают, что это отражает низкую способность почек метаболизировать гормон (Wei et al., 1987), другие, что это следствие усиленной секреции гормона (Deloof et al., 1995). Эксперименты показали, усиление секреции АНП у плодов крыс и овец происходит в ответ на увеличение объема циркулирующей крови, гиперосмолярность, гипоксию, а также на действие вазоконстрикторов – ангиотензина-II, вазопрессина и эндотелина (Johnson et al., 1997). У плодов овцы концентрация АНП повышается в ответ на гиперволюмию и уменьшается при кровопотере. У человеческих плодов, по крайней мере, в третьем триместре, концентрация АНП увеличивается при патологической или ятрогенной гиперволюмии (Stephenson, Pipkin, 1990).

Складывается впечатление, что гормоны могут поступать в плод через плаценту, так как введение гормона в кровь матери вызывает параллельное увеличение его концентрации и у плода. После введения матери вазопрессина уровень гормонов в крови матери и плода нарастает. Плод также реагирует на внешние стимулы – введение вазопрессина или индометацина вызывает сужение боталлова протока и усиленное выделение на-

трийуретического пептида в кровь. Авторы заключают, что у плода система сердечных гормонов функционирует и адекватно реагирует, как и у взрослых, на повышение внутрисердечного давления (Wei et al., 1987).

АНП обнаруживается в тканях плаценты человека, он секретируется клетками цитотрофобласта. Эксперименты с введением сердечного гормона в плацентарный кровоток дали основание предполагать, что натрийуретический пептид за счет вазодилатации принимает участие в регуляции кровоснабжения плода (Stebbing et al., 1996) (рис. 2).

ПАРАКРИННЫЕ И АУТОКРИННЫЕ ЭФФЕКТЫ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ

Кроме известных эндокринных влияний на водно-солевой гомеостаз и артериальное давление, АНП и ВНП обладают важными аутокринными и паракринными воздействиями внутри сердца и коронарной системы. Они включают регуляцию роста кардиомиоцитов, подавление пролиферации фибробластов и отложение внеклеточного матрикса (рис. 2). Пептиды также обладают цитопротективным антиишемическим действием (по типу прекондиционирования), влияют на деление эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток в коронарных сосудах (D'Souza et al., 2004). Было показано, что гены всех рецепторов к натрийуретическим пептидам экспрессируются в мышечных клетках сердца и фибробластах, сердце само служит мишенью для этих гормонов. У взрослых особей АНП и ВНП принимают участие в ремоделировании миокарда в ответ на объемную перегрузку в клинических и экспериментальных условиях (Kawakami et al., 1996).

Кроме регуляции объема жидкости АНП в эмбриогенезе выполняет и другие разнообразные функции: влияет на рост и пролиферацию клеток, в том числе подавляет пролиферацию гладкомышечных клеток в стенках сосудов, сдерживает гипертрофию, подавляет рост фибробластов в миокарде (рис. 2) (Cameron, Ellmers, 2003).

Добавление АНП в культуру эмбриональных клеток сердца цыпленка усиливает суммарный синтез ДНК и пролиферацию клеток. Агонисты АНП усиливают, а антагонисты подавляют эффекты на биосинтез белка и на пролиферацию клеток. В клетках повышается концентрация РНК, усиливается формирование миозиновых и тропомиозиновых белков. Через специфические рецепторы АНП ускоряет вход кардиомиоцитов в S фазу клеточного цикла (Koide et al., 1996).

У мышей, нокаутных по гену АНП в гомозиготном состоянии, повышено артериальное и

внутрипредсердное давление, развивается концентрическая гипертрофия желудочков. Депривация соли выравнивает давление с контролем, но не влияет на гипертрофию. АНП оказывает прямое антигипертрофическое действие на кардиомиоциты вне зависимости от артериального давления (Feng et al., 2003). У мышей с генетическим дефектом рецепторов NPR-A к АНП повышена концентрация натрийуретического пептида в крови, развивается выраженная гипертрофия и фиброз миокарда на фоне очень умеренной гипертензии. Уже при рождении относительная масса сердца у нокаутных животных превышает контрольные значения на 140% (Knowles et al., 2001). Все эти данные свидетельствуют о том, что натрийуретические пептиды принимают участие в органогенезе сердца и сердечнососудистой системы. АНП является важным регулятором процесса роста кардиомиоцитов по ходу развития (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие и выяснение функции натрийуретических пептидов значительно расширили понимание механизмов регуляции артериального давления и баланса жидкости в организме. Это послужило толчком к оживлению дискуссий о реципрокных отношениях с ренин-ангиотензин-алдостероновой системой и другими прессорными гуморальными факторами при развитии гипертензий разного генеза и других гемодинамических нарушений. В данном обзоре внимание сосредоточено на самых малоизученных вопросах этой проблемы — онтогенетическом развитии и особенности функционирования сердечных гормонов на ранних этапах развития организма. Многие заболевания взрослого и даже пожилого возраста имеют предпосылки еще в эмбриогенезе и детстве. Пептидная система, которая принимает участие в морфогенезе сердца и сосудов, поддерживает их функционирование и регулирует водный баланс плода — должна привлекать внимание специалистов разных областей знаний, и, прежде всего, клиницистов. За рамками обсуждения этой работы остались многие актуальные и пока нерешенные проблемы. Упомянем лишь некоторые из них. Почему у животных в модельных экспериментах и у больных с тяжелыми формами сердечной недостаточности и отеками концентрация натрийуретических гормонов в крови повышается в десятки раз параллельно с нарастанием симптоматики декомпенсации? Почему при этом в крови превалирует ВНП, а не АНП как в норме? Почему эти пептиды не работают — не снижают давления и не выводят воду и соли? Почему в кардиомиоцитах желудочков происходит разблокирование эмбриональных генов и начи-

нается активный синтез натрийуретических пептидов, который прекратился вскоре после рождения? Пока не будут получены ответы на эти и другие базовые вопросы функционирования гормональной системы сердца в норме и патологии не могут быть доказательно реализованы попытки исследователей использовать содержание пептидов в крови больных в качестве доступного диагностического и прогностического критерия тяжести состояния больных и эффективности лечения. Даже общепризнанного способа точного определения содержания пептидов и их дериватов в плазме крови и тканях пока нет (Clerico, Emdin, 2004). Попытки создать лекарственные средства на базе натрийуретических пептидов (например, Nasiritide/Natrecor, SCIOS, Sunnyvale, CA, USA) наталкиваются на трудности в связи с нежелательными побочными эффектами этих препаратов (Mohammed et al., 2008). Хочется надеяться, что это широкое поле деятельности не останется без внимания ученых разных биомедицинских направлений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Коростышевская И.М., Максимов В.Ф.* Ультраструктурные особенности гормон-продуцирующих кардиомиоцитов в некоторых экспериментальных и клинических условиях // Архив АГЭ. 1989. № 2. С. 42–49.
- Крылова М.И.* Хемогранин А: иммуноцитохимическая локализация в секреторных гранулах кардиомиоцитов предсердия лягушки // Цитология. 2007. Т. 49. № 7. С. 538–543.
- Рахчеева М.Л., Бугрова М.Л., Мухина И.В., Жаберева А.С.* Роль предсердного натрийуретического пептида в регуляции артериального давления при односторонней ишемии почки у крыс // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2009. № 6 (1). С. 132–136.
- Baertschi A.J., Monnier D., Schmidt U. et al.* Acid prohormone sequence determines size, shape, and docking of secretory vesicles in atrial myocytes // Circ. Res. 2001. V. 89. P. E23–E29.
- Cameron V.A., Ellmers L.J.* Minireview: Natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation // Endocrinology. 2003. V. 144. № 6. P. 2191–2194.
- Christoffersen C., Goetze J.P., Bartels E.D. et al.* Chamber-dependent expression of brain natriuretic peptide and its mRNA in normal and diabetic pig heart // Hypertension. 2002. V. 40. P. 54–60.
- Clerico A., Emdin M.* Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review // Clin. Chem. 2004. V. 50. P. 33–50.
- D'Souza S.P., Davis M., Baxter G.F.* Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart // Pharmacol. Ther. 2004. V. 101. № 2. P. 113–129.
- de Bold A.J., Borenstein H.B., Veress A.T. et al.* A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of

- atrial myocardial extract in rats // *Life. Sci.* 1981. V. 28. P. 89–94.
- de Bold A.J., Bruneau B.G., de Bold M.L.* Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart // *Cardiovasc. Res.* 1996. V. 31. P. 7–18.
- Deloof S., VanCamp G., Chatelain A.* Molecular forms of atrial natriuretic peptide in atria and plasma from fetal and adult female rats // *Biol. Neonate.* 1995. V. 68. P. 292–300.
- Feng J.A., Perry G., Miri T. et al.* Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in atrial natriuretic peptide-deficient mice // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2003. V. 30. № 5–6. P. 343–349.
- Goetze J.P.* Biosynthesis of cardiac natriuretic peptides // *Results and Problems in Cell Differentiation.* Springer-Verlag. 2009.
- Hino J., Tateyama H., Minamino N. et al.* Isolation and identification of human brain natriuretic peptides in cardiac atrium // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. V. 167. P. 693–700.
- Iida H., Shibata Y.* Phasic secretion of newly synthesized atrial natriuretic factor from unstimulated atrial myocytes in culture // *Circ. Res.* 1994. V. 74. P. 659–668.
- Ito Y., Marumo F., Ando K. et al.* The physiological and biological significances of human atrial natriuretic peptide in neonates // *Acta Paediatr. Scand.* 1990. V. 79. № 1. P. 26–31.
- John S.W., Krege J.H., Oliver P.M. et al.* Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension // *Science.* 1995. V. 267. P. 679–681.
- Johnson D., Singh M., Cheung C.* Effect of tree hours of hypoxia on atrial natriuretic factor gene expression in the ovine fetal heart // *Am. J. Obstet Gynecol.* 1997. V. 176. P. 42–48.
- Kawakami H., Okayama H., Hamada M. et al.* Alteration of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide gene expression associated with progression and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats // *Clin. Sci.* 1996. V. 90. P. 197–204.
- Kikuchi K., Shiomi M., Horie K. et al.* Plasma atrial natriuretic polypeptide concentration in healthy children from birth to adolescence // *Acta Paediatr. Scand.* 1988. V. 77. № 3. P. 380–384.
- Knowles J., Esposito G., Mao L. et al.* Pressure independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A deficient mice // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 107. P. 975–984.
- Koide M., Akins R.E., Harayama H. et al.* Atrial natriuretic peptide accelerates proliferation of chick embryonic cardiomyocytes *in vitro* // *Differentiation.* 1996. V. 61. № 1. P. 1–11.
- Kudoh S., Akazawa H., Takano H. et al.* Stretch-modulation of second messengers: effects on cardiomyocyte ion transport // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2003. V. 82. P. 57–66.
- Lanfear D.E.* Genetic variation in the natriuretic peptide system and heart failure // *Heart Fail. Rev.* 2010. V. 15. № 3. P. 219–228.
- Maack T.* The broad homeostatic role of natriuretic peptides // *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2006. V. 50. № 2. P. 198–207.
- McFarlane S.I., Winer N., Sowers J.R.* Role of the natriuretic peptide system in cardiorenal protection // *Arch. Intern. Med.* 2003. V. 163. P. 2696–2704.
- Mohammed S.F., Korinek J., Chen H.H. et al.* Nesiritide in acute decompensated heart failure: current status and future perspectives // *Rev. Cardiovasc. Med.* 2008. V. 9. P. 151–158.
- Mulay S., Varma D.R.* Placental barrier to atrial natriuretic peptide in rats // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1989. V. 67. № 1. P. 1–4.
- Muth E., Driscoll W.J., Smalstig A. et al.* Proteomic analysis of rat atrial secretory granules: a platform for testable hypotheses // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. V. 1699. № 1–2. P. 263–275.
- Navaratnam V., Woodward J.M., Skepper J.N.* Specific heart granules and natriuretic peptide in the developing myocardium of fetal and neonatal rats and hamsters // *J. Anat.* 1989. V. 163. P. 261–273.
- Nir A., Lindinger A., Rauh M. et al.* NT-pro-B-type natriuretic peptide in infants and children: reference values based on combined data from four studies // *Pediatr. Cardiol.* 2009. V. 30. № 1. P. 3–8.
- O'Donnell P.J., Driscoll W.J., Back N. et al.* Peptidylglycine- α -amidating monooxygenase and pro-atrial natriuretic peptide constitute the major membrane-associated proteins of rat atrial secretory granules // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2003. V. 35. № 8. P. 915–922.
- Ogawa T., Vatta M., Bruneau B.G. et al.* Characterization of natriuretic peptide production by adult heart atria // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 1999. V. 276. Issue 6. P. H1977–H1986.
- Potter L.R., Hosch S.A., Dickey D.M.* Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions // *Endocrine Rev.* 2006. V. 22. № 1. P. 47–72.
- Ruskoaho H.* Atrial natriuretic peptide: Synthesis, release, and metabolism // *Pharmacol. Rev.* 1992. V. 44. P. 479–602.
- Stebbing P., Gude N., King R. et al.* α -Atrial natriuretic peptide-induced attenuation of vasoconstriction in the fetal circulation of the human isolated perfused placenta // *J. Perinat. Med.* 1996. V. 24. P. 253–260.
- Stephenson T.J., Pipkin F.B.* Atrial natriuretic factor: the Heart as an endocrine organ // *Arch. Dis. Child.* 1990. V. 65. P. 1293–1294.
- Tamura N., Ogawa Y., Chusho H. et al.* Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 4239–4244.
- Tse M.Y., Watson J.D., Sarda I.R. et al.* Expression of B-type natriuretic peptide in atrial natriuretic peptide gene disrupted mice // *Mol. Cell. Biochem.* 2001. V. 219. P. 99–105.
- Vesely D.L.* Atrial natriuretic peptides in pathophysiological diseases // *Cardiovascular Research.* 2001. V. 51. P. 647–658.
- Vesely D.L.* Which of the cardiac natriuretic peptides is most effective for the treatment of congestive heart failure, renal failure and cancer? // *Clin. Exper. Pharm. Physiol.* 2006. V. 33. № 3. P. 169–176.
- Wei Y., Rodi C.P., Day M.L. et al.* Developmental changes in the rat atriopeptin hormonal system // *J. Clin. Invest.* 1987. V. 79. P. 1325–1329.

- Weidemann A., Klanke B., Wagner M. et al.* Hypoxia, via stabilization of the hypoxia-inducible factor HIF-1 α , is a direct and sufficient stimulus for brain-type natriuretic peptide induction // *Biochem. J.* 2008. V. 409. P. 233–242.
- Woodard G.E., Rosado J.A.* Recent advances in natriuretic peptide research // *J. Cell. Mol. Med.* 2007. V. 11. № 6. P. 1263–1271.
- Wu Q., Cai O., Chen S. et al.* Corin: New insights into the natriuretic peptide system // *Kidney Int.* 2009. V. 75. № 2. P. 142–146.
- Zhang F., Pasumarthi K.B.* Ultrastructural and immunohistochemical characterization of undifferentiated myocardial cells in the developing mouse heart // *J. Cell. Mol. Med.* 2007. V. 11. № 3. P. 552–560.

Where and when Natriuretic Peptides Are Secreted in the Heart

I. M. Korostishevskaya and V. F. Maksimov

*Institute of Physiology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Timakova 4, Novosibirsk, 630117 Russia
e-mail: kor@physiol.ru*

Abstract—This review presents recent data on the structure, synthesis, and secretion of cardiac natriuretic peptides. It is known that these hormones have a broad spectrum of activity, but they remain the least studied and poorly understood link in the regulation of the water-salt homeostasis. Emphasis is placed on the problem of ontogenetic formation of the heart secretory activity during embryogenesis. We discuss the available scarce and scattered information on the paracrine and autocrine effects of the peptides on intercellular interactions, and on the division, growth and differentiation of the heart cells. These issues are hardly addressed in Russian literature.

Keywords: natriuretic peptides, water-salt homeostasis, embryogenesis, heart.

УДК 57.034:577.217.5+57.085.23

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ОРГАНИЗУЮТ РИТМ СИНТЕЗА БЕЛКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКЗОГЕННОГО СИНХРОНИЗИРУЮЩЕГО СИГНАЛА

© 2012 г. В. Я. Бродский, А. В. Васильев, В. В. Терских, Н. Д. Звездина, В. И. Фатеева, Л. А. Мальченко, Е. В. Киселева, Э. И. Буеверова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: brodsky.idb@bk.ru

Поступила в редакцию 28.05.11 г.

Окончательный вариант получен 29.11.11 г.

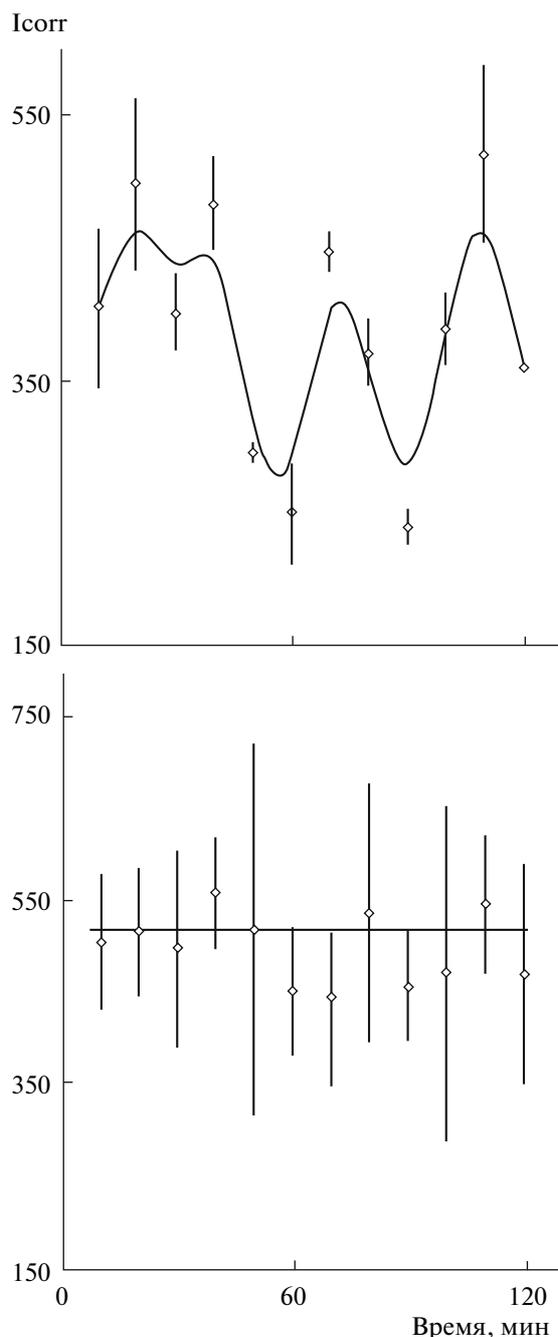
Изучали плотные 5-часовые культуры гепатоцитов крысы и такие же по плотности культуры мезенхимных стромальных клеток (МСК), выделенных из жировой ткани человека или из костного мозга крысы. Клетки содержали в бессывороточной среде на стеклах, покрытых коллагеном. В отличие от гепатоцитов, в МСК не обнаружен ритм синтеза белка. После введения в среду с культурами МСК мелатонина (2 нМ, 5 мин) выявляется ритм. Опыты с хелатором цитоплазматического кальция ВАРГА-АМ и ингибитором протеинкиназ Н7 показали, что механизм организации ритма в МСК кальций-зависимый и определяется фосфорилированием белков.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, гепатоциты, межклеточные взаимодействия, окологасовые ритмы, ритм синтеза белка.

В плотных культурах гепатоцитов и кератиноцитов обнаружен суммарный популяционный ритм синтеза белка (последние работы: Бродский и др., 2006, 2009, 2011). Ритм наблюдали вскоре после смены среды, что показывало самосинхронизацию колебаний интенсивности синтеза в результате прямых межклеточных взаимодействий. В не взаимодействующих клетках (например, в разреженных культурах) ритм не выявлялся. В опытах с агонистами и антагонистами внутриклеточных процессов была обоснована многоступенчатая последовательность взаимодействий между клетками, приводящих к ритму синтеза белка. Сигнал, действуя на специфические рецепторы клеточной мембраны, включал цепь процессов в цитоплазме, приводящих к синхронизации фаз индивидуальных колебаний. Задача новой работы – изучение кинетики синтеза белка в мезенхимных стромальных клетках (МСК) при действии мелатонина. Как и в работах с эпителиальными клетками, ритм синтеза белка в МСК мог быть показателем прямых межклеточных взаимодействий. По некоторым данным (Bizik et al., 2004; Vahegi et al., 2009), фибробласты, в отличие от эпителия, не контактируют друг с другом. Сохраняются ли в фибробластоподобных МСК прямые межклеточные взаимодействия? Способны ли МСК реагировать на внешний синхронизирующий сигнал?

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В основных опытах исследовали МСК, выделенные из биоптатов жировой ткани, полученных после абдоминальной пластики (Киселева и др., 2009). Клетки культивировали в среде ДМЕМ с 10% сыворотки, 5 мкг/мл инсулина, 10 мкг/мл трансферрина и 10 нг/мл селенита натрия. Смену среды осуществляли каждые 3-е суток. По достижении монослоя клетки пассировали с использованием растворов 0.05% трипсина (Панэко) и Версена (Панэко). На 3–4 пассаже клетки замораживали для долгосрочного хранения (при -196°C), в качестве криопротектора использовали 10% ДМСО. Для экспериментов нашей работы клетки размораживали и культивировали в течение 2–3 недель. В работе использовали клетки 8–12 пассажей. Затем клетки снимали с пластика по стандартной методике с помощью растворов Версена и трипсина, клетки суспендировали, центрифугировали 10 мин при 200 g. Клеточный осадок ресуспендировали в бессывороточной среде (среда 199 с добавлением 0.5 мкг/мл инсулина (Sigma) и 0.2 мг/мл альбумина для клеточных культур (Sigma) и далее содержали в этой среде. Суспензию, содержащую около 10^6 клеток в мл среды, вносили в чашку Петри с 30 мл среды над стеклами, покрытыми коллагеном. Через 3 часа культуры отмывали и переносили в свежую среду. Еще через 2 часа культуры вновь отмывали и через 15–60 мин ис-



Кинетика синтеза белка в плотных культурах гепатоцитов крысы (вверху) и в таких же по плотности культурах мезенхимных стромальных клетках человека, выделенных из жировой ткани (внизу). Результаты двух опытов.

По оси абсцисс — время в мин. По оси ординат Icorr — включение ^3H -лейцина в белки с поправкой на пул свободного лейцина.

Каждые 10 мин в течение 2-х ч брали пробы по 3 культуры и в каждой культуре отдельно определяли Icorr (см. Методы).

Прямые линии — среднее Icorr для каждого опыта (36 культур).

следовали кинетику синтеза белка. В части опытов исследовали МСК из костного мозга крысы (Буеверова и др., 2008).

Метод исследования кинетики синтеза белка детально изложен ранее (Brodsky et al., 1992; Бродский и др., 2006). Пробы, по три культуры каждая, брали последовательно через 10 мин в течение 2 ч. Каждую культуру инкубировали отдельно в течение 10 мин при 37°C в среде с ^3H -лейцином (25–30 мкCi/мл, специфическая молярная активность 70–100 Ci/ммоль). Радиоактивность лейцина в белках и небелковой кислоторастворимой фракции, т.е. свободного лейцина в клетках измеряли в каждой культуре, используя сцинтилляционный счетчик LKB 1214 Rackbeta (Швеция). Рассчитывали относительное включение лейцина в белки с поправкой на пул свободного лейцина (формулу для расчетов см. в цитированных выше статьях). Каждый опыт ставили на культурах одной крысы.

Мелатонин в дозе 2 нМ вводили в среду с культурами на 5 мин, после чего культуры отмывали и переносили в свежую среду. Условия опытов с хелатором кальция ВАРТА-АМ и ингибитором протеинкиназ Н7 изложены в Результатах. Достоверность изменений интенсивности синтеза белка оценивали статистически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении 1–3-суточных плотных культур гепатоцитов, через 10–15 мин после их отмывания и помещения в свежую бессывороточную среду выявляли окологоризонтальный ритм синтеза белка (ссылки во Введении). Такой же ритм обнаружен и в 5-часовых культурах; различия между максимумами и минимумами кривой высоко достоверны (например, рисунок). На этой кривой обнаружены два периода. В таких же по плотности культурах МСК ритм не выявляется: все точки аппроксимируются прямой. Но если в среду с такими культурами ввести на 5 мин 2 нМ мелатонина, затем культуры отмыть и перенести в свежую среду без мелатонина, ритм синтеза белка выявляется (таблица). Различия между максимумами и минимумами кинетической кривой не менее достоверны, чем для культур гепатоцитов. Принципиальные отличия между клетками в том, что гепатоциты самосинхронизируются без какого-либо экзогенного сигнала — аутокринно, а для синхронизации МСК требуется экзогенный сигнал, введенный в среду. Такие же результаты получены нами при изучении МСК, выделенных из костного мозга крысы.

Ранее был изучен внутриклеточный механизм синхронизации гепатоцитов и кератиноцитов (ссылки во Введении). В опытах с хелатором цитоплазматического кальция ВАРТА-АМ было показано, что блокирование выброса ионов кальция из внутренних депо ликвидирует ритм в плотных

Примеры кинетики Isoгг – включения ^3H -лейцина в белки поправкой на пул свободного лейцина (срт) в плотные культуры с 10-мин интервалами в течение 2-х часов. В таблице приведены максимумы (макс) и минимумы (мин) кривой¹

Объект	Контроль		Мелатонин		ВАРТА-АМ или Н7 предобработка до мелатонина	
	макс	мин	макс	мин	макс	мин
Гепатоциты	498 ± 66	250 ± 44	561 ± 46	382 ± 06		
	416 ± 15	239 ± 14	674 ± 76	400 ± 32		
	520 ± 68		566 ± 65			
Мезенхимные стромальные клетки	Все точки кривой достоверно не отличаются друг от друга и от средней для всего опыта			204 ± 24		
			437 ± 52	254 ± 07		
			458 ± 14	322 ± 30		
			624 ± 54	214 ± 16		
			2285 ± 106	854 ± 91	Все точки кривой достоверно не отличаются друг от друга и от средней для всего опыта	
			1984 ± 43	1233 ± 112		

¹ На каждой строке слева – Isoгг ± ошибка на первом максимуме кинетической кривой, правее – соответствующий минимум, строкой ниже – следующий максимум и минимум, строкой ниже – следующие значения той же кривой. Кривая может начинаться с минимума.

культурах и снимает синхронизирующий эффект внешних сигналов – ганглиозидов или моноаминов. Инактивация протеинкиназ ингибитором Н7 также ликвидировала ритм синтеза белка в гепатоцитах и кератиноцитах. Также и в исследовании МСК блокирование изменений кальция ВАРТА-АМ (20 мкМ, 1 час) с последующим введением в среду 2 нМ мелатонина полностью снимало синхронизирующий эффект мелатонина. Таким же был результат предобработки культур МСК ингибитором протеинкиназ (в основном, протеинкиназы С) с помощью Н7 (40 мкМ, 1 час).

Какова возможная причина различий организации кинетики синтеза белка в гепатоцитах и МСК? В эпителии нарушение межклеточных связей включает апоптоз (Nagrer et al., 2003). Напротив, экспериментальная инициация контактов между фибробластами приводит к их гибели (Bizik et al., 2004). Влияние связей между фибробластоподобными МСК на их жизнеспособность не ясна. По нашему критерию прямых межклеточных взаимодействий – ритму синтеза белка – такие связи в МСК, во всяком случае, ослаблены сравнительно с эпителием. Но на внешний синхронизирующий сигнал МСК реагируют, причем механизм их синхронизации такой же, как в эпителии: сигнал на мембране → изменения ионов кальция → стимуляция протеинкиназ → фосфорилирование белков.

Благодарим В.С. Михайлова, В.Н. Самирского и В.И. Старостина и О.В. Паюшину за замечания. Авторы благодарят РФФИ за поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бродский В.Я., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Механизм прямых межклеточных взаимодействий. Самоорганизация ритма синтеза белка // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 4. С. 384–393.
- Бродский В.Я., Голиченков В.А., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Мелатонин синхронизирует ритм синтеза белка в культурах гепатоцитов как агонист внутриклеточного кальция и протеинкиназ // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 3. 231–236.
- Бродский В.Я., Терских В.В., Васильев А.В., Звездина Н.Д., Воротеляк Е.А., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Самоорганизация ритма синтеза белка в культурах NaCaT кератиноцитов человека // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 4.
- Буеверова Э.И., Брагина Е.В., Молчанова Е.А. Неадгезивные популяции мезенхимных стромальных клеток // Онтогенез. 2008. Т. 39. С. 420–429.
- Киселева Е.В., Черных Э.С., Воротеляк Е.А., Воложин А.И., Васильев А.В., Терских В.В. Сравнение дифференцировочных потенциалов фибробластоподобных клеток стромы костного мозга, жировой ткани, волосяной луковицы и дермальных фибробластов // Цитология. 2009. Т. 51. С. 12–19.
- Bizik J., Kanhuri E., Ristimaki A., Taieb A., Vaatalo H., Lubitz W., Vaheri A. Cell-cell contacts trigger programmed necrosis and induce cyclooxygenase-2 expression // Cell Death Differ. 2004. V. 11. P. 183–95.

Brodsky V.Y., Boikov P.Y., Nechaeva N.V., Yurovitsky Y.G., Novikova T.E., Fateeva V.I., Shevchenko N.A. The rhythm of protein synthesis does not depend on oscillations of ATP level // *J. of Cell Science*. 1992. V. 103. P. 363–370.

Harper N., Hughes M.A., Farrow S.N., Cohen G.M., MacFarlane M. Protein kinase C modulates tumor-necrosis

factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by targeting the apical events of death receptor signaling // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 44338–97.

Vaheri A., Enzerink A., Rasanen K., Salmenpera P. Nemo1, a novel way of fibroblast activation, in inflammation and cancer // *Exp Cell Res.* 2009. V. 315. P. 1633–38.

Mesenchymal Stromal Cells Synchronize the Rhythm of Protein Synthesis under the Effect of an Exogenous Signal

V. Ya. Brodsky, A. V. Vasil'ev, V. V. Terskikh, N. D. Zvezdina, V. I. Fateeva,
L. A. Mal'chenko, E. V. Kiseleva, and E. I. Bueverova

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: brodsky.idb@bk.ru*

Abstract—A comparative study was performed of dense 5-hour cultures of rat hepatocytes and equal-density cultures of mesenchymal stromal cells (MSC) isolated from human adipose tissue of rat bone marrow. The cells were grown on collagen-coated glass slides in serum-free medium. Unlike in hepatocytes, no rhythm of protein synthesis was initially revealed in MSC, but such a rhythm manifested itself when the culture medium was supplemented with melatonin (2 nM, 5 min). The results of experiments with cytoplasmic calcium chelator BAPTA-AM and protein kinase inhibitor H7 indicate that the mechanism of protein synthesis synchronization in MSC consists in calcium-dependent phosphorylation of cell proteins.

Keywords: mesenchymal stromal cells, hepatocytes, cell interactions, circadian rhythms, protein synthesis rhythm.

Сдано в набор 11.01.2012 г.	Подписано к печати 03.04.2012 г.	Формат бумаги 60 × 88 ¹ / ₈
Цифровая печать	Усл. печ. л. 9.0	Уч.-изд. л. 9.0
	Тираж 96 экз.	Бум. л. 4.5
		Зак. 146

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