

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН (12 □13 д	235	0
<b>БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ</b>			
<input type="checkbox"/>	ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ХОДЕ СОЗРЕВАНИЯ И ЛИГНИФИКАЦИИ КЛЕТОК КСИЛЕМЫ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ Антонова Г.Ф., Вараксина Т.Н., Железниченко Т.В., Стасова В.В.	250	0
<input type="checkbox"/>	ВОЗНИКНОВЕНИЕ ЦИТОМИКСИСА ВЛИЯЕТ НА МИКРОСПОРОГЕНЕЗ У <i>SESAMUM INDICUM</i> L. (PEDALIACEAE) Кумар Г., Ядав Р.С.	261	0
<b>БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ</b>			
<input type="checkbox"/>	АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ЦИТОСТАТИКОВ НА ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ И КЛЕТКИ ТЕРАТОКАРЦИНОМЫ МЫШИ Гордеева О.Ф.	268	1
<b>КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ</b>			
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРА И ИНГИБИТОРОВ $Ca^{2+}$ -КАНАЛОВ НА ПРОЛИФЕРАТНУЮ АКТИВНОСТЬ ИНФУЗОРИЙ <i>TETRAHYMENA PYRIFORMIS</i> Шемарова И.В., Селиванова Г.В., Власова Т.Д.	278	0
<b>МОРФОГЕНЕЗ</b>			
<input type="checkbox"/>	ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РАЗМЕРНОГО ПОЛОВОГО ДИМОРФИЗМА У СОБОЛЯ В ПРИРОДЕ И НЕВОЛЕ Монахов В.Г.	287	2
<b>КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ</b>			
<input type="checkbox"/>	РАННЯЯ ЭМБРИОНАЛЬНАЯ СМЕРТНОСТЬ У ВОДЯНОЙ ПОЛЕВКИ ( <i>ARVICOLA TERRESTRIS</i> L.) Исакова Г.К., Назарова Г.Г., Евсиков В.И.	299	0

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ  
ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН  
(12–13 ДЕКАБРЯ 2011 г.)**

**АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАСОМ В ОПУХОЛЯХ  
ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА:  
СВЯЗЬ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ**

© 2012 г. Ю. В. Богомягова

*Лаборатория биохимии*

Исследование молекулярных механизмов злокачественной трансформации клеток и роста опухолей до сих пор остается одной из самых актуальных проблем биологии и медицины. В связи с этой проблемой наиболее перспективным представляется изучение многофункциональных ферментативных систем. К их числу относятся протеасомы, мультисубъединичные мультипротеазные комплексы, регулирующие клеточные процессы путем гидролиза белков и/или образования пептидов – участников этих процессов. По набору протеолитических субъединиц протеасомы можно разделить на четыре типа: протеасомы, содержащие конститутивные субъединицы X, Y, Z; протеасомы, содержащие иммунные субъединицы LMP7, LMP2, LMP10, протеасомы, содержащие субъединицы X, LMP2, LMP10, и протеасомы, содержащие субъединицы LMP7, Y, Z. При этом субъединицы X и LMP7 проявляют химотрипсин-подобную активность, субъединицы Y и LMP2 – каспаза-подобную активность, субъединицы Z и LMP10 – трипсин-подобную активность. Изменение соотношения указанных типов протеасом приводит к изменению активностей общего пула протеасом. Цель настоящего исследования – изучить изменения каспаза-подобной активности протеасом в различных опухолях щитовидной железы человека по сравнению с контрольными тканями и выявить их возможную

связь с клинико-морфологическими параметрами. В работе использовали послеоперационный материал: фолликулярную аденому и папиллярную карциному на стадиях T<sub>3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> и T<sub>2</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>. Каспаза-подобную активность оценивали по гидролизу флуорогенного коммерческого субстрата Z-Leu-Leu-Glu-AMC. Обнаружено, что каспаза-подобная активность протеасом в фолликулярной аденоме (доброкачественной опухоли) достоверно не изменяется по сравнению с прилежащей тканью (условным контролем). Однако она возрастает в 2.5 раза в папиллярной карциноме на стадии T<sub>3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> (неметастазирующей опухоли) и в 14 раз – на стадии T<sub>2</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub> (метастазирующей опухоли). Таким образом, выявлена связь изменений каспаза-подобной активности протеасом в опухолях с клинико-морфологическими параметрами. С помощью Вестерн-блоттинга показано, что увеличение каспаза-подобной активности в злокачественных опухолях сопровождается изменением соотношения субъединиц, проявляющих эту активность: содержание субъединицы LMP2 увеличивается, в то время как содержание субъединицы Y уменьшается или не изменяется. Дальнейшая разработка данной проблемы может быть полезна для диагностики злокачественных новообразований щитовидной железы человека и для прогнозирования степени их агрессивности.

**МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙРОНОВ  
ТУБЕРОИНФУНДИБУЛЯРНОЙ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ  
ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ В МОЗГУ МЫШЕЙ**

© 2012 г. Е. А. Дегтярева, Т. С. Пронина, М. В. Угрюмов

*Лаборатория гормональных регуляций*

Одним из наиболее широко распространенных нейродегенеративных заболеваний является болезнь Паркинсона (БП), которая развивается в первую очередь в результате гибели дофаминергических (ДА-ергических) нейронов нигростриктной системы мозга, участвующей в регуляции

двигательной (моторной) активности. В последние годы показано, что нейродегенеративный процесс не ограничивается этими нейронами, а распространяется и на другие популяции нейронов, причем расположенные не только в мозгу, но и на периферии, что обуславливает системный

характер БП. Так, в гипоталамусе при БП обнаружены тельца Леви — маркеры дегенерации нейронов и отмечено уменьшение содержания ДА и норадреналина (НА), участвующих в норме в ингибиторном контроле секреции пролактина гипофиза. Дефицит этих химических сигналов приводит к развитию гиперпролактинемии, что и было обнаружено у ряда больных при БП. Совокупность приведенных фактов позволяет предположить, что при БП подвергаются дегенерации и ДА-ергические нейроны тубероинфундибулярной ДА-ергической системы (ТИДА) гипоталамуса. Однако до сих пор не ясно, в какой степени и на каком этапе развития БП страдают ДА-ергические нейроны ТИДА.

Целью данной работы явилась проверка гипотезы авторов, согласно которой развитие паркинсонизма в результате дегенерации ДА-ергических нейронов nigrostriatной системы сопровождается развитием функциональной недостаточности ДА-ергических нейронов ТИДА и гиперпролактинемии. В этом контексте предполагалось охарактеризовать морфо-функциональное состояние ДА-ергических нейронов ТИДА на мышцах линии C57Bl/6, у которых с помощью 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) вызывали

развитие паркинсонизма в досимптомной и ранней симптомной стадиях. Для этого самцам мышей вводили подкожно с двухчасовым интервалом раствор МФТП на 0.9%-ном NaCl в дозе 12 мг/кг двукратно или четырехкратно. На 14-ый день после последней инъекции МФТП определяли уровень катехоламинов в ТИДА с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией и морфологические изменения нейронов ТИДА с помощью иммуноцитохимии.

Проведенное нами исследование не показало изменений в содержании ДА на досимптомной стадии, однако, выявило биохимические изменения (снижение уровня ДА на 50% и увеличение “оборота” ДА на 149% по сравнению с контролем) в ТИДА на экспериментальной модели ранней симптомной стадии паркинсонизма. Однако, при использовании данных моделей досимптомной и ранней симптомной стадий паркинсонизма в ТИДА не были выявлены изменения в числе нейронов и аксонов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ-офи 09-04-12106-офи\_м, РГНФ 09-06-00543а, РФФИ-офи 09-04-13851-офи\_ц.

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ПЕЧЕНИ У МЫШЕЙ

© 2012 г. Л. С. Зиневич

*Лаборатория молекулярно-генетических механизмов онтогенеза*

Целью настоящей работы является определение уровня экспрессии гена ростового фактора ИФР-1 при химическом канцерогенезе печени мышей линии C57Bl6, вызванном введением диэтилнитрозамина. Методом ПЦР в реальном времени показано, что на переходной стадии от аденомы печени к гепатоцеллюлярной карциноме (ГК) и на стадии ГК экспрессия ИФР-1 в опухолевой ткани снижена по сравнению с окружающей ее тканью в 8 ( $p < 0.05$ ) и 10 раз ( $p < 0.001$ ), соответственно, а с тканью печени здоровых мышей стадия ГК различается в 5 раз на ( $p < 0.005$ ). Экспрессия ИФР-1 в ткани, окружающей опухоль, имеет тенденцию к повышению на стадии ГК по

сравнению с тканью печени здоровых мышей ( $p < 0.1$ ). Снижение экспрессии ИФР-1 в опухоли может быть связано с утратой способности к синтезу и секреции этого фактора в кровь, что свойственно нормальным гепатоцитам, а повышение экспрессии ИФР-1 в окружающей ткани может свидетельствовать о паракринной стимуляции роста опухоли ее микроокружением. ИФР-1 имеет изоформы — продукты альтернативного сплайсинга — секретлируемую, выделяемые в кровотоки, и локально-активные, вырабатываемые во многих тканях, в том числе в печени. Получены предварительные данные об экспрессии изоформ ИФР-1 при химическом канцерогенезе печени мышей.

## ИММУННЫЕ ПРОТЕАСОМЫ: КАК “ВЫКРУТИТЬСЯ” В РАЗЛИЧНЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ СИТУАЦИЯХ

© 2012 г. Я. Д. Карпова

*Лаборатория биохимии*

Ежедневно организм млекопитающих подвергается многим опасностям: атакам чужеродных микробов, вирусов, кроме того, собственные клетки могут претерпевать злокачественные преобразования, которые представляют не меньшую угрозу. Миссию по защите организма выполняет

специализированная сложноустроенная система — иммунная система. Она имеет тонкую настройку, поскольку должна не только избавить организм от неприятностей, направив на них полноценный иммунный ответ, но и не навредить, вовремя включив механизм толерантности

к “своему”. Многие работы посвящены поиску ответа на вопрос, каким же образом происходит регуляция иммунной системы? Ясный ответ до сих пор не получен. Мы решили подойти к проблеме, исследуя иммунные протеасомы, особой функцией которых является образование антигенных эпитопов, в различных иммунологических ситуациях: в процессе становления иммунной системы, когда происходит переход от “знакомства со своим” к возможности развития иммунных реакций; в условиях индуцированной донор-специфической портальной толерантности, когда организм становится иммунологически невосприимчивым и не развивает иммунный ответ на чужеродные донорские антигены; в развитии иммунитета против опухоли Walker 256, привитой крысам линии Brattleboro, и при неэффективности иммунной системы против этой опухоли у крыс линии WAG. Методом Вестерн-блоттинга показано, что при становлении иммунной системы в раннем развитии увеличивается экспрессия иммунных протеасом в печени (теряющей статус иммунного органа в неонатальный период) и селезенке (вторичном лимфоидном органе). Причем иммунные протеасомы экспрессируются в этих органах уже в эмбриональном развитии, а при индукции воспаления у матери введением липополисахарида на 12-й день беременности уровень иммунной субъединицы LMP2 увеличивается на фоне падения уровня иммунной субъединицы LMP7 в печени плодов через 5 дней, через 7 дней увеличивается уровень LMP7 на фоне падения уровня LMP2. Таким образом, уже в эмбриональный период возможно вызвать изменение экспрессии иммунных протеасом, что свидетельствует о пластичности моле-

кулярных компонентов развивающейся иммунной системы. Методом иммунофлуоресценции показана связь увеличения количества иммунных протеасом в печени с увеличением их экспрессии в гепатоцитах, а в селезенке — с ее наполняемостью лимфоцитами, обогащенными иммунными протеасомами. Обнаруженные изменения содержания иммунных протеасом сопровождаются изменением химотрипсин- и каспаза-подобной активности протеасом.

Индукция донор-специфической портальной толерантности и последующая трансплантация овариальной ткани под капсулу почки от того же донора приводят к увеличению количества LMP2 в печени и прижившемся трансплантате по сравнению с контрольными образцами и уменьшению количества LMP7 в печени по сравнению с контролем и в прижившемся трансплантате по сравнению с отторгающимся трансплантатом. Показано распределение этих субъединиц по клеткам на срезах трансплантатов.

При исследовании регрессирующей опухоли Walker 256 у крыс Brattleboro выявлено увеличение содержания обеих иммунных субъединиц между 7 и 14-м днями после инъекции опухолевых клеток, что может способствовать обнаружению опухоли иммунной системой. Напротив, в опухоли, развивающейся у крыс WAG и приводящей крыс к гибели, уровень иммунных протеасом не отличается от их уровня в инъецируемых опухолевых клетках.

Таким образом, все исследуемые иммунологические ситуации сопровождаются уникальными изменениями в пуле иммунных протеасом. Соотношение типов иммунных протеасом определяет развитие иммунного ответа или толерантности.

## **ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ В РАЗВИТИИ СОМАТИЧЕСКИХ И ПОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ**

© 2012 г. Д. С. Костюшев, Н. В. Лифанцева, О. Ф. Гордеева

*Лаборатория гистогенеза*

Раково-тестикулярные антигены млекопитающих являются обширным семейством высокоомологичных генов с неизвестной функцией, располагающихся преимущественно на X-хромосоме. Раково-тестикулярные антигены имеют специфический паттерн экспрессии в клетках раковых опухолей различных гистологических типов, тогда как в норме их экспрессия выявлена только в некоторых эмбриональных тканях и семенниках взрослых животных. Среди 250 генов раково-гаметных антигенов, известно около 20 генов семейства MAGE (melanoma antigen) у человека, подразделяющиеся в зависимости от степени гомологии и расположения на X-хромосоме на четыре различных класса. Гены семейства Mage, об-

наруженные в геноме мыши, имеют 60–90% гомологию с генами MAGE человека. Однако на данный момент практически отсутствует информация о функциях генов семейства Mage и их роли в нормальном развитии млекопитающих. Наши предыдущие исследования, а также данных других авторов, показали, что гены семейства MAGE экспрессируются в плюрипотентных клетках и ранних предшественниках соматических и половых клеток человека и мыши. В связи с отсутствием данных об экспрессии генов Mage мыши в литературе и базе данных Mouse Genome Informatics, мы исследовали паттерны экспрессии генов семейства Mage-a и Mage-b в зачатках органов, происходящих из трех зародышевых листков,

и в половых клетках на разных стадиях развития. С помощью методов RT-PCR и real-time RT-PCR были идентифицированы транскрипционные профили генов *Mage-a2*, *-a4*, *-a6*, *-a10* и *Mage-b1*, *-b3*, *-b4*, *-b5* в эпибласте (стадия E 7.5), гонадах, мозге, печени и мышцах (E 10.5, E 13.5). В указанных зачатках органов мышцы был проведен количественный анализ экспрессии изучаемых генов на разных стадиях развития. В результате сравни-

тельного анализа экспрессии генов семейств *Mage-a* и *Mage-b* в разных органах в ходе развития мышцы были получены новые приоритетные данные, которые вносят вклад в понимание роли уникальных семейств генов раково-тестикулярных антигенов в индивидуальном развитии млекопитающих. Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379).

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ТРАНСПОЗИЦИИ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГРУППЫ *gypsy*

### У *Drosophila melanogaster*

© 2012 г. А. Р. Лавренов, Ф. А. Урусов

Лаборатория молекулярной биологии развития, лаборатория генетики животных кафедры генетики  
Биологического факультета МГУ

Мобильные генетические элементы (МГЭ) группы *gypsy* *Drosophila melanogaster* являются ретротранспозонами с длинными концевыми повторами, содержащими три открытые рамки считывания. Высокая транспозиционная активность МГЭ опасна для организма, и потому контролируется геномом хозяина при помощи локуса *flamenco*, локализованного в гетерохроматиновом районе X-хромосомы. В основе подавления транспозиций МГЭ группы *gypsy* используется механизм РНК-интерференции. По-видимому, ген *flamenco* является источником малых РНК, участвующих в сайленсинге МГЭ.

На первых этапах настоящей работы, при помощи метода ОТ-ПЦР, была оценена экспрессия 11 МГЭ группы *gypsy* (*gypsy*, *ZAM*, *Idefix*, *Tirant*, *Quasimodo*, *opus*, *17.6*, *297*, *rover*, *springer*, *Transpac*) в линии с аллелем дикого типа (ДТ) локуса *flamenco* (413) и линиях с генотипом *flamenco* (SS (7K), MS (145), oregon (OreR)). В пределах возможностей метода ОТ-ПЦР мы наблюдали сниженную экспрессию МГЭ группы *gypsy* в линии ДТ по сравнению с линиями с генотипом *flamenco*. Также, более высокий уровень экспрессии МГЭ группы *gypsy* по сравнению с линией ДТ регистрировали в гибридах, полученных от скрещи-

вания линии ДТ с мутантными линиями *dicer* и *piwi*, характеризующимися нарушениями процесса РНК-интерференции (SM5, *Cy/dcr2*<sup>G173E</sup> и SM5, *Cy/piwi*<sup>1</sup>). Гибриды от скрещивания самок линии SS с самцами линии *piwi*<sup>1</sup>: с генотипами *flamenco/flamenco*+; *piwi*<sup>1/piwi</sup><sup>1</sup>+ и *flamenco/Y*, *piwi*<sup>1/piwi</sup><sup>1</sup>+ имели повышенную экспрессию некоторых МГЭ группы *gypsy* (все кроме *gypsy*, *ZAM*, *Tirant*, *rover*) по сравнению с мухами того же потомства с генотипом *flamenco/flamenco*+, *Curly*/+ и *flamenco/Y*, *Curly*/+. В сумме эти данные демонстрируют влияние генов *piwi*, *dicer* и локуса *flamenco* на экспрессию МГЭ группы *gypsy*.

Далее для оценки их возможного взаимодействия в механизме контроля экспрессии МГЭ мы использовали метод ПЦР в реальном времени. Для этого были проанализированы гибриды *flamenco/Y*, *piwi*<sup>1/+</sup> и линия SS (7K). Уровень экспрессии *gypsy* у гибрида *flamenco/Y*, *piwi*<sup>1/+</sup> оказался выше, чем у линии SS (7K), что указывает на комплементарное взаимодействие гена *piwi* и локуса *flamenco* в механизме регуляции транспозиции мобильных генетических элементов группы *gypsy* *Drosophila melanogaster*.

## РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЕ ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *d4* У *Drosophila melanogaster*

© 2012 г. С. Ю. Лафуткина

Лаборатория генетических основ морфогенеза

Ранее нами были исследованы два новых гена дрозофилы — *drosophila-d4* (*dd4*) и *toothrin* (*tth*), кодирующих белки гомологичные членам *d4*-семейства млекопитающих. Геном позвоночных содержит 3 гена семейства *d4*: *neuro-d4*, *ubi-d4/requiem* и *cer-d4*, дифференциально экспрессирующихся в центральной и периферической нервной системе. Белки, кодируемые *neuro-d4* и *cer-d4*, были обнаружены в хроматин-ремодели-

рующих комплексах VAF в нейронах головного мозга мыши. Ген *cer-d4* участвует в эпигенетической регуляции развития сердечной и скелетной мускулатуры позвоночных животных. Белковые последовательности этих генов у дрозофилы в сравнении с гомологичными белками Ubi-d4 и Neuro-d4 млекопитающих имеют наиболее консервативный N-конец (2/3 домен). Центральная часть молекул не содержит доменов Kruppel и

Acidic, характерных для белков млекопитающих и птиц. Кроме того, в отличие от гена *dd4*, ген *tth* не кодирует цинк-связывающий домен, характерный для генов семейства *d4*, однако, в нем присутствуют последовательности, гомологичные N-концевому мотиву, кодируемому геном *neuro-d4* млекопитающих (2/3 домен). Поскольку не известно ни одной мутации генов семейства *d4*, что осложняет их исследование, в лаборатории была разработана удобная модель для продолжения изучения генов семейства *d4* на *D. melanogaster*.

Мы применили новый, получивший распространение в последнее время, подход — направленную инактивацию исследуемых генов с помощью РНК-интерференции, или “нокдаун гена”. Для проведения эксперимента была использована двухкомпонентная система экспрессии UAS/GAL4, разработанная Брэндом и Перимо-

ном (Brand, Perrimon, 1993). В результате генетического нокдауна *dd4* и *tth* были получены мухи с одинаковыми фенотипическими нарушениями, заключающимися в разрастании жилок крыла и появлении дополнительных жилок. У дрозофилы неправильное жилкование предполагает нарушение сигнальных путей Notch и EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) во время формирования периферической нервной системы.

Таким образом, эксперименты по нокдауну генов-ортологов позвоночных животных у дрозофилы — *dd4* и *tth* — выявили доминантно-негативные фенотипы исследованных особей, которые позволили нам предварительно отнести данную группу генов к регуляторам транскрипции, вовлеченным в морфогенетические процессы, контролируемые сигнальными путями Notch и EGFR (рецептор фактора роста эпидермиса).

## РОЛЬ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА TGFbeta В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТЕРАТОКАРЦИНОМНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2012 г. Н. В. Лифанцева, О. Ф. Гордеева

*Лаборатория гистогенеза*

Регуляция самообновления и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток осуществляется с помощью сигнальной сети, обеспечивающей строгий контроль пролиферативных и антипролиферативных стимулов. Нарушения в функционировании и взаимодействиях сигнальных путей приводят к дисбалансу процессов пролиферации и дифференцировки в трансформированных аналогах плюрипотентных стволовых клеток — тератокарциномных клетках. Целью нашего исследования являлся анализ функциональной активности и роли сигнальных путей, инициируемых факторами семейства TGFbeta (ACTIVINA, NODAL, LEFTYB, GDF3, TGFβ1 и BMP4), в плюрипотентных эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) человека линии ESM01 и тератокарциномных клетках (ЭТК) человека линии PA-1. Изучение роста и дифференцировки клеток ESM01 и PA-1 в различных системах культивирования показало, что недифференцированные ЭСК человека являются резистентными к митогенной стимуляции факторами сыворотки, тогда как рост трансформированных клеток усиливался в присутствии факторов сыворотки. Эти данные указывают на различную функциональную активность ERK/MEK и PI3/AKT сигнальных путей в этих клеточных линиях, что приводит к усилению пролиферативной активности ЭТК. Исследования регуляции процессов спонтанной и индуцированной дифференцировки ЭСК и ЭТК человека показали, что функционирование в них сигнальных путей факторов семейства TGF beta

также значительно различаются. Анализ экспрессии генов-компонентов сигнальных путей факторов семейства TGFbeta показал, что в процессе спонтанной и индуцированной дифференцировки ЭСК существенно изменяется экспрессия эндогенных лигандов ACTIVINA, NODAL, LEFTYB и GDF3. В ЭТК уровень экспрессии ACTIVINA, NODAL и GDF3 был значительно ниже, чем в ЭСК и не изменялся при стимуляции дифференцировки. Анализ функциональной активности сигнальных путей факторов TGFbeta в ЭСК и ЭТК показал, что воздействие экзогенного фактора BMP4 не приводит к изменениям роста и дифференцировки в ЭТК, однако стимулирует дифференцировку ЭСК и приводит к снижению экспрессии NODAL, LEFTYB и GDF3. Напротив, стимуляция ЭСК и ЭТК экзогенным фактором ACTIVINA приводила к существенному ингибированию роста обеих клеточных линий, но индуцировала дифференцировку только в ЭСК. Кроме того, обнаружены принципиальные различия в экспрессии эндогенных факторов семейства TGFbeta в ЭСК и ЭТК при их стимуляции факторами ACTIVINA и BMP4. На основании полученных данных мы предполагаем, что снижение функциональной активности сигнальных путей факторов ACTIVINA, NODAL и GDF3 приводят к дисбалансу пролиферации и дифференцировки в ЭТК. Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379).

## ЭКСПРЕССИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ И РЕТИНАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ В ПИГМЕНТНОМ ЭПИТЕЛИИ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА

© 2012 г. Л. А. Милюшина, Б. И. Вердиев,  
А. В. Кузнецова, М. А. Александрова

*Лаборатория проблем регенерации и лаборатория экспериментальной нейробиологии*

Известно, что клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) человека в определенных условиях *in vivo* и *in vitro* могут проявлять мультипотентность и трансдифференцироваться в другие типы клеток. Однако механизмы трансдифференцировки ПЭС человека мало изучены, поскольку основными объектами исследований являются клетки амфибий, грызунов и цыпленка. Данная работа направлена на изучение пластичности клеток ПЭС глаза взрослого человека при помощи иммунопероксидазного и молекулярно-генетического анализа клеточных культур, что позволит расширить фундаментальные представления о процессах их дедифференцировки и индукции в клетки стабильного нейрального пула

Проведенные исследования показали, что в условиях *in vitro* клетки ПЭС претерпевают морфогенетические изменения. В течение культивирования клетки утрачивают экспрессию тканеспецифического гена *RPE65*, и начинают экс-

прессировать маркеры стволовых клеток: *Oct4* (POU5F1), *Nanog*, *Prox1*, *Musashi 1* и *Pax6*, что указывает на их дедифференцировку. Экспрессия генов *Musashi 1* и *Pax6* свидетельствует о дифференцировке клеток РПЭ по нейральному пути. Это подтверждается экспрессией  $\beta$ III-tubulin, маркера нейробластов, и синтезом белков – маркеров дифференцированных нейрональных клеток, рековерина, тирозингидроксилазы и нейрофиламентов. Полученные данные указывают на способность клеток ПЭС глаза взрослого человека к трансдифференцировке в нейральном направлении, что делает их интересным объектом клеточной терапии при нейродегенеративных заболеваниях глаза и мозга.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-00510) и Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 16.512.11.2158).

## КАНАЛЫ СЕМЕЙСТВА TRP В МИОТУБУЛАХ – ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ФУНКЦИЙ И МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ

© 2012 г. Э. Р. Муслихов

*Лаборатория общей физиологии*

Установлено, что в скелетных мышечных клетках реализуются механизмы входа ионов  $Ca^{2+}$ , независимые от потенциалуправляемых каналов. Ранее в нашей лаборатории было показано, что в депозависимом входе  $Ca^{2+}$  в скелетных миотубулах участвует канал *Orail* (Авдонин и соавт., 2008). Поступление  $Ca^{2+}$  в электронеовозбудимых клетках происходит также через каналы семейства TRP.

Целью моей работы было изучение возможной роли каналов TRP в кальциевом обмене в скелетных миотубулах.

Исследования проводили на культурах клеток линии C2C12 (скелетные миобласты, полученные из бедра задней конечности мыши, коллекция ATCC) и *edl mdx* (миобласты, полученные из мышечной линии *mdx* с дефицитом белка дистрофина). Дифференцировку вызывали заменой среды культивирования (DMEM), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, на среду, содержащую 2% лошадиной сыворотки. Измерения уровней экспрессии белков исследуемых каналов проводились при помощи метода количествен-

ной полимеразной цепной реакции. Также проводились количественные измерения поступления ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазму в миотубулах при помощи изотопа кальций-45. Оценка содержания активной формы тирозиновой киназы Src проводилось при помощи Western-гибридизации.

Было показано, что экспрессия каналов TRPC1, TRPV2, TRPV4 и TRPM7 возрастает, либо остается на постоянном уровне в процессе дифференцировки миобластов в миотубулы. Функции их до конца неизвестны, однако имеются данные о том, что каналы TRPV2 являются механочувствительными, а увеличение их активности является одной из основных причин нарушения кальциевого обмена при миодистрофиях. Мы синтезировали siRNA, подавляющую экспрессию TRPV2 и исследовали роль этих каналов во входе ионов кальция, вызванном гипосмотическим шоком. Проведено изучение возможного участия тирозиновой киназы Src в регуляции активности механочувствительных каналов в дифференцирующихся миотубулах.

## РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА ДО ПЛЮРИПОТЕНТНОГО СОСТОЯНИЯ

© 2012 г. И. А. Мучкаева

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Плюрипотентные стволовые клетки обладают бесконечной способностью к самообновлению, а также к генерации всех клеточных типов трех зародышевых листков. Так как потенциальное клиническое применение эмбриональных стволовых клеток неосуществимо ввиду практических и этических проблем, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) могут быть полезным материалом при разработке лекарственных средств и для заместительной клеточной терапии (регенеративной медицины). В качестве исходной культуры мы использовали стволовые клетки амниотической жидкости человека (СК АЖ) ввиду их доступности (клетки получают для пренатальной диагностики пороков развития плода), а также исходя из литературных данных о большей эффективности репрограммирования СК АЖ в сравнении с клетками, выделенными из тканей взрослого. Цель работы заключалась в получении и характеристике иПСК из СК АЖ человека. СК АЖ были трансфицированы лентивирусными

векторами, кодирующими гены плюрипотентного состояния Oct4, Sox2 и Nanog. Первые колонии репрограммированных клеток были обнаружены уже на 5-е сутки после инфицирования. С помощью иммуноцитохимического анализа было выявлено, что исследуемые колонии клеток экспрессировали транскрипционные факторы плюрипотентности: OCT4, SOX2, NANOG, а также поверхностный антиген SSEA-4. Все клоны были положительны по экспрессии щелочной фосфатазы – одного из маркеров плюрипотентного статуса клеток. Было обнаружено, что в исследуемых клетках присутствовала активная теломераза, что говорит о реактивации фермента при репрограммировании. ОТ-ПЦР-анализ показал наличие транскриптов некоторых генов плюрипотентности. Полученные клоны были способны образовывать эмбриоидные тельца и дифференцироваться в производные трех зародышевых листков при индукции дифференцировок *in vitro*.

## КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ДОНЕРВНОЙ СЕРТОНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

*Xenopus laevis* И *Xenopus tropicalis*

© 2012 г. Д. А. Никишин

Лаборатория проблем регенерации, группа эмбриофизиологии

Серотонин (5-НТ), наряду с синаптической передачей, участвует в целом ряде важнейших процессов донервного эмбрионального развития. Однако молекулярно-биологические сведения о донервной серотонергической системе неполны и до сих пор ограничиваются разрозненными исследованиями. Наши предшествующие работы, ставшие первым комплексным исследованием эмбриональной 5-НТ-системы, показали, что на ранних стадиях развития *Xenopus laevis* (от оплодотворения до гаструляции) экспрессируются как рецепторы 5-НТ – HTR2C и HTR7, так и его транспортеры VMAT2 и SERT.

На следующем этапе работы методом ПЦР в реальном времени количественно исследована динамика относительной экспрессии этих генов по отношению к гену орнитиндекарбоксилазы. Относительная экспрессия HTR2C постоянно уменьшается в ходе развития, к стадии нейрулы приближаясь к нулю. HTR7 экспрессируется примерно на одном уровне по крайней мере до стадии нейрулы. Относительная экспрессия VMAT2 существенно не изменяется до стадии ранней гаструлы, после чего резко уменьшается к

стадии нейрулы. Для выяснения пространственной локализации транскриптов были проведены ПЦР в реальном времени на фрагментах ранних зародышей и гибридизация *in situ*. Экспрессия HTR2C и HTR7 распределена равномерно, тогда как VMAT2 имеет выраженный анимально-вегетативный градиент экспрессии. Для того чтобы подтвердить экспрессию этих генов на уровне трансляции, проведена ОТ-ПЦР на пробах полисомной и информсомной фракций РНК, полученных на стадии гаструлы. Оказалось, что транскрипты HTR2C и VMAT2 присутствуют в обеих фракциях, тогда как РНК HTR7 полностью локализована в информосомах, т. е. не транслируется.

Анализ экспрессии ферментов синтеза и деградации серотонина с помощью ОТ-ПЦР показал, что в ходе раннего развития *X. laevis* экспрессируются оба фермента синтеза – триптофангидроксилаза 2 и декарбоксилаза ароматических аминокислот, тогда как основной фермент деградации серотонина моноаминоксидаза А не экспрессируется.

Также был проведен ОТ-ПЦР анализ экспрессии компонентов серотонергической системы в



раннем развитии шпорцевой лягушки *Xenopus tropicalis*. Показано, что на ранних стадиях развития *X. tropicalis* помимо HTR2C и HTR7, экспрес-

сируются также HTR1E, HTR3B и HTR5. Эти рецепторы охватывают все основные механизмы трансдукции 5-НТ-сигнала.

## МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФРОНТАЛЬНЫХ ФИЛАМЕНТОВ ЛИЧИНОК УСОНОГИХ РАКООБРАЗНЫХ (Crustacea: Cirripedia)

© 2012 г. А. Л. Обухова

Лаборатория сравнительной физиологии

Взрослые особи усоногих ракообразных (Cirripedia, Thoracica) — прикрепленные животные, личинки же — планктонная расселительная стадия. Оседание личинок одного вида усоногих происходит в непосредственной близости от взрослых особей того же вида, и в меньшей степени около взрослых особей близкородственных видов. В последнюю очередь заселяются участки свободные от взрослых усоногих, причем при заселении личинки одного вида будут образовывать скопления. Подобное поведение указывает на наличие химической коммуникации между личинками и взрослыми особями усоногих, а также у личинок между собой.

Предполагается, что основной хеморецепторной структурой у личинок усоногих являются фронтальные филаменты (ФФ). Это небольшие “усики”, образующиеся во время первой линьки и расположенные впереди антенн I над лабрумом. Наши исследования с применением сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии и гистохимии показали, что у двух исследованных нами видов *Hesperibalanus hesperius* и *Verruca stroemia* ФФ подразделены на широкую короткую базальную и тонкую длинную дистальную части. У

науплиусов *H. hesperius* сочленение между этими частями имеет вид гармошки, в отличие от науплиусов *V. stroemia*, где оно представлено четкой границей. В ходе личиночного развития форма ФФ не меняется, они растут пропорционально телу личинки. Кутикула ФФ в 4 раза тоньше кутикулы на внешней стороне лабрума, и в 2 раза тоньше кутикулы щетинки, имеющей такой же диаметр, как и филамент. К основаниям ФФ подходят собственные мускулы, видеозапись показала, что ФФ являются весьма подвижными структурами. На кончике филаментов обнаруживаются выросты и ямки различной формы. Часто кончик ФФ разделен на две части, одна из которых представляет собой вырост, а на втором имеется ямка. Кроме того, у большей части исследованных науплиусов вдоль всей дистальной части ФФ проходит борозда.

Полученные нами морфологические данные подтверждают предположение о хеморецепторной функции ФФ. Для проверки их участия во внутривидовой коммуникации планируется провести эксперименты в условиях лабораторной культуры.

## ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ЭНТОДЕРМЫ

© 2012 г. О. С. Петракова, Е. С. Черниогло, А. В. Васильев, В. В. Терских

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

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

Целью работы является изучение способности клеток слюнной железы мыши к трансдифференцировке *in vitro* в гепатоцитарном направлении для изучения фенотипической пластичности клеток в пределах одного зародышевого листка.

**Материалы и методы.** Работа проводилась на самцах мышей линии ROSA26-LacZ 2–5 месячного возраста. Эпителиальные протоковые клетки подчелюстной слюнной железы и печеночные клетки-предшественники были выделены по оптимизированной методике. Сравнительная оцен-

ка культур проводилась в 2d и 3d условиях на 1–2 пассажах. Была оценена скорость удвоения клеточной популяции, морфологические и иммуноцитохимические характеристики (CD49f, наличие цитокератинов 7, 14, 18, 19, ядерных белков HNF4b, HNF3b, альбумина, альфафетопротеина, цитохромов P450), ОТ-ПЦР клеток, реакция клеток на воздействие деметилирующих агентов (5-азациитидина и вальпроевой кислоты). Затем проводилась дифференцировка клеток слюнной железы в гепатоцитарном направлении.

**Результаты.** Выделенные клетки проявляли свойства эпителиальных клеток энтодермального происхождения, обладали высокой пролиферативной активностью. В 3d условиях способность к дифференцировке увеличивалась. При воздействии деметилирующих агентов изменение про-

филя экспрессии клеток было различным: в клетках слюнной железы увеличивалась экспрессия некоторых гепатоцитарных маркеров (альфафетопротейна, цитохрома Р450, альбумина), в то время как в печеночных клетках-предшественниках экспрессия этих маркеров либо не изменялась (альфафетопротейн), либо снижалась (цитохром Р450). После дифференцировки клеток слюнной железы в гепатоцитарном направлении повышалась экспрессия альбумина и альфафетопротейна. Экспрессия цитокератина 19 снижалась, что

говорит о дифференцировке в гепатоцитоподобные клетки.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о значительном сходстве протоковых клеток слюнной железы мыши и печеночных клеток-предшественников. Эти клетки, по всей видимости, являются родственными по своему гистогенетическому происхождению и имеют общего энтодермального предшественника. Дифференцировка клеток слюнной железы направляет их в гепатоцитоподобные клетки.

## МЕХАНИЗМЫ ПОСТУПЛЕНИЯ $Ca^{2+}$ В САТЕЛЛИТНЫЕ КЛЕТКИ, ЛОКАЛИЗОВАННЫЕ НА МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКНАХ КРЫСЫ

© 2012 г. В. А. Почаев

Лаборатория биофизики развития

Сателлитные клетки являются резидентными стволовыми клетками скелетных мышц и активно участвуют в процессах репарации и регенерации синцитиальных мышечных волокон в течение всей жизни организма. Особенностью мышечной ткани является ее способность к возбуждению (и передаче возбуждения) и сокращению. Оба этих процесса тесно связаны с регуляцией кальциевого обмена посредством ацетилхолиновых и дигидропипридиновых рецепторов.

Целью работы было изучение регуляции потоков  $Ca^{2+}$  в сателлитных клетках, тесно прилегающих к плазмолемме мышечного волокна. Объектом исследования были мышечные волокна крысы, изолированные из мышц конечности (*m. flexor digitorum brevis* – короткий сгибатель пальцев) методом энзиматического расщепления и культивируемые на полистирольном пластике. Из полученных ранее данных следует, что потенциалзависимые кальциевые каналы L-типа обнаруживаются в миобластах линии С2С12 (Красный, Озернюк, 2010, 2011). Вместе с тем известно, что ацетилхолиновые рецепторы, основные активаторы L-каналов, присутствуют на поверхности не только терминально дифференцированных волокон, но и пролиферирующих миобластов уже после нескольких часов культивирования. Экспонирование этих рецепторных комплексов на поверхности сателлитных клеток, локализованных непосредственно на волокне и находящихся в состоянии пролиферативного покоя, ранее не было показано. Напротив, получен-

ные нами данные отчетливо свидетельствуют, что эти клетки экспрессируют никотиновые ацетилхолиновые рецепторы. Сателлитные клетки отвечают на воздействие карбахола (до 0.1–1 мМ), синтетического более селективного аналога ацетилхолина, мощным входом  $Ca^{2+}$  внутрь клетки. Этот процесс – следствие сопряжения эффекта деполяризации плазмолеммы с активацией ионотропных ацетилхолиновых рецепторов и потенциалчувствительных кальциевых каналов. В опытах с применением селективных ингибиторов L-каналов – верапамиллом и амлодипином, в концентрациях 10–100 мкМ, наблюдаемый выше эффект практически отсутствует. Адреналин (1–10 мкМ), неселективный активатор всех адренергических рецепторов, также вызывал вход  $Ca^{2+}$  через каналы L-типа предположительно по цАМФ-зависимому пути. Таким образом, как минимум два вышеописанных пути активации кальциевых каналов L-типа характерны для сателлитных клеток. При этом волна деполяризации на данной клетке индуцирует волну деполяризации на прилегающем волокне с максимальным входом  $Ca^{2+}$  в области контакта волокна с сателлитной клеткой. Поступление  $Ca^{2+}$  в точке соприкосновения моментально приводит к частичной контракции и перегибу волокна. При этом действие дантролена, селективного ингибитора рианодиновых рецепторов (RyR1, RyR3), в концентрации 250 мкМ не отменяет контрактильного эффекта.

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРОМОТОРНОГО УЧАСТКА ГЕНА *Dras1* В ГРУППЕ ВИДОВ *Drosophila virilis*

© 2012 г. П. А. Прошаков, М. И. Барсуков, А. И. Чекунова

Лаборатория генетики

Группа *Drosophila virilis* обладает широким спектром самых разнообразных изолирующих

механизмов и представляет собой удобную модель для описания процессов молекулярной эво-

люции на начальных стадиях дивергенции. Нами исследована изменчивость нуклеотидной последовательности промоторного и 5'-нетранслируемого (5'-UTR) районов гена *Dras1* у близкородственных видов дрозофил группы *virilis*.

Продукт изучаемого гена — белок Ras1 — является важной сигнальной молекулой, выполняющей функции трансмиттера в каскадах, запускающих клеточное деление. Семейство Ras белков участвует в регуляции и координации многих ключевых процессов жизни клеток, что объясняет высокую интенсивность исследований генов этого семейства. Ген *Dras1* активно функционирует на важнейших этапах онтогенеза у всех эукариот и, в частности, у дрозофил — в эмбриогенезе и на стадии куколки при метаморфозе, когда необходимо обеспечить массовые процессы пролиферации клеток.

Мы провели секвенирование ДНК гена *Dras1* близкородственных видов *Drosophila* группы *virilis* (*D. virilis*, *D. americana*, *D. americana-texana*, *D. lummei*, *D. ezoana*, *D. kanekoi*, *D. lacicola*, *D. montana*) из коллекции лаборатории генетики Инсти-

тута биологи развития им. Н.К. Кольцова РАН. Средняя длина секвенированных участков гена по каждому виду составила примерно 1000 н.п. Для аналитических работ было использовано программное обеспечение LaserGene и MEGA 5. Последовательности гена *Dras1* выравнивали методом Clustal W.

Выполнен сравнительный анализ последовательностей гена *Dras1* между собой и с последовательностями *D. melanogaster*, *D. simulans* и *D. mauritiana*. Анализ последовательностей промоторной области и 5'-UTR в геномах различных видов дрозофил группы *virilis* показал, что эти области характеризуются значительным полиморфизмом, быстро нарастающим по мере роста генетической дистанции между видами. Для группы видов *virilis* выявлены групповые и видоспецифические особенности первичных последовательностей гена *Dras1*, включая единичные замены, инсерции и делеции. Обнаруженный нами полиморфизм подобен наблюдаемому в группе *melanogaster* (Gasperini, Gibson, 1999).

## ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ХВОСТА ТРИТОНА В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ГРАВИТАЦИОННОЙ НАГРУЗКИ

© 2012 г. Е. А. Радугина

Лаборатория проблем регенерации

Представители отряда Хвостатые амфибии известны своими уникальными регенерационными способностями. В ходе эпиморфной регенерации хвоста *Pleurodeles waltl* полностью морфологически и функционально воспроизводятся спинной мозг, скелетные структуры и мышцы хвоста, что позволяет использовать эту модель для изучения механизмов морфогенеза при регенерации. В процессе экспериментов по регенерации на борту российских спутников Фотон М2, М3 (2005, 2007 гг.) выяснилось, что у тритонов, содержащихся на субстрате, в отличие от животных в глубокой воде в аквариуме или на орбите в условиях невесомости, происходит изменение формы регенерирующего хвоста, а именно его изгиб в дорсовентральной плоскости. Изменение морфогенеза хвоста при содержании на субстрате было показано и в последующих лабораторных экспериментах. Эксперимент 2010 года, в котором дополнительно к аквариальным (low g) и субстратным (1 g) условиям содержания создавались условия перегрузки 2g, показал сходный эффект в группах 1g и 2g. Изображения полученных регенератов были проанализированы морфометрическими методами, а

для группы на субстрате и аквариального контроля была получена динамика изменения морфометрических параметров в течение 50-ти дней регенерации. Достоверное изменение формы хвоста в группах 1g и 2g регистрировалось с III стадии регенерации по Iten, Bryant (1976). Были показаны отличия в гистологическом строении таких регенератов в сравнении с контролем, обуславливающие изменение формы хвоста, а именно изгиб осевых структур (хорды и эпендимной трубки) и направленная конденсация клеток дорсальной бласты. С помощью иммунохимического определения включения БрДУ на срезах регенератов были визуализированы делящиеся клетки, и произведен их подсчет в разных зонах регенератов. В группе на субстрате по сравнению с контролем достоверно большее число клеток входило в S-фазу в апикальной зоне эпидермиса. Также в группе на субстрате наблюдалась тенденция к повышению доли меченых клеток на дорсальной стороне эпидермиса и подлежащей мезенхимы. Методом TUNEL в эпидермисе и бласте через 7 и 14 п/оп. были визуализированы клетки, претерпевающие апоптоз. Таким образом, апоптоз не

только, наравне с некрозом, участвует в перестройке тканей вскоре после повреждения, но также присутствует в пролиферирующей бластеме. В дальнейшем планируется провести количественный анализ соотношения пролиферации,

гибели и миграции клеток, что позволит охарактеризовать клеточные механизмы регуляции морфогенеза и получить необходимые данные для изучения стоящих за ними молекулярных механизмов.

## **ИНТЕГРИНЫ И БЕЛКИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В НОРМАЛЬНОМ МОРФОГЕНЕЗЕ ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57Bl6**

© 2012 г. А. Л. Риппа

*Лаборатория проблем клеточной пролиферации*

Взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом играют существенную роль в морфогенезе волосяного фолликула (ВФ). Их изучение позволит не только продвинуться в понимании клеточных механизмов фолликулогенеза, но и облегчить создание более совершенных систем культивирования для индукции формирования ВФ *in vitro*. Целью нашего исследования является изучение экспрессии белков внеклеточного матрикса и рецепторов к ним в процессе формирования ВФ у мышей линии C57Bl6. В норме в развитии ВФ выделяют 8 стадий. Ранним свидетельством начала морфогенеза ВФ является образование эпителиальных плакод и нижележащих дермальных конденсатов. Далее эпителиальная плакода инвагинирует и окружает дермальный конденсат, который впоследствии называется дермальной папиллой (ДП).

Проведенные нами исследования показали, что эпидермальные плакоды отличаются пролиферативной активностью, судя по экспрессии маркера пролиферирующих клеток Ki67. На 18.5 сутки эмбрионального развития мышей развивающиеся ВФ характеризуются экспрессией кератина 5 и заметной ассиметричной экспрессией E-кадгерина. Дермальная составляющая была нами четко идентифицирована по эндогенной экспрессии щелочной фосфатазы и p75, рецепто-

ра к нейротропинам. Базальные кератиноциты интерфолликулярного эпидермиса, плакоды будущих ВФ и наружные корневые влагалиты экспрессируют  $\alpha 5\beta 1$  и  $\alpha 1\beta 1$  интегрин. Вышеперечисленные интегрин интенсивно экспрессируются эмбриональными дермальными клетками, прилегающими к зоне базальной мембраны и клетками ДП. Ламинин 5 экспрессируется в интерфолликулярной базальной мембране, а также в базальной мембране окружающей формирующиеся ВФ. Коллаген IV типа экспрессируется дермальными клетками, прилегающими к базальной мембране. Фибронектин экспрессируется эмбриональными дермальными фибробластами. Витронектин экспрессируется базальными кератиноцитами, эмбриональными дермальными клетками и эндотелиальными клетками кровеносных сосудов.

Полученные данные позволяют охарактеризовать морфогенез ВФ мышей линии C57Bl6 с точки зрения экспрессии белков внеклеточного матрикса и матрикс-клеточных взаимодействий. Начато сравнительное изучение морфогенеза ВФ между линией C57Bl6 и мутантами (двойными гомозиготами *we/we wal/wal*), имеющими к 21 суткам постнатального развития четко выраженную алопецию, дегенерацию ВФ и гипертрофированные сальные железы.

## **ИЗМЕНЕНИЕ СУБЪЕДИНИЧНОГО СОСТАВА ПРОТЕАСОМ В РАЗВИТИИ ПОРТАЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ У КРЫС ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

© 2012 г. А. А. Степанова

*Лаборатория биохимии*

Молекулярные механизмы развития портальной толерантности (отсутствия иммунной реакции на аллогенный трансплантат после введения клеток донора в портальную вену печени реципиента) до настоящего времени остаются неизвестными. Возможными участниками этого явления

могут быть протеасомы — мультисубъединичные комплексы, предназначенные для избирательной деградации клеточных белков. Разнообразие форм протеасом определяется, во-первых, способностью коровой 20S частицы присоединять различные регуляторы (РА700, РА28 и др.), во-

вторых, возможностью встраивания в коровую частицу различных  $\beta$ -субъединиц, конститутивных или иммунных. Цель данной работы – выяснить, какие изменения происходят на уровне экспрессии различных форм протеасом у крыс с аллогенной трансплантацией ткани щитовидной железы при индукции донор-специфической толерантности (ДСТ). Эксперименты проводили на 3–4 месячных самках крыс Вистар (доноры) и Август (реципиенты). Исследовали 3 группы животных: 1 – интактный контроль, 2, 3 – животные, у которых удаляли собственную щитовидную железу и через 7 сут проводили трансплантацию щитовидной железы донора под капсулу почки. Одной из опытных групп за 7 дней до трансплантации вводили спленоциты донора в портальную вену печени, у другой группы не вызывали ДСТ. Через 30 сут после трансплантации в печени (органе, где индуцируется толерантность), селезенке (вторичном лимфоидном органе) и трансплантате щитовидной железы методом иммуноблоттинга определяли уровень экспрессии субъединиц протеасом: смеси  $\alpha$ -субъединиц – маркера тотального пула протеасом, иммунных субъединиц LMP2 и LMP7; Rpt6 – маркера 19S (PA700) регуляторного комплекса, и PA28 $\alpha$  – маркера 11S (PA28) активатора протеасом.

У животных, которым проводили трансплантацию, в ткани щитовидной железы увеличивается экспрессия иммунных субъединиц протеасом

LMP2 и LMP7 на фоне снижения тотального пула протеасом и активатора PA700 по сравнению с контрольной группой животных. При этом у крыс с индукцией ДСТ в ткани щитовидной железы экспрессия иммунных протеасом, содержащих субъединицу LMP2, вдвое превышает таковую в ткани щитовидной железы, трансплантированной крысам без индукции ДСТ. Экспрессия иммунных протеасом, содержащих субъединицу LMP7, напротив, вдвое выше в ткани щитовидной железы, трансплантированной крысам без индукции ДСТ. Как и в ткани щитовидной железы, в печени животных, которым проводили трансплантацию, наблюдается снижение уровня экспрессии тотального пула протеасом и активатора PA700. В селезенке животных, которым трансплантировали ткань щитовидной железы, обнаружено увеличение уровня активатора PA28 протеасом как в условиях с индукцией ДСТ, так и в условиях без индукции ДСТ, что может отражать развитие иммунной реакции на трансплантат во вторичном лимфоидном органе.

На основании этих результатов сделано заключение о возможной неиммунной функции иммунных протеасом, содержащих субъединицу LMP2, важной для приживания трансплантата, и об иммунной функции иммунных протеасом, содержащих субъединицу LMP7, важной для отторжения трансплантата.

## КОНСТРУИРОВАНИЕ мРНК ГЕНОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ *Oct4*, *Sox2 in vitro*, ДЛЯ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2012 г. Р. Р. Файзуллин, Э. Б. Дашинимаев

*Лаборатория проблем пролиферации*

Репрограммирование клеток человека является бурно развивающимся направлением клеточной биологии с перспективой использования в регенерационной биомедицине. Полагают, что при помощи данных методов станет возможным получение культур пациент-специфических клеток самого широкого спектра. Так, например, в 2007 г. были проведены первые работы по получению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи человека (Takahashi et al., 2007). Самым распространенным методом репрограммирования клеток в настоящее время является метод вирусной трансфекции генов транскрипционных факторов, управляющих путями развития клеток. Однако данный метод обладает рядом недостатков, таких как неуправляемая модификация генома клеток-мишеней и относительно низкая эффективность, что представляет собой серьезное препятствие на пути к практическому использованию. Одним из возможных путей решения этой проблемы явля-

ется использование метода трансфекции мРНК репрограммирующих генов, позволяющего избежать каких-либо модификаций генома. Как было показано в недавних работах (Warren et al., 2010) метод обладает высокой эффективностью.

Цель нашей работы состоит в разработке метода репрограммирования соматических клеток человека до плюрипотентного состояния, при помощи введения мРНК генов *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*. В ходе проведения работы была освоена методика синтеза зрелой мРНК *in vitro*. С целью придания устойчивости мРНК к воздействию рибонуклеаз и уменьшению цитотоксического действия, использовали модифицированные рибонуклеотиды – псевдоуридин и 5'-метил-цитозин. При помощи введения мРНК гена флуоресцентного белка EGFP с последующим анализом на проточном цитофлуориметре, были отработаны методы введения мРНК в фибробласты кожи человека. Было показано, что модификация мРНК значительно повышает уровень экспрессии белка. Были опре-

делены оптимальное количество мРНК для трансфекции, соотношение мРНК/липофетамин и период распада вводимой мРНК. Сконструированы модифицированные мРНК генов плюрипотентности *Oct4* и *Sox2*, эффективность

которых была проверена при помощи иммуноцитохимии. В дальнейшей работе предстоит проведение экспериментов по репрограммированию соматических клеток человека до плюрипотентного состояния.

## СТРОЕНИЕ СЕРОТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ И ДЕЙСТВИЕ СЕРОТОНИНА НА ЛОКОМОЦИЮ У АРХИААННЕЛИД СЕМЕЙСТВА *DINOPHILIDA*

© 2012 г. Е. Г. Фофанова

*Лаборатория сравнительной физиологии*

Общепризнанно, что серотонин (5-НТ) активирует биение ресничек самых разных ресничных структур как у взрослых беспозвоночных и позвоночных животных, так и у всех изученных личинок беспозвоночных. Архианнелиды семейства *Dinophilida* представляют в этом отношении особый интерес, так как в результате педоморфоза половозрелое животное одновременно обладает многими чертами личинки. В своей работе мы провели сравнительное изучение строения 5-НТ системы у двух видов: *Dinophilus gyrociliatus* и *Dinophilus taeniatus*, а также исследовали влияние 5-НТ на ресничную скользкую локомоцию ювенилей и взрослых особей *D. gyrociliatus*.

Совместное иммуноцитохимическое маркирование нервных и ресничных структур выявило отличия в строении 5-НТ системы у двух видов, в то время как ресничные локомоторные структуры были принципиально сходны. Так, у *D. taeniatus* в головном отделе тел нейронов не выявляется, есть сплетение отростков, образующее нейропилль. В туловищном отделе вдоль всего тела проходят 5 продольных вентральных стволов, сеть отростков с варикозами расположена непосредственно под вентральной ресничной полоской. На границах между сегментами стволы соединены коннективами, в местах их отхождения выяв-

ляются скопления тел нейронов. У *D. gyrociliatus* антитела к 5-НТ маркируют около десятка тел нейронов в церебральном ганглии. В туловищном отделе выявляется мощный плексус с телами нейронов и их отростками под вентральной ресничной полоской. В каждом сегменте от плексуса отходит кольцевой нерв, расположенный под ресничным кольцевым шнуром. Разницы в строении 5-НТ системы у ювенильных и взрослых особей обнаружено не было. Под действием низких концентраций 5-НТ ( $10^{-7}$ – $10^{-12}$  М) скорость скользкой локомоции у ювенильных особей *D. gyrociliatus* повышалась в 2–3 раза, в то время как добавление тех же концентраций 5-НТ взрослым животным концентрационно-зависимо замедляло локомоцию, вплоть до полной остановки.

Таким образом, установлено существенное различие в базовом строении 5-НТ системы у двух близких видов *Dinophilus*, а также показано парадоксальное (замедляющее) действие 5-НТ на ресничную скользкую локомоцию взрослых особей *D. gyrociliatus*. Выяснение причин и механизмов обнаруженного парадоксального действия серотонина на локомоцию архианнелид является задачей наших дальнейших исследований.

## КОМПЕНСАТОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ НИГРОСТРИАТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ

© 2012 г. Г. Р. Хакимова, Е. А. Козина, А. Я. Сапронова, М. В. Угрюмов

*Лаборатория гормональных регуляций*

Считается, что одним из возможных компенсаторных механизмов, обеспечивающих длительный период бессимптомного течения болезни Паркинсона, является снижение обратного захвата дофамина (ДА) нейронами нигростриатной системы из внеклеточной среды.

**Цель:** оценить величину обратного захвата ДА из внеклеточной среды в нейроны нигростриатной системы при моделировании различных стадий паркинсонизма у мышей.

**Материалы и методы:** работа проведена на двух моделях болезни Паркинсона (досимптомной и ранней симптомной), получаемых путем системного введения по различным схемам самцам мышей линии C57BL/6 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) в дозе 12 мг/кг. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с протоколом, утвержденным комитетом по охране животных Института биологии развития РАН, находящимся в соответствии с на-

циональными и международными законами и правилами.

Из срезов мозга выделяли компактную часть черной субстанции (ЧС) и стриатум, переносили в инкубационные камеры, заполненные Кребс-Рингер буфером. В часть камер перед добавлением  $H^3$ -ДА вносили ингибитор дофаминового транспортера (ДАТ) – номифензин. Специфический захват ДА (через ДАТ) определяли как разницу между общим захватом (камеры с  $H^3$ -ДА) и неспецифическим (камеры с  $H^3$ -ДА и номифензином).

**Результаты:** модель досимптомной стадии паркинсонизма характеризуется 26%-м уровнем дегенерации ДА-ергических нейронов и 59%-м – ДА-ергических волокон нигростриатной системы; ранняя симптомная – 43 и 68%-м уровнем соответственно.

После введения МФТП в обеих моделях в срезах ЧС не происходит изменений в величине захвата экзогенного ДА. В срезах стриатума в модели досимптомной стадии наблюдается небольшое, но статистически достоверное повышение специфического захвата ДА. Однако при перерасчете на тело одного нейрона или одного волокна оказалось, что величина специфического захвата ДА на обеих моделях значительно увеличена по сравнению с контролем.

**Выводы:** дегенерация ДА-ергических нейронов в досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма сопровождается увеличением обратного захвата ДА сохранившимися нейронами – волокнами и телами.

Работа проведена при поддержке грантов: РФФИ-офи 09-04-12106-офи\_м, ФНМ.

## ИНДУЦИРОВАННОЕ УСКОРЕНИЕ РАЗВИТИЯ ЛИЧИНОК МИДИИ *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia)

© 2012 г. А. К. Чабан, Е. Г. Ивашкин, М. Ю. Хабарова

*Лаборатория сравнительной физиологии*

Двустворчатые моллюски семейства Mytilidae имеют большое экологическое и практическое значение как объекты промысла, аквакультуры и обрастатели подводных частей судов и сооружений. Ранее нами было показано, что при добавлении в среду культивирования модулятора FMRFамидергической системы неомидина выживаемость личинок увеличивается в 8–10 раз и около 6% личинок достигают в 1.5–2 раза больших размеров, чем самые крупные в контроле. В настоящей работе проводилось подробное исследование морфологии личинок аномально крупных размеров для выяснения вопроса, находятся ли они на более поздней стадии развития или просто увеличены в размерах.

Иммуноцитохимическое исследование мышц показало, что у более крупных личинок, появляющихся в воде с добавлением неомидина, происходит существенное изменение морфологии мышечной системы по сравнению с остальными личинками, а именно: деградация мышц вельюма, формирование жаберных мышц и мышц обоих ад-

дукторов. Сканирующая электронная микроскопия таких особей выявила появление характерных колец роста на раковине, отсутствующее у контрольных животных и присущее раковинам взрослых особей. Выявленные морфологические характеристики означают, что у личинок аномально большого размера начался процесс метаморфоза и они, действительно, находятся на более продвинутой стадии развития – стадии педивелигера, готового к оседанию. Подобные изменения проявлялись на 10–14 день после оплодотворения, то есть личинки достигали стадии педивелигера в 2 раза быстрее, чем в норме. Эти выводы также подтверждает наблюдаемая смена способа передвижения этих личинок с ресничного на мышечный.

Таким образом, наши данные демонстрируют, что FMRFамидергическая система задействована в регуляции личиночного развития и ее направленная модуляция позволяет значительно ускорить процессы развития и метаморфоза в культуре личинок мидии.

## СВЯЗЬ МИТОХОНДРИЙ С ВИМЕНТИНОМ ЛЕЖИТ В ОСНОВЕ ПОЛЯРИЗАЦИИ МИГРИРУЮЩИХ КЛЕТОК

© 2012 г. И. С. Черноиваненко

*Лаборатория экспериментальной эмбриологии*

Виментиновые промежуточные филаменты (ПФ) является одним из важнейших компонентов мигрирующих клеток. Однако до сих пор функции виментина в мигрирующих клетках остаются неясными.

Одним из главных свойств мигрирующих клеток является их поляриность, которая определяет направление движения. Поляризация клетки заключается в формировании асимметричной морфологии с выраженным лидирующим и отстаю-

щим (задним) краем. На переднем крае происходит полимеризация сети актина, а на заднем — сокращение акто-миозиновых стресс-фибрил и подтягивание тела клетки к переднему краю.

Недавно было показано, что в мигрирующих клетках наблюдается неравномерное распределение пероксида водорода. На лидирующем крае его концентрация выше, чем в задней части клетки. Считается, что такое распределение пероксида водорода в клетках определяет направление миграции. Одним из важных источников пероксида водорода являются митохондрии. Разное содержание перекиси может быть связано с тем, что в митохондриях, находящихся в разных частях клетки, образуется разное ее количество.

Мы предлагаем гипотезу о возможном участии виментиновых ПФ и митохондрий в определении поляризованного фенотипа мигрирующих клеток. Эта гипотеза основана на том, что митохондрии в разных частях мигрирующей клетки обладают разным потенциалом и, соответственно, могут производить разное количество пероксида

водорода. Такие различия в свойствах митохондрий наблюдаются только в клетках содержащих виментин. Это обусловлено тем, что связь виментиновых ПФ с митохондриями меняет их потенциал. В передней части мигрирующей клетки митохондрии слабее связаны с виментином, поэтому они обладают меньшим потенциалом и образуют больше пероксида водорода, чем митохондрии в задней части клетки, которые сильнее связаны с виментином.

Таким образом, в мигрирующих клетках взаимодействие виментиновых ПФ с митохондриями может обеспечивать асимметричное распределение митохондрий, обладающих разным потенциалом и производящих разное количество пероксида водорода, участвуя в определении поляризованного фенотипа мигрирующих клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук, РФФИ (грант № 06-04-48452-а и № 10-04-00414-а) и программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

## РЕЦЕПТОРЫ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ МИГРАЦИИ НЕЙРОНОВ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ ГОНАДОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ ГОРМОН, У МЫШЕЙ

© 2012 г. В. С. Шарова

*Лаборатория гистогенеза*

Инфицирование в период беременности оказывает влияние на формирование и дальнейшее функционирование различных систем мозга. Стимуляция иммунной системы матери бактериальными эндотоксинами может затрагивать дифференцировку нейронов, синтезирующих гонадотропин-релизинг гормон (ГРГ-нейронов). Возможными медиаторами этого воздействия могут быть провоспалительные цитокины. Ранее нами было показано, что в сыворотке крови матери концентрации цитокинов таких, как ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО $\alpha$ , ЛИФ и белка хемотаксиса моноцитов (MCP-1), значительно увеличиваются после введения липополисахарида (ЛПС) уже через 1.5 ч. В биологических жидкостях плода также наблюдается 2–7-кратное увеличение уровня отдельных цитокинов воспаления. Целью данной работы явилось исследовать влияние ЛПС на миграцию ГРГ-нейронов у мышей, а также из смеси различных цитокинов выявить цитокины воспаления и экспрессию их рецепторов, влияющих на развитие ГРГ-нейронов. Гормон в нейронах определяли у 15- и 19-дневных плодов мышей на сагиттальных срезах мозга иммуногистохимически с помощью иммуно-флуоресцентного мечения.

Показано, что внутрибрюшинное введение ЛПС самке мышей (45 мкг/кг) на 12-й день беременности приводит к снижению общего количества ГРГ-нейронов в переднем мозгу 15-дневных плодов на 46% и 19-дневных плодов на 15%, сравнимое с таковыми у крыс. Для выявления цитокинов воспаления использовали двойное иммунофлуоресцентное мечение на ГРГ и рецепторы цитокинов к ИЛ-6 и MCP-1 на сагиттальных срезах мозга у 12–13-дневных плодов мышей. Показана экспрессия рецепторов к цитокину ИЛ-6 на миграционном пути ГРГ-нейронов в назальной области головы, а именно на обонятельных и вомероназальных нервах. Экспрессия рецепторов к ИЛ-6 в переднем мозгу была выявлена в областях, где мигрирующие ГРГ-нейроны не обнаруживались. Таким образом, нарушение интраназальной миграции ГРГ-нейронов на ранних сроках развития у плодов мышей регулируется экспрессией рецепторов к цитокину воспаления ИЛ-6. По нашим предварительным данным в реализации данного эффекта участвует также MCP-1. По-видимому, внутримозговая миграция ГРГ-нейронов контролируется другими механизмами. Исследования в данном направлении продолжаются.



УДК 581.19:577.13

## ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ХОДЕ СОЗРЕВАНИЯ И ЛИГНИФИКАЦИИ КЛЕТОК КСИЛЕМЫ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© 2012 г. Г. Ф. Антонова, Т. Н. Вараксина, Т. В. Железниченко, В. В. Стасова

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН,

660036 Красноярск, Академгородок

E-mail: [institute\\_forest@ksc.krasn.ru](mailto:institute_forest@ksc.krasn.ru)

Поступила в редакцию 09.12.10 г.

Окончательный вариант получен 11.12.11 г.

Содержание и состав фракций спирторастворимых фенолкарбонных кислот (ФК) изучали в связи с созреванием клеток ранней и поздней ксилемы и ее лигнификацией в ходе образования годичного прироста древесины в стволах сосны обыкновенной. Фенольные соединения (ФС) извлекали 80%-ным этанолом из клеток последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы. Из ФС выделяли фракции свободных и связанных ФК, а из состава последних простые и сложные эфиры. Содержание веществ фракций рассчитывали на сух. массу и на клетку. Ранние трахеиды на всех стадиях утолщения вторичной стенки содержали меньше ФС и больше свободных ФК, чем поздние трахеиды. В ходе созревания ранних трахеид пул свободных кислот в расчете на клетку постепенно увеличивался, а связанных снижался. С созреванием трахеид поздней ксилемы пул свободных ФК повышался, тогда как связанных сначала повышался, а затем уменьшался. На всех стадиях созревания клеток обоих типов ксилемы в составе связанных ФК всегда доминировали простые эфиры. При этом клетки всех этапов созревания поздней ксилемы содержали больше простых эфиров, тогда как в клетках ранней было больше сложных эфиров. На последовательных стадиях лигнификации ранней ксилемы суммарное содержание свободных оксикоричных кислот снижалось в результате сокращения пула п-кумаровой, феруловой и синаповой кислот, а пул эфиров этих кислот повышался. В ходе лигнификации поздней ксилемы пул свободной п-кумаровой, феруловой и особенно синаповой кислоты повышался. Одновременно увеличивалось содержание сложных эфиров феруловой кислоты и простых эфиров синаповой.

*Ключевые слова:* *Pinus sylvestris* L., ранняя и поздняя ксилема, вторичное утолщение и лигнификация, фенолкарбонные кислоты.

Годичный прирост хвойных состоит из двух слоев ксилемы — ранней и поздней, клетки которых — трахеиды — отличаются морфологическими параметрами, хотя развиваются по одному сценарию. После образования в камбиальной зоне клетки увеличиваются в размере в результате растяжения, а затем начинается вторичное утолщение их стенок. Вслед за отложением веществ вторичной стенки идет процесс накопления лигнина, основными структурными единицами которого являются производные оксикоричных кислот: п-кумаровой, феруловой, синаповой.

Оксикоричные кислоты (ОК), которые входят в состав фенолкарбонных кислот (ФК) растений, участвуют также в росте клеток и создании структуры клеточных стенок, соединяя сложными и простыми эфирными связями между собой нецеллюлозные полисахариды (Fry, 1986, 1993; Waldron et al., 1997; Burr, Fry, 2009), а сами гемицеллюлозы с лигнином (Iiyama et al., 1990; Wallace, Fry, 1994; Antonova, Chapligina, 2007). Димеризованные ОК, такие как диферуловая кислота, могут попеременно

связывать пектины или пектины с другими нецеллюлозными полисахаридами (Fry, 1983; Waldron et al., 1997).

Значение ОК в растениях не ограничивается их участием в лигнификации (Запрометов, 1993, 1996). Физиологические функции кислот и их эфиров в растениях весьма разнообразны. Производные ФК, опосредуя действие таких ростовых веществ, как цитокинин, контролируют деление и расширение клеток (Teutonico et al., 1991). Благодаря природным антиоксидантным свойствам эфиры ОК, в частности, хлорогеновая кислота, могут защищать липиды от перекисного окисления *in vivo* (Rice-Evans et al., 1997). Предполагают, что п-кумаровая кислота оптимизирует введение синапового спирта в растущий лигниновый полимер (Hatfield et al., 2008). Существуют данные, что ОК обладают антимутагенными свойствами (Ferguson et al., 2003). Считается также, что ФК и их производные влияют на апоптоз клеток (Tamagnon et al., 1998; Дубравина и др., 2005). ФК в свободной форме потенциально токсичны для клеток и по-

этому их количество, как правило, в клетках ограничено. В растениях они представлены главным образом в виде конъюгатов с сахарами или органическими кислотами.

Тесно связанные с компонентами клеточных стенок ФК выделяются из ткани только растворами щелочи или кислоты, разрушающими эти связи, и такой метод их выделения используется в большинстве работ посвященных изучению ФК в растениях, например, двудольных (Lozovaya et al., 1999). Несвязанные с компонентами стенок бензойные и оксикоричные кислоты и их производные извлекаются такими органическими растворителями как спирты или их водные растворы.

Уровень спирторастворимых фенольных соединений (ФС) зависит от степени дифференциации тканей, как это было показано на каллусных культурах чайного растения (Загоскина и др., 1994) и при развитии зерен ржи (Weidner et al., 2000). Общих ФС и ФК в ходе развития зерен ржи в расчете на сухой вес больше в начале развития, чем на конечных стадиях созревания (Weidner et al., 2000). Авторы показали также, что инициация водного стресса ведет к понижению суммы свободных и связанных форм оксикоричных кислот. Как было установлено для хвои *Pinus pinaster*, избыток влаги тоже влияет на содержание свободных и связанных форм ФК (Alonso et al., 1993).

Водный стресс как внешний, так и внутренний, возникающий в дереве в результате сочетания определенных погодных условий, ведет к формированию в годичном приросте хвойных слоя поздней ксилемы (Zahner, 1963; Антонова, 1999). Изучая образование ранних и поздних трахеид в стволах лиственницы сибирской, мы нашли, что фракционный состав ФК, а именно содержание свободных и связанных ФК и их состав зависит как от стадии дифференциации клеток, так и от того, какой слой ксилемы, ранней или поздней, формируется в данный период вегетации (Чаплыгина, 2007). Развитие двух типов трахеид лиственницы характеризовалось также разной интенсивностью отложения лигнина в ходе дифференциации клеток (Antonova et al., 2007) и разным содержанием и соотношением аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот (Антонова и др., 2005). От соотношения этих кислот, которое определяет окислительно-восстановительный потенциал тканей растений, зависит процесс сшивания полисахаридов (Zarra et al., 1999) и доступность предшественников лигнина для полимеризации (Takahama, 1993). Считают, что аскорбиновая кислота регулирует количество коричных кислот доступных действию пероксидазы, что в свою очередь контролирует скорость биосинтеза лигнина (Takahama, Oniki, 1997). Это означает, что пока аскорбат взаимодействует с перекисью водорода процессы сшивки и полимеризации в стенке тормозятся (Zarra et al.,

1999; Takahama, Oniki, 1997). При развитии трахеид лиственницы содержание и состав ФК (Чаплыгина, 2007) изменялись в соответствии с окислительно-восстановительным потенциалом (Антонова и др., 2005) и динамикой лигнификации ранних и поздних трахеид лиственницы в ходе их развития (Antonova et al., 2007).

При изучении процессов роста и лигнификации ранней и поздней ксилемы в стволах сосны обыкновенной было найдено, что каждая из стадий дифференциации клеток тоже характеризуется определенным уровнем аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот (Антонова и др., 2009). Такие изменения в метаболизме должны влиять на содержание и фракционный состав ФК, а это в свою очередь на ростовые процессы и отложение лигнина. Мы рассматривали изменение содержания и состава фенолкарбонных кислот в ходе роста клеток ксилемы сосны обыкновенной (Антонова и др., 2011). Данная работа является продолжением этих исследований.

Целью работы явилось изучение содержания и фракционного состава спирторастворимых ФК на этапах созревания и лигнификации ранних и поздних трахеид при формировании годичного прироста древесины в стволе сосны обыкновенной.

## МЕТОДИКА

Материалом исследования служили слои клеток формирующейся ксилемы, полученных из стволов интактных 20–25 летних деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), растущих в посадках Погорельской экспериментальной базы Института, в периоды образования ранней и поздней древесины. Время отбора подбирали с таким расчетом, чтобы все клетки формирующегося слоя древесины принадлежали либо к раннему, либо позднему типу. В вегетационном сезоне такие периоды соответствовали концу июня и началу августа.

Сбор материала со стволов деревьев (по два в каждый из периодов наблюдения) сосны обыкновенной проводили методом микрорассечения. Ствол распиливали по мутовкам, для каждой из которых оценивали состояние развития годичного слоя. С отрезков ствола последовательно удаляли кору, клетки непроводящей и проводящей флоэмы, клетки зон камбия и роста растяжением. Затем скальпелем собирали клетки на стадиях развития вторичных стенок (стадия созревания и лигнификации), постоянно контролируя стадию развития клеток с помощью гистохимических реакций (Антонова, Шебеко, 1981; Антонова и др., 2005, 2009). Начало отложения веществ вторичных стенок оценивали по появлению окаймления пор, что характерно для начала утолщения стенок трахеид (Murmanis, Sachs,

1969). Состояние зрелой ксилемы определяли по исчезновению протопласта.

В конце июня все клетки формирующегося годичного слоя, в том числе и зрелые, были представлены ранними трахеидами. Со стороны ксилемы были получены клетки зон камбия (Кам), роста растяжением (Рост), результаты анализа ФК которых показаны ранее (Антонова и др., 2011), и зоны созревания, клетки которой служили материалом для исследования. Зону разделяли на клетки с вторичным утолщением без лигнификации (D1) и последовательные слои лигнифицирующихся клеток (D2a и D2б), а также зрелые клетки ксилемы (М).

В начале августа развивающаяся ксилема содержала только камбиальную зону (Кам) и зону созревания. Клетки в зоне роста растяжением отсутствовали, а зона созревания, которую использовали в работе, содержала достаточно большое число клеток, что позволило разделить ее на слой клеток до лигнификации (D1) и последовательные слои лигнифицирующихся трахеид (D2a, D2б, D2в). Кроме того, были собраны зрелые клетки поздней ксилемы (М). Одновременно отбирали навески ткани на мацерацию и для определения влажности материала.

Мацерацию тканей проводили по методикам, использованным в работе (Антонова и др., 2005; Антонова и др., 2009). Количество клеток в мацерате подсчитывали с помощью камеры Фукса-Розенталя, а затем рассчитывали количество клеток в 1 г сухой массы.

Полученный материал по мере отбора фиксировали спиртом (конечная концентрация спирта была не более 80%), суспензию взвешивали и хранили в холодильнике до анализа. Вес полученных образцов определяли, вычитая из веса суспензии вес 96% спирта, взятого для фиксации. Суспензию ткани, взятой для анализа, фильтровали, твердые остатки растирали в ступке с жидким азотом и экстрагировали 80% водным этанолом при комнатной температуре при периодическом помешивании и сменой растворителя через 12 часов до отрицательной реакции на углеводы (Dubois et al., 1956). Растворы, полученные при фиксации и экстракции, объединяли, и общий объем измеряли.

Аликвоту экстрактов (20–50 мл) высушивали, сухие вещества обрабатывали водой и хлороформом. Водный слой после хлороформа использовали для определения фенолов, а также уоновых кислот, аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот (Антонова и др., 2005, 2009) и углеводов. Такой комплексный подход дает возможность сравнивать динамику исходных метаболитов и фенольных соединений и определять функциональные связи между ними.

Общее содержание ФС определяли в водном слое с реактивом Фолин-Дениса по методу (Jennings, 1981), который позволяет определять фено-

лы в присутствии белка. Аликвоту водного раствора подкисляли соляной кислотой до pH 2.5–3 и трижды обрабатывали эфиром. Объединенные эфирные вытяжки выпаривали на воздухе досуха, остаток растворяли в 3 мл ацетона и использовали для определения свободных ФК (Jennings, 1981). Оптическую плотность измеряли при  $\lambda = 760$  нм, используя кювету с толщиной слоя 1 см. Калибровка проводилась в соответствии с методикой по тирозину (0–100 мкг/мл).

Содержание ФК, входящих в состав сложных и простых эфиров, определяли в водном слое после щелочного и кислотного гидролиза соответственно. Щелочной гидролиз проводили 2н NaOH. К аликвоте водного слоя добавляли равный объем 4н гидроокиси натрия и выдерживали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем к раствору осторожно добавляли 18% HCl до pH 2.0–2.5. Подкисленный раствор обрабатывали трехкратно эфиром, и объем водного слоя измеряли. Эфирную вытяжку выдерживали на воздухе, и сухой остаток растворяли в 3 мл ацетона. К водному слою добавляли 18% HCl до конечной концентрации 2н, и раствор выдерживали при температуре 100°C в течение 1 часа. К раствору осторожно добавляли 4н NaOH до pH 2.0–2.5 и затем раствор трехкратно обрабатывали эфиром. Эфирные вытяжки выпаривали на воздухе. Сухой остаток растворяли в 3 мл ацетона. Содержание ФК в эфирных вытяжках после щелочного и кислотного гидролизом определяли, как указано выше.

Аликвоту ацетоновых вытяжек высушивали, сухой остаток снова растворяли в 0.1 мл ацетона и методом ТСХ анализировали состав свободных и связанных ФК, используя в качестве носителя пластинки “Silufol UV-254”. После нанесения пятен пластинки обрабатывали паром, подсушивали на воздухе и помещали в камеру со смесью бензол-уксусная кислота (9 : 1). Кислоты идентифицировали по  $R_f$  метчиков и УФ спектрам индивидуальных пятен. Кроме того, для локализации пятен ФК хроматограммы обрабатывали смесью 0.5% раствор п-нитроналина в 2н HCl, 5% NaNO<sub>3</sub> и 20% ацетата натрия в воде (5 : 5 : 20, по объему).

Все операции, начиная с обработки спиртовых экстрактов, проводили в двукратной повторности, аналитическое определение веществ — не менее, чем в 3-х кратной повторности. Результаты анализов рассчитывали на сухой вес ткани и на клетку. Статистическую обработку результатов проводили по методу параметрического сравнения средних. На рисунках в барах показана относительная величина погрешности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные показывают, что клетки последовательных этапов созревания и лигнификации ранней и

поздней ксилемы отличаются по фракционному и индивидуальному составу ФК, что обусловлено не только степенью развития трахеид, но и типом ксилемы в формирующемся годичном приросте сосны обыкновенной.

Содержание общих водорастворимых ФС в составе веществ, извлеченных 80%-ным спиртом из развивающихся клеток ранней и поздней ксилемы показано в расчете на сухую массу (рис. 1а) и на клетку (рис. 1б). При обоих методах расчета в ранней ксилеме содержание ФС уменьшалось от начала созревания к зрелым клеткам. В поздней, наблюдалось их повышение на первой стадии лигнификации (D1), а затем снижение в сторону зрелых клеток. При расчете на клетку разница в содержании ФС на стадиях лигнификации между ранней и поздней ксилемой усиливается (рис. 1б). Такое положение объясняется тем, что на стадиях созревания ранних и поздних трахеид за единицу времени в их стенках аккумулируются разное количество веществ, и в стенках поздних клеток откладывается больше компонентов, чем в стенках ранних (Антонова, Шебеко, 1985; Антонова, 1999), что влияет на расчет по сухому веществу. Нужно учесть, что по мере созревания количество клеток в 1 г сухого вещества уменьшается.

В зависимости от этапа лигнификации и типа трахеид содержание свободных и связанных ФК в составе спирторастворимых ФС варьировало. Индивидуальная изменчивость пула свободных ФК в ходе развития ранних и поздних трахеид показана на рис. 2. В ранней ксилеме содержание (на сухую массу) свободных ФК падало с началом лигнификации и практически не изменялось в ходе созревания клеток (рис. 2а). В поздних клетках содержание этих кислот в D1 сначала также снижалось, но по мере лигнификации возрастало. Расчет на клетку показал уменьшение пула свободных ФК в начале отложения лигнина в ранней и поздней ксилеме и его увеличение к зрелым клеткам (рис. 2б). На первом этапе созревания ранние трахеиды превосходили поздние по количеству свободных ФК в 3 раза, а на последнем этапе в 1.9 раза. Вдоль зоны созревания ранних трахеид относительное содержание свободных ФК в составе ФС варьировало от 21 до 32% с минимумом в начале лигнификации (D2a). В ходе лигнификации поздней ксилемы содержание свободных ФК в ФС изменялось от 6.4 до 12% при минимуме 3.7% в D1.

Как отмечалось выше, свободные ФК потенциально токсичны для клеток и повышенное их содержание может привести к апоптозу (Tagnon et al., 1998; Дубравина и др., 2005). Известно, что толщина стенок ранних трахеид хвойных, и сосны в частности, меньше, чем поздних. Как было нами ранее установлено, толщина клеточных стенок зависит от продолжительности развития трахеид в зоне созревания, и длительность созревания ран-

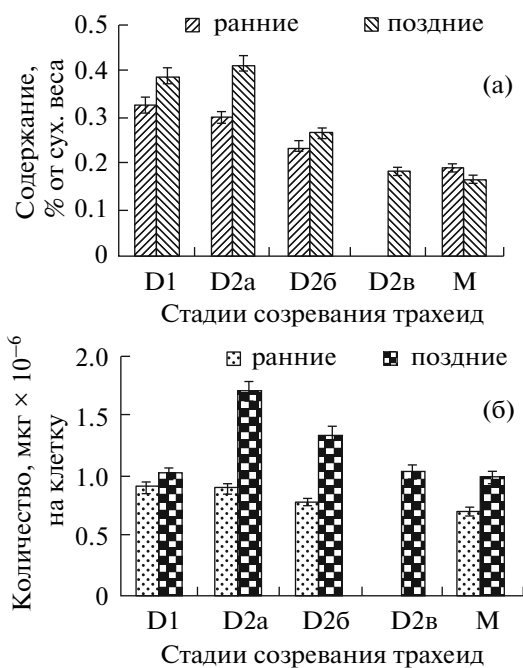


Рис. 1. Содержание спирторастворимых фенольных соединений в клетках последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы сосны обыкновенной: D1 – до лигнификации, D2a, D26, D2в – в ходе лигнификации, M – зрелая ксилема: (а) – от сухого веса, (б) – на клетку.

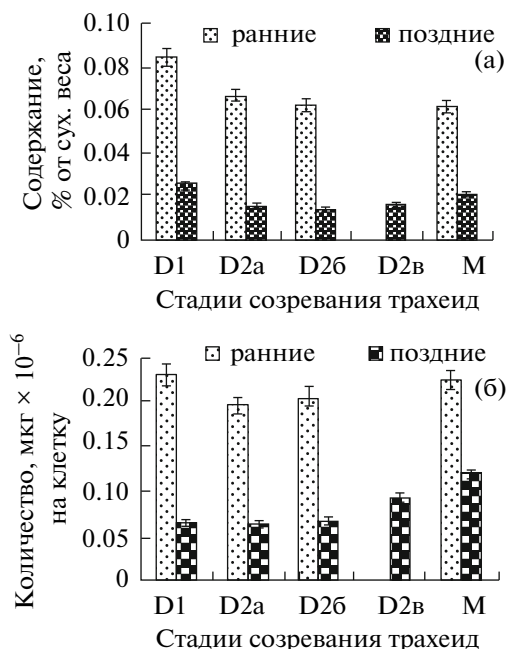
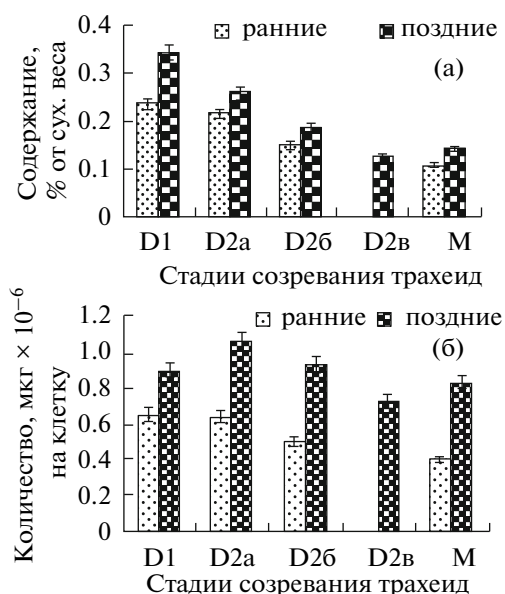
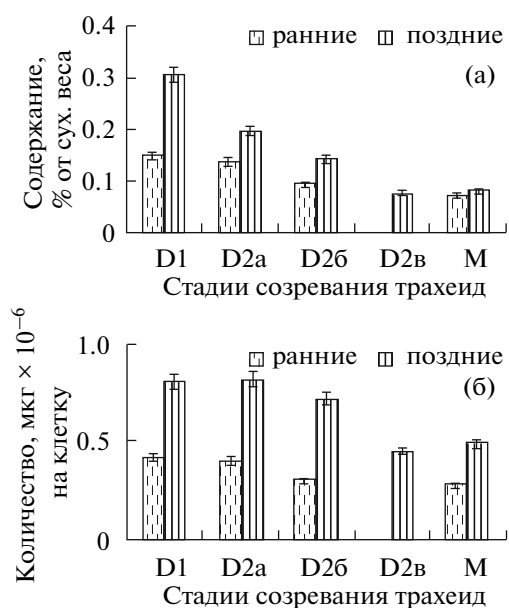


Рис. 2. Содержание свободных фенолкарбоновых кислот в клетках последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы сосны обыкновенной: (а) – от сухого веса, (б) – на клетку. Обозначения как на рис. 1.



**Рис. 3.** Содержание спирторастворимых связанных фенолкарбоновых кислот в клетках последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы сосны обыкновенной: (а) — от сухого веса, (б) — на клетку. Обозначения как на рис. 1.



**Рис. 4.** Содержание простых эфиров фенолкарбоновых кислот в клетках последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы сосны обыкновенной: (а) — от сухого веса и (б) — на клетку. Обозначение как на рис. 1.

них трахеид сосны значительно меньше, чем поздних (Antonova, Stasova, 1997). На фоне снижения содержания аскорбата в конце дифференциации ранних трахеид (Антонова и др., 2009) повышенное содержание свободных ФК может быть причиной более быстрого созревания ранних трахеид

(т.е. сокращения продолжительности развития) и перехода их в зону зрелой ксилемы.

На всех стадиях созревания ранней и поздней ксилемы в ФС доминировали связанные формы ФК. При этом ранние трахеиды содержали меньше конъюгированных кислот, чем поздние. Пул связанных ФК в ранней ксилеме как при расчете на сухую массу (рис. 3а), так и на клетку (рис. 3б) постепенно снижался к зрелым клеткам. В соответствии с этим относительное содержание связанных кислот в составе ФС ранней ксилемы от стадии D1 к зрелым клеткам последовательно уменьшалось с 72.4 до 57.34%. В ходе созревания поздней ксилемы тоже наблюдалось снижение пула связанных ФК, но только при расчете на сухую массу. В расчете на клетку, напротив, их количество увеличивалось от D1 к D2а и затем последовательно уменьшалось по мере созревания трахеид. На этапе D1 созревающие клетки поздней ксилемы содержали 88% конъюгированных ФК. С началом лигнификации их содержание в составе ФС снижалось до 61%, а затем постепенно повышалось до 85%.

Таким образом, в ходе созревания ранних и поздних трахеид пулы свободных и связанных ФК изменяются противоположно. По-видимому, они разделены пространственно, и, очевидно, пополнение одного пула идет за счет другого.

В составе конъюгированных ФК присутствовали эфиры с простыми (кислотолабильными) и сложными (щелочелабильными) связями. От начала к концу вторичного утолщения клеток ранней ксилемы пул простых эфиров постепенно уменьшался (рис. 4а, 4б). В поздней ксилеме наиболее низкое содержание простых эфиров при расчете на сухую массу наблюдалось на первом этапе лигнификации (рис. 4а), тогда как при расчете “на клетку” — на последнем этапе (рис. 4б). В зависимости от этапа развития клетки ранней ксилемы содержали простых эфиров в 1.7–2.3 раза меньше, чем клетки поздней.

В ходе созревания клеток ранней ксилемы пул сложных эфиров уменьшался (рис. 5а и 5б). Особенно резкое снижение отмечалось в расчете на клетку. Клетки поздней ксилемы в D2а содержали сложных эфиров (при расчете на клетку) на 20% больше, чем на этапе D1, затем их количество снижалось, увеличиваясь только в зрелой ксилеме. В начале вторичного утолщения (D1) клетки ранней ксилемы содержали сложных эфиров в 3 раза больше, чем клетки поздней, тогда как в конце созревания, напротив, в поздней ксилеме сложных эфиров было в 1.2 раза больше, чем в ранней.

В зависимости от этапа дифференциации и типа формирующейся древесины соотношение эфиров менялось. В ранней древесине соотношение простые/сложные варьировало от D1 к M от 1.7 до 3.5, в поздней — от 10.6 до 5.0. Это означает, что в

ходе созревания ранних трахеид содержание простых эфиров ФК относительно увеличивалось, а в ходе созревания поздних — уменьшалось.

Изменчивость связанных ФК указывает, во-первых, на различие в ферментах и/или изоэнзимах, отвечающих за создание или расщепление разных форм связей, на последовательных этапах развития вторичных стенок трахеид. Во-вторых, очевидно, что существует разница в метаболизме ФК при созревании клеток ранней и поздней ксилемы. В связи с этим, следует, вероятно, ожидать разный сценарий процесса биосинтеза лигнина в ранней и поздней ксилеме.

На хроматограммах фракции свободных ФК, выделенных из клеток ранней ксилемы, отмечалось до 8–10, поздней — до 12 пикетов кислот. Были идентифицированы: коричневая (особенно на ранних стадиях созревания ранних трахеид), бензойная, а из оксibenзойных — протокатеховая, п-оксибензойная и ванилиновая, которые могут появиться из КоА эфиров хинной, п-кумаровой и феруловой кислот соответственно при помощи механизма β-окисления (Запрометов, 1988, 1993; Осипов, Александрова, 1986). Протокатеховая, количественно не была определена, однако, если учесть, что все объемы в процессе анализа, в том числе и объемы пикетов, наносимых на хроматограммы, выдерживались для всех образцов, визуально ее было значительно больше в клетках ранней, чем в поздней ксилеме, где она отмечалась только в следовых количествах. п-Оксибензойная и ванилиновая кислоты появлялись в основном на последних этапах созревания.

По локализации на хроматограммах, данным УФ-спектроскопии и реакции с п-нитроанилином во фракции свободных ФК поздней ксилемы присутствовала хлорогеновая кислота. В свободных ФК ранней ксилемы эта кислота отсутствовала.

Из оксикоричных кислот (ОК) в клетках ранней ксилемы в свободных ФК присутствовали в определяемых количествах п-кумаровая, кофейная, феруловая и синаповая (рис. 6а), а в поздних клетках — п-кумаровая, феруловая и синаповая (рис. 6б). Лигнификация ранней ксилемы сопровождалась очень незначительным изменением содержания (в μмоль на г сух массы) кофейной кислоты, тогда как содержание п-кумаровой, феруловой и синаповой кислот уменьшалось в ходе лигнификации (рис. 6а). Уровень феруловой кислоты на всех этапах созревания выше, чем других кислот. Снижение п-кумаровой при низком уровне кофейной и высоком уровне феруловой свидетельствует об активной метаболизации кофейной. В свою очередь достаточно высокий уровень синаповой на всех стадиях лигнификации указывает также на активность метаболизации феруловой.

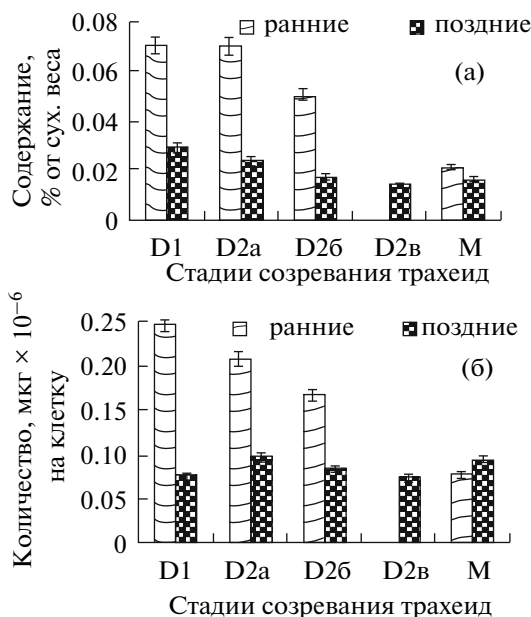
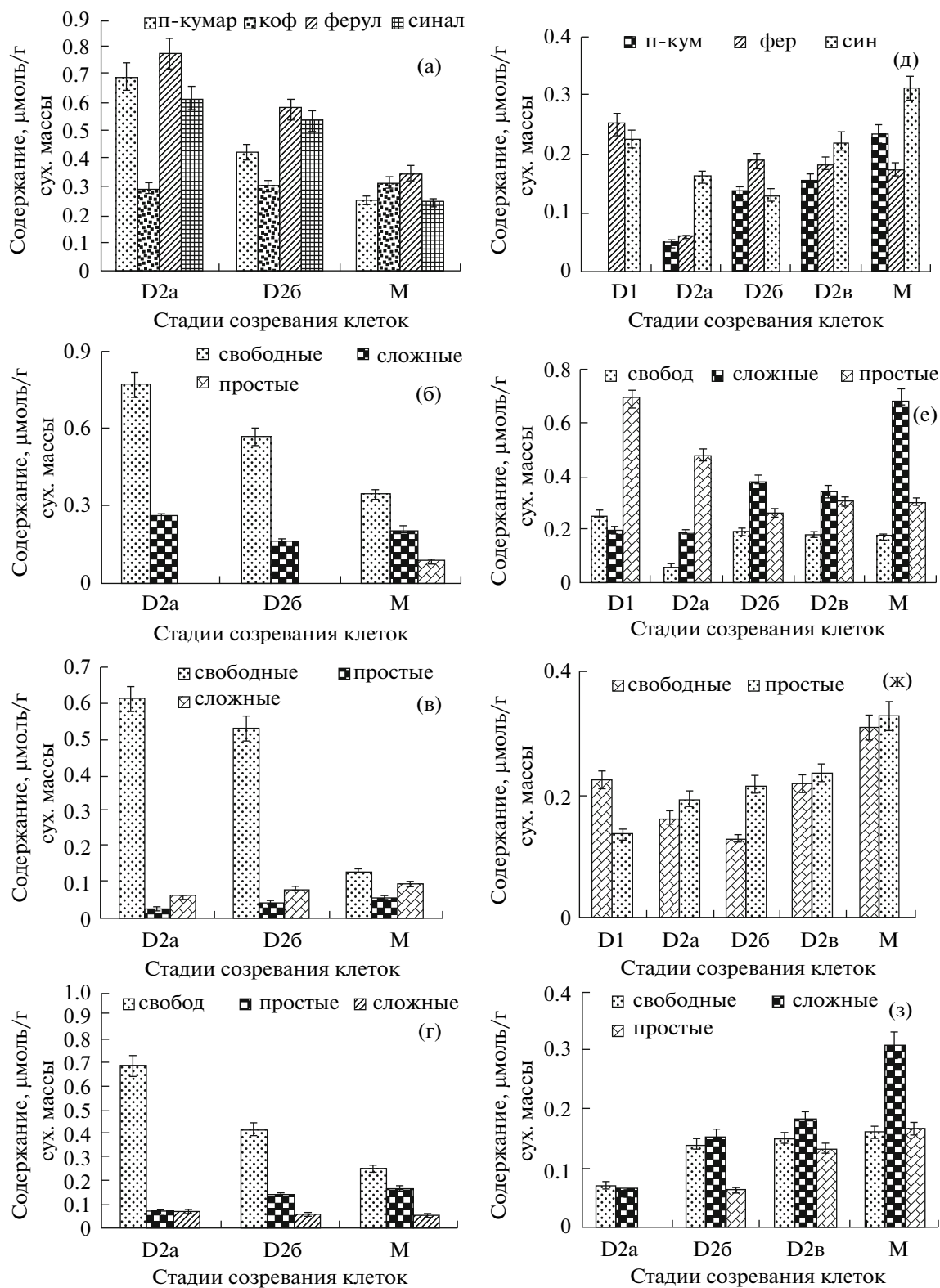


Рис. 5. Содержание сложных эфиров фенолкарбоновых кислот в клетках последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы сосны обыкновенной: (а) — от сухого веса, (б) — на клетку. Обозначение как на рис. 1.

В клетках поздней ксилемы кофейная кислота в свободной форме не была обнаружена. Однако, как указано выше, присутствовала хлорогеновая кислота, которая является сложным эфиром кофейной и хинной кислот. Поскольку протокатеховая кислота обнаруживалась только в следовых количествах, расход кофейной на β-окисление был, по-видимому, минимальным. Отсутствие кофейной могло происходить из-за низкого уровня п-кумаровой, пул которой, постепенно увеличивался к зрелым клеткам (рис. 6б), и, возможно, из-за торможения ее гидроксирования на последних этапах созревания клеток. Ранее было показано, что для реакции гидроксирования необходима аскорбиновая кислота, которая является донором электронов (Vsughan, Butt, 1969). Причиной торможения преобразования п-кумаровой кислоты в кофейную в клетках поздней ксилемы могло быть существенно меньшее содержание аскорбиновой кислоты по сравнению с клетками ранней ксилемы (Антонова и др., 2009). В этих условиях переход к кофейной кислоте мог бы осуществляться через п-кумарат-КоА эфиры (Voerjan et al., 2003) или через хлорогеновую кислоту, которая является предпочтительным субстратом для п-кумарат 3-гидроксилазы (Schoch et al., 2001) и которая, как указано выше, присутствовала в свободной форме в клетках поздней ксилемы. В ранней ксилеме свободная хлорогеновая кислота отсутствовала, но отмечалось повышенное содержание протокатеховой кислоты, которая, как упоминалось выше, мо-



**Рис. 6.** Содержание ( $\mu\text{моль/г}$  сух. массы) п-кумаровой (п-кум), кофейной (коф), феруловой (фер), синаповой (син) и коричной кислот в свободной форме (а, д, з) и в виде простых и сложных эфиров в клетках последовательных стадий созревания ранней (а, б, в, г) и поздней (д, е, ж, з) ксилемы сосны обыкновенной. Обозначение этапов – на рис. 1.

жет появиться в результате β-окисления хинной. Очевидно, что хинная кислота, которая является одним из метаболитов шикиматного пути образования фенилпропаноидов в хвойных (Осипов, Александрова, 1986), используется в клетках в зависимости от условий их развития.

Появление свободной феруловой кислоты в клетках поздней ксилемы может быть результатом альтернативного пути ее образования через п-кумарил-КоА к кофеат-КоА и далее под действием кофеат-КоА О-метилтрансферазы (ККоА-ОМТ) к ферулат-КоА (Whetten, Sederoff, 1995; Voerjan et al., 2003). Показано, например, что в проростках *Pinus pinaster* засуха инициирует увеличение ККоА-ОМТ, но не кумарил-О метил трансферазы (КОМТ) (Costa et al., 1998). Засушливые условия отрицательно влияют на количество и активность КОМТ в листьях кукурузы, подвергнутой засухе (Vincent et al., 2005).

Перед лигнификацией (D1) поздней ксилемы п-кумаровая кислота в свободной форме, как отмечено выше, отсутствовала, но с ее началом уровень кислоты постепенно повышался к зрелым клеткам (рис. 6д). Напротив, уровень феруловой и синаповой кислот был очень высоким. С началом лигнификации содержание феруловой резко снижалось, затем увеличивалось и до конца созревания клеток оставалось на одном уровне. Уровень синаповой сначала снижался незначительно, но к концу лигнификации существенно возрастал, и зрелые клетки содержали в 1.5 раза больше свободной синаповой кислоты, чем феруловой. Это указывает на активное гидроксирование феруловой с последующим ее метилированием. Было показано, что ККоА-ОМТ играет роль как в метилировании кофеат-КоА, так и гидроксированного производного ферулат-КоА (Ye et al., 1994). Поэтому снижение пула свободной феруловой кислоты в ходе развития вторичной стенки и лигнификации, очевидно, вызвано не только ее расходом на синтез гваяцильных монолигнолов, но и на синтез синаповой. Результаты свидетельствуют о разобщении в системе преобразования ОК при формировании поздней ксилемы, формирующейся в условиях внутреннего водного стресса.

Различие в динамике свободных ОК при созревании ранних и поздних трахеид вновь указывает на различие в метаболизме кислот и разном их участии в биосинтезе лигнина двух типов ксилемы. Эти данные поддерживают предположение о существовании двух альтернативных путей преобразования фенилпропановых структур, использование которых в растениях зависит от растений и типа клеток (Whetten, Sederoff, 1995) и, очевидно, от эндогенных условий их развития (например, обеспеченности влагой) в самом растении.

Лигнифицирующиеся клетки ранней ксилемы содержали п-кумаровую, феруловую и синаповую

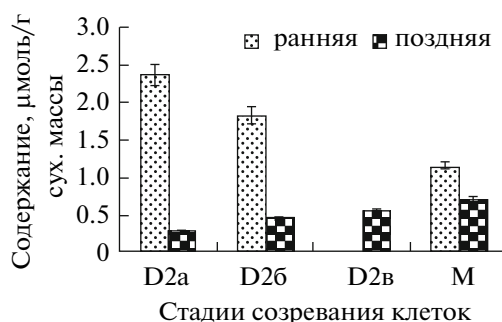


Рис. 7. Суммарное содержание свободных оксикоричных кислот в клетках последовательных стадий созревания ранней (а) и поздней (б) ксилемы сосны обыкновенной. Обозначение этапов на рис. 1.

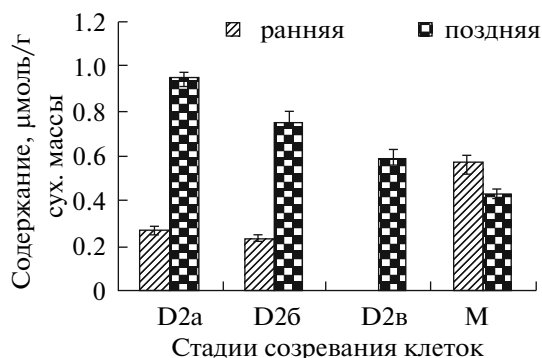
кислоты также в виде простых и сложных эфиров ОК. На рисунках 6б–6г показана их изменчивость в ходе лигнификации в сравнении с содержанием свободных кислот. Простые эфиры феруловой кислоты наблюдались только в зрелых клетках ранней ксилемы (рис. 6б). В начале лигнификации уровень свободной формы феруловой превышал уровень ее сложных эфиров в 3 раза. Он незначительно изменялся в ходе процесса, тогда как уровень свободной феруловой постоянно снижался и в зрелых клетках превышал уровень сложных в 1.5 раза. Снижение уровня свободных синаповой и п-кумаровой кислот сопровождалось повышением уровня сложных эфиров п-кумаровой кислоты и простых эфиров синаповой (рис. 6в и 6г соответственно).

В клетках поздней ксилемы простые эфиры ОК включали феруловую и синаповую кислоты. В ходе созревания клеток содержание простых эфиров феруловой кислоты уменьшалось (рис. 6е), тогда как синаповой, напротив, увеличивалось (рис. 6ж). В состав сложных эфиров поздних трахеид входили в основном феруловая и синаповая кислоты, но последнюю не всегда удавалось определить количественно. Сложные эфиры феруловой кислоты последовательно увеличивались к зрелой ксилеме (рис. 6е).

На рис. 6з приведены данные по содержанию коричной кислоты, которая является предшественницей ОК, и ее эфиров в ходе лигнификации поздней ксилемы. Низкий уровень свободной коричной кислоты в самом начале отложения лигнина и постепенное его увеличение к зрелым клеткам указывает на активное вовлечение кислоты в синтез ОК и снижение этой активности по мере лигнификации.

Если оценивать этапы лигнификации по сумме всех свободных ОК (п-кумаровой, феруловой, синаповой) кислот, то можно отметить, что их содержание в ранней ксилеме постепенно снижалось, тогда как в поздней ксилеме, напротив, повыша-





**Рис. 8.** Содержание (µмоль/г сух. массы) свободной бензойной в клетках последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы сосны обыкновенной. Обозначение этапов на рис. 1.

лось (рис. 7). Лигнификация ранней ксилемы сопровождалась снижением суммарного содержания свободных ОК в 2 раза, а поздней, напротив, увеличением в 2.5 раза. Это свидетельствует о разной динамике процесса лигнификации этих слоев ксилемы годичного прироста сосны обыкновенной и подтверждается данными по отложению лигнина. По мере созревания ранней ксилемы лигнификация усиливается, а поздней, напротив, наиболее активно идет в начале процесса (Antonova et al., 2009).

В развивающихся клетках ранней и поздней ксилемы определяли также содержание свободной бензойной кислоты (спиртовые экстракты исходного материала) (рис. 8). Интерес к ней связан с ее отрицательным влиянием на потенциал мембран (Glass, Dunlop, 1974), благодаря чему может измениться транспорт метаболитов, в том числе монолигнолов. В начале лигнификации (D2a) ранней ксилемы свободной бензойной кислоты при расчете на сухую массу было в 3.5 раза меньше, чем на той же стадии созревания клеток поздней ксилемы. В сочетании с содержанием аскорбиновой кислоты, которая ограничивает доступность предшественников лигнина окислительным реакциям, и содержание которой на этой стадии значительно выше в клетках ранней ксилемы, чем в поздней (Антонова и др., 2009), можно объяснить торможение биосинтеза лигнина на ранних стадиях и усиление лигнификации к концу созревания ранних клеток. В поздней ксилеме, напротив, высокое содержание свободной бензойной кислоты и низкое содержание аскорбиновой кислоты в D2a (Антонова и др., 2009) способствовало активному биосинтезу лигнина в самом начале процесса и снижение активности к зрелым клеткам параллельно с увеличением содержания аскорбиновой кислоты.

В конце созревания ранних трахеид наблюдалось значительное увеличение содержания свободной бензойной кислоты, что может иницииро-

вать выход из вакуоли гидролаз и последующее разрушение протопласта. С этим процессом связывают окончание созревания трахеид и выход их в зону зрелых клеток (Wodzicki, Brown, 1973). Установлено, что количество веществ, аккумулированных во вторичных стенках, зависит от длительности созревания, а продолжительность развития ранних трахеид в зоне меньше, чем поздних (Antonova, Stasova, 1993; Антонова, 1999). В соответствии с этим толщина стенок ранних трахеид значительно меньше, чем толщина поздних. Эти наблюдения соответствуют более низкому содержанию свободной бензойной кислоты в конце созревания поздних клеток по сравнению с их содержанием в клетках ранней (рис. 8).

Таким образом, клетки последовательных этапов созревания и лигнификации ранней и поздней ксилемы, формирующейся в период вегетации в стволах сосны, значительно различаются по содержанию ФС, составу фракций ФК и ОК. На всех стадиях развития вторичной стенки клетки ранней ксилемы содержали ФС и связанных ФК, доминирующих в составе ФС, меньше, чем клетки поздней ксилемы. Соответственно, клетки тех же стадий созревания ранней ксилемы содержали больше свободных ФК. При этом наивысший уровень свободных ФК отмечали перед лигнификацией, а общих ФС и связанных ФК в начале этого процесса как в период созревания ранних, так и поздних трахеид. В связанных ФК всегда преобладали простые эфиры, количество которых в клетках поздней ксилемы было больше, чем в клетках ранней. Клетки ранней ксилемы на этапах созревания содержали соответственно больше сложных эфиров. Последовательные этапы лигнификации ранней и поздней ксилемы различались по составу и количеству индивидуальных оксикоричных кислот (п-кумаровой, кофейной, феруловой и синаповой кислот).

Данные указывают, что при формировании двух слоев годичного слоя ксилемы сосны следует ожидать различия как в биосинтезе лигнина, так и структуре самого лигнина.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований, грант № 06-04-49501.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антонова Г.Ф. Рост клеток хвойных. Новосибирск: Наука, 1999. 232 с.
- Антонова Г.Ф., Железниченко Т.В., Стасова В.В. Изменение содержания и состава фенолкарбоновых кислот в ходе роста клеток ксилемы сосны обыкновенной // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 2. С. 1–9.
- Антонова Г.Ф., Стасова В.В., Вараксина Т.Н. Аскорбиновая кислота и развитие клеток ксилемы и флоэмы в стволе сосны обыкновенной // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 2. С. 210–219.

- Антонова Г.Ф., Чаплыгина И.А., Вараксина Т.Н., Стасова В.В. Аскорбиновая кислота и развитие ксилемы в стволах деревьев лиственницы сибирской // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 97–107.
- Антонова Г.Ф., Шебеко В.В. Использование крезолового прочного фиолетового при изучении образования древесины // Химия древесины. 1981. № 4. С. 102–105.
- Антонова Г.Ф., Шебеко В.В. Формирование ксилемы хвойных. 3. Динамика развития трахеид в зонах дифференциации // Лесоведение. 1985. № 5. С. 71–74.
- Дубравина Г.А., Зайцева С.М., Загоскина Н.В. Изменения в образовании и локализации фенольных соединений при дифференциации тканей тиса ягодного и тиса канадского в условиях *in vitro* // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 5. С. 755–762.
- Загоскина Н.В., Федосеева В.Г., Фролова Л.В., Азаренкова Н.Д., Запроматов М.Н. Культура ткани чайного растения: дифференциация, уровень ploидности, образование фенольных соединений // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 5. С. 762–767.
- Запроматов М.Н. Фенольные соединения растений и их биогенез // Итоги науки и техники. Биологическая серия. М.: ВИНТИ, 1988. Т. 27. 188 с.
- Запроматов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
- Запроматов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения // LVI Тимирязевские чтения. М.: Наука, 1996. 45 с.
- Осинов В.И. Гидроароматические кислоты в жизнедеятельности хвойных. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1979. 111. 38 с.
- Осинов В.И., Александрова Л.П. Биосинтез оксibenзойных кислот в проростках *Pinus sylvestris* L. // Изв. СО АН СССР, Сер. Биол. наук. 1986. Вып. 1. С. 83–86.
- Чаплыгина И.А. Особенности формирования ранних и поздних трахеид при образовании древесины лиственницы сибирской: Автореферат дис. ... кан. биол. Красноярск: ИЛ СО РАН, 2007. 17 с.
- Alonso M., Vara S., Vega J.G. Phenolic acids as biochemical indicator for parameters of stress in *Pinus pinaster* nurseries // Investigacion Agraria, Sistemas y Recursos Forestales. 1993. V. 2. № 2. P. 185–196.
- Antonova G.F., Varaksina T.N., Stasova V.V., Zhelezniichenko T.V. The peculiarities of lignin deposition during development of early- and latewood in *Scots pine* // Материалы докладов VII Международного Симпозиума по фенольным соединениям: Фундаментальные и прикладные аспекты. Москва, 19–23 октября, 2009. М., 2009. С. 292–293.
- Antonova G.F., Chaplygina I.A. The cell wall structure formation of earlywood and latewood in larch (*Larix sibirica* Ldb.) // Proceedings/Actes of International Symposium of IUFRO Working Group S2.02.07 “Integrated research activities for supply of improved larch to tree planting: tree improvement, floral biology and nursery production”. September 16–21, Canada, Quebec. 2007. P. 77–81.
- Antonova G.F., Varaksina T.N., Stasova V.V. The differences in the lignification of earlywood and latewood in larch (*Larix sibirica* Ldb.) // Eur. J. For. Res. 2007. V. 10. № 2. P. 149–161.
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M. Lignin biosynthesis // Annu. Rev. Plant Biol. 2003. V. 54. P. 519–546.
- Antonova G.F., Stasova V.V. Effects of environmental factors on wood formation in Scots pine stems // Trees. 1993. V. 7. № 5. P. 214–219.
- Antonova G.F., Stasova V.V. Effects of environmental factors on wood formation in larch (*Larix sibirica* Ldb.) stems // Trees. 1997. V. 10. № 1. P. 24–30.
- Burr S.J., Fry S.C. Extracellular cross-linking of maize arabinoxylans by oxidation of feruloyl esters to form oligoferuloyl esters and ether-like bonds // The Plant J.: for cell and molecular biology. 2009. V. 58. № 4. P. 554–567.
- Costa P., Bahrman N., Frigerio J.M., Kremer A., Plomion C. Water-deficit-responsive proteins in maritime pine // Plant Mol Biol. 1998. V. 38. № 4. P. 587–96.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–355.
- Ferguson L.R., Lim I.F., Pearson A.E., Ralph J., Harris P.J. Bacterial antimutagenesis by hydrocinnamic acids from plant cell walls // Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2003. V. 542. № 1–2. P. 49–58.
- Fry S.C. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions // Planta. 1983. V. 157. P. 111–123.
- Fry S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms // Annu. Rev. Plant Physiol. 1986. V. 37. P. 165–186.
- Fry S.C. Plant cell expansion: loosening the ties // Current Biology. 1993. V. 3. № 6. P. 355–357.
- Glass A.D.M., Dunlop J. Influence of phenolic acids on ion uptake. 4. Depolarization of membrane potential // Plant Physiol. 1974. V. 54. P. 855–858.
- Iiyama K., Lam T.B.T., Stone B.A. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat Internodes // Phytochemistry. 1990. V. 29. P. 733–737.
- Jennings A.C. The Determination of dihydroxyphenolic compounds in extracts of plant tissues // Analyt. Biochem. 1981. V. 118. P. 396–398.
- Hatfield R., Ralph J., Grabber J.H. A potential role for synapyl p-coumarate as a radical transfer mechanism in grass lignin formation // Planta. 2008. V. 228. № 6. P. 919–28.
- Lozovaya V.V., Gorshkova T.A., Yablokova E.V., Rummyantseva N.I., Valieva A., Ulanov A., Luwe M. Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves, seasonal variations and response to changing ozone concentrations in air // Plant Cell Environ. 1996. V. 19. P. 321–328.
- Murmanis L., Sachs J.B. Seasonal development of secondary xylem in *Pinus strobus* L. // Wood Sci. Technol. 1969. V. 3. P. 177–193.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds // Trends Plant Sci. 1997. V. 2. P. 152–159.
- Schoch G., Goepfert S., Morant M., Hehn F., Meyer D. et al. CYP08A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpro-

- panoid pathway // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 566–574.
- Shann J.R., Blum U. The utilization of exogenously supplied ferulic acid in lignin biosynthesis // *Phytochemistry*. 1987. V. 26. P. 2977–2982.
- Takahama U. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic acid: different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidase from epicotyls of *Vigna angularis* // *Plant Cell Physiol.* 1993. V. 34. P. 809–817.
- Takahama U., Oniki T. A Peroxidase-phenolics-ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells // *Physiol. Plant.* 1997. V. 101. P. 845–852.
- Tamagnon L., Mtrida A., Stacey N., Plaskitt K., Parr A., Chang C.-F., Lynn D., Dow J.M., Roberts K., Martin C. Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants // *Plant Cell.* 1998. V. 10. P. 1801–1816.
- Teutonico R.A., Dudley M.W., Orr J.D., Lynn D.G., Binns A.N. Activity and accumulation of cell division-promoting phenolics in tobacco tissue cultures // *Plant Physiol.* 1991. V. 97. P. 288–297.
- Vincent D., Lapierre C., Pollet B., Cornic G., Negroni L., Zivy M. Water deficits affect caffeate o-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation // *Plant Physiology*. 2005. V. 137. P. 949–960.
- Vsughan R.F.T., Butt V.S. The hydroxylation of *p*-coumaric acid by an enzyme from leaves of spinach beet (*Beta vulgaris* L.) // *Biochem J.* 1969. V. 113. P. 109–115.
- Waldron K.W., Ng A., Parker M.L., Parr A.J. Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of *Beta vulgaris* and their possible role in texture // *J. Sci. Food Agric.* 1997. V. 74. P. 221–228.
- Wallace G., Fry S.C. Phenolic compounds of the plant cell wall // *Int. Rev. Cytol.* 1994. V. 151. P. 229–267.
- Whetten R., Sederoff R. Lignin biosynthesis // *The Plant Cell.* 1995. V. 7. P. 1001–1013.
- Weidner S., Amorowicz R., Karama M., Fraczek E. Changes in endogenous phenolic acids during development of *Secale cereale* caryopses and after dehydration treatment of unripe rye grains // *Plant Physiol. Biochem.* 2000. V. 38. № 7–8. P. 595–602.
- Wodzicki T.J., Brown C.L. Organization and breakdown of the protoplast during maturation of pine tracheids // *Amer. J. Bot.* V. 60. № 7. P. 631–640.
- Ye Z.-N., Kneusel R.E., Matern U., Varner J.E. An alternative mutilation pathway in lignin biosyntheses in *Zinnia* // *Plant Cell.* 1994. V. 6. P. 1427–1439.
- Zahner R. Internal moisture stress and wood formation in conifers // *For. Prod. J.* 1963. V. 13. P. 240–247.
- Zarra I., Sánchez M., E. Quejheiro E., Peña M.J., Revilla G. The cell wall stiffening mechanism in *Pinus pinaster* Aiton: regulation by apoplastic levels of ascorbate and hydrogen peroxide // *J. Sci. Food Agric.* 1999. V. 79. P. 416–420.

## Changes in Phenolic Acids during Maturation and Lignification of Scots Pine Xylem

G. F. Antonova, T. N. Varaksina, T. V. Zheleznichenko, and V. V. Stasova

*Sukachev Institute of the Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

*e-mail: institute\_forest@ksc.krasn.ru*

**Abstract**—The content and fractional composition of alcohol soluble phenolic acids (PhA) in cells with different degree maturation and lignification in the course of early and late timber formation in the pine (*Pinus sylvestris*) during vegetation were studied. Phenolic compounds (PhC), extracted by 80% ethanol, were divided into free and bound fractions of PhA. In turn, the esters and ethers were isolated from bound PhA. The contents of all substances were calculated per dry weight and per cell. Considerable differences have been found to exist in both the contents and the composition of the fractions PhA on successive stages of tracheid maturation of early and late xylem. Early timber tracheids at all secondary wall thickening steps contained PhC less and free PhA more than late timber tracheids. Throughout early timber tracheid maturation, the pool of free PhA per cell declined at the beginning of lignification and then increased gradually while that of bound PhA decreased. The maturation of late timber tracheids were accompanied by the rise of free PhA pool and the diminution of bound PhA pool. In the composition of bound PhA, the ethers were always dominant, and the amount of that in early timber cells was less than in late timber cells. The cells of early xylem at all steps of maturation contained more of ester. The sum total of free hydroxycinnamic acids, precursors of monolignols, gradually decreased during early xylem lignification as the result of the reduction of the pools of *p*-coumaric, caffeic, ferulic and synapic acids, while that of their ester risen. In the course of late xylem lignification, the pools of free *p*-coumaric, ferulic and, especially, synapic acids increased. Simultaneously, the amount of ferulic acid ester and synapic acid ether increased too. According to the data, lignin biosynthesis in early xylem and late xylem occurs with different dynamics and the structure of lignins of two xylem types might be different too.

**Keywords:** *Pinus sylvestris* L., early and late xylem, secondary thickening and lignification, phenol-carbonic acids.

УДК 591

## ВОЗНИКНОВЕНИЕ ЦИТОМИКСИСА ВЛИЯЕТ НА МИКРОСПОРОГЕНЕЗ У *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae)

© 2012 г. Г. Кумар, Р. С. Ядав

Кафедра ботаники, лаборатория генетики растений Аллахабадского Университета  
Аллахабад 211002, Индия

E-mail: ramsyadav.au@mail.com

Поступила в редакцию 15.10.10 г.  
Окончательный вариант получен 27.02.11 г.

Цитомиксис был обнаружен при микроспорогенезе у растений кунжута (*Sesamum indicum* L.), относящемуся к семейству Pedaliaceae. Явление цитомиксиса наблюдалось на разных фазах мейоза в растениях из семян, обработанных 0.5% азидом натрия. Цитомиксис проявлялся при образовании цитоплазматических каналов и при непосредственном слиянии материнских клеток пыльцы, причем первый вариант встречался гораздо чаще. Миграция ядерного содержимого от донора к клетке (клеткам)-рецепторам охватывала все хромосомы или часть хроматина. Также наблюдалось некоторое количество совершенно пустых мейоцитов. При обработке азидом в различных концентрациях было выявлено слипание, нарушенное и замедленное движение хромосом, нарушение его ориентации и микроядра. При повышении дозы азид натрия заметно возрастал процент материнских клеток пыльцы, у которых обнаруживались цитомиксис и нарушения хромосом. Цитомиксис приводил к нарушению мейоза, снижению жизнеспособности пыльцы и появлению пыльцевых зерен различного размера.

*Ключевые слова:* азид натрия, цитомиксис, кунжут, микроспорогенез.

### ВВЕДЕНИЕ

Явление миграции ядерного материала от одной материнской клетки пыльцы к другой, известное как цитомиксис, довольно широко распространено в природе и описано у многих видов растений (Kamra, 1960; Heslop-Harrison, 1966; Shneider, 1975). Как правило, оно наблюдается в самих материнских клетках пыльцы (Caetano-Pereira, Raggiarini, 1997). Чаще всего цитомиксис происходит в профазе первого мейотического деления (Vaughan, 1987; Feijo, Pais, 1995). Несколькими авторами были описаны случаи миграции ядерного содержимого на других фазах мейоза, в том числе и на стадии тетрады (Falistocco и др., 1995). Цитомиксис характеризуется передвижением хроматина или хромосом между ближайшими мейоцитами через цитоплазматические каналы или межклеточные мостики. Однако в некоторых случаях во время мейоза плазмодесмы сохраняются и увеличиваются в размерах, формируя цитомиктические соединения. Они получили название цитомиктических каналов, их ширина позволяет осуществлять продвижение органелл цитоплазмы, а в некоторых случаях и хроматина (Risueno и др., 1969). Тем не менее сохранность цитомиктических каналов оказывает большое влияние на процесс мейоза, его конечный результат и в целом на генеративное развитие данного вида. Цитомиксис чаще

встречается у видов с нестабильным геномом, а именно у гаплоидов, анеуплоидов, гибридов, мутантов, триплоидов и апомиктов (Mantu, Sharma, 1983). Известны примеры того, что полиплоидные формы чаще проявляют цитомиксис, чем диплоидные (Basavaiah, 1987; Sheidai, 2007, 2009).

Кунжут (*Sesamum indicum* L.) – древнее масличное растение, однако пока слабо подвергшееся селекции. Фактически кунжут – сельскохозяйственная культура главным образом развивающихся стран, хотя его выращивают на протяжении от 40° северной широты до 40° южной широты; но в этих странах недостаточно средств для долговременной поддержки исследовательских программ по выведению новых форм. Китай и Индия являются основными производителями кунжута в мире (FAO, 2004). Вместе с тем он не входит в число обязательных культур для международных научных центров растениеводства (IAEA, 2001). Семена кунжута отличаются высоким качеством жиров и белков. Кунжутное масло составляет примерно половину веса семян, оно способно долго храниться, так как содержит природные антиоксиданты, такие как сезамолин и сезамин (Kamal-Eldin, 1995). Тем не менее, кунжут не признают заслуживающим внимания при разработке исследовательских программ.

Действие 0.5% азид натрия на различные показатели у растений кунжута

Дозы обработки	Число изученных материнских клеток пыльцы	Доля клеток с цитомиксисом, %	Фертильность пыльцы, %	Хромосомные аномалии, %							
				Слипа-ние	Задержанное расхожде-ние	Нару-шение ориен-тации	Унива-ленты	Мости-ки	Квадри-валент	Микро-ядра	Другие анома-лии
Контроль	178	0.6	98.00	—	—	—	—	—	—	—	—
3 ч	186	3.8	84.4	2.0	—	1.2	1.4	—	—	2.5	0.6
5 ч	159	5.4	76.2	2.9	1.1	1.8	1.6	—	0.5	3.7	0.8
7 ч	165	9.2	66.6	3.4	1.4	3.1	2.0	0.86	0.8	5.8	1.4

Данная работа посвящена последствиям цитомиксиса в связи с прохождением мейоза и последующей репродуктивной способностью данного вида. Цель исследования — провести сравнительный анализ частоты встречаемости цитомиксиса в материнских клетках пыльцы у растений с мутантными фенотипами и изучить особенности его проявления на уровне хромосом, а также возможные генетические причины его возникновения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена кунжута были получены из Региональной станции Национального бюро Генетических Ресурсов Растений (Akola, Maharashtra) и Сельскохозяйственного CSA Университета (Сапур).

### *Обработка семян.*

Семена предварительно намачивали в воде, сушили фильтровальной бумагой и погружали в 0.5%-ный раствор азид натрия на 3, 5 и 7 ч. Затем семена тщательно промывали водопроводной водой и раскладывали для прорастания в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу. Контрольные и опытные чашки помещали в термостат. Проросшие семена высевали для получения зацветающих растений.

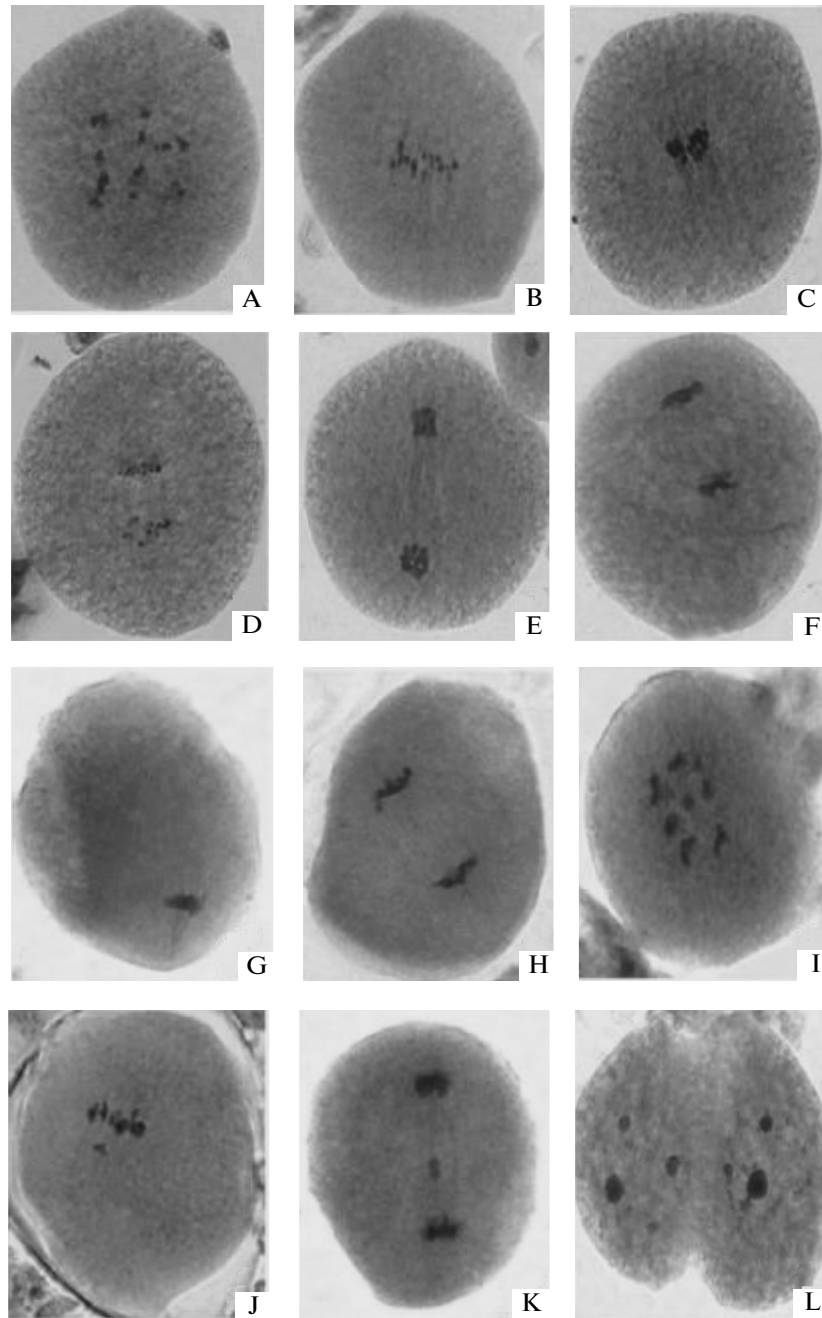
### *Цитологические исследования.*

Цветочные бутоны нужного размера фиксировали в жидкости Карнуа (уксусная кислота : этиловый спирт 1 : 3). Для приготовления давленных препаратов пыльников применяли 2% ацетокармин. В каждой пробе было 3–5 бутонов. Стадии мейоза в пыльниках смотрели у материнских клеток пыльцы на давленных препаратах. Частоту встречаемости цитомиксиса в профазе I определяли в 200–400 материнских клетках пыльцы из каждого пыльника. Фертильность пыльцы оценивали по окрашиваемости ацетокармином, поскольку стерильная пыльца не окрашивалась, а фертильная была окрашена в красный цвет. Кроме того, отмечали морфологические показатели у изучаемых растений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

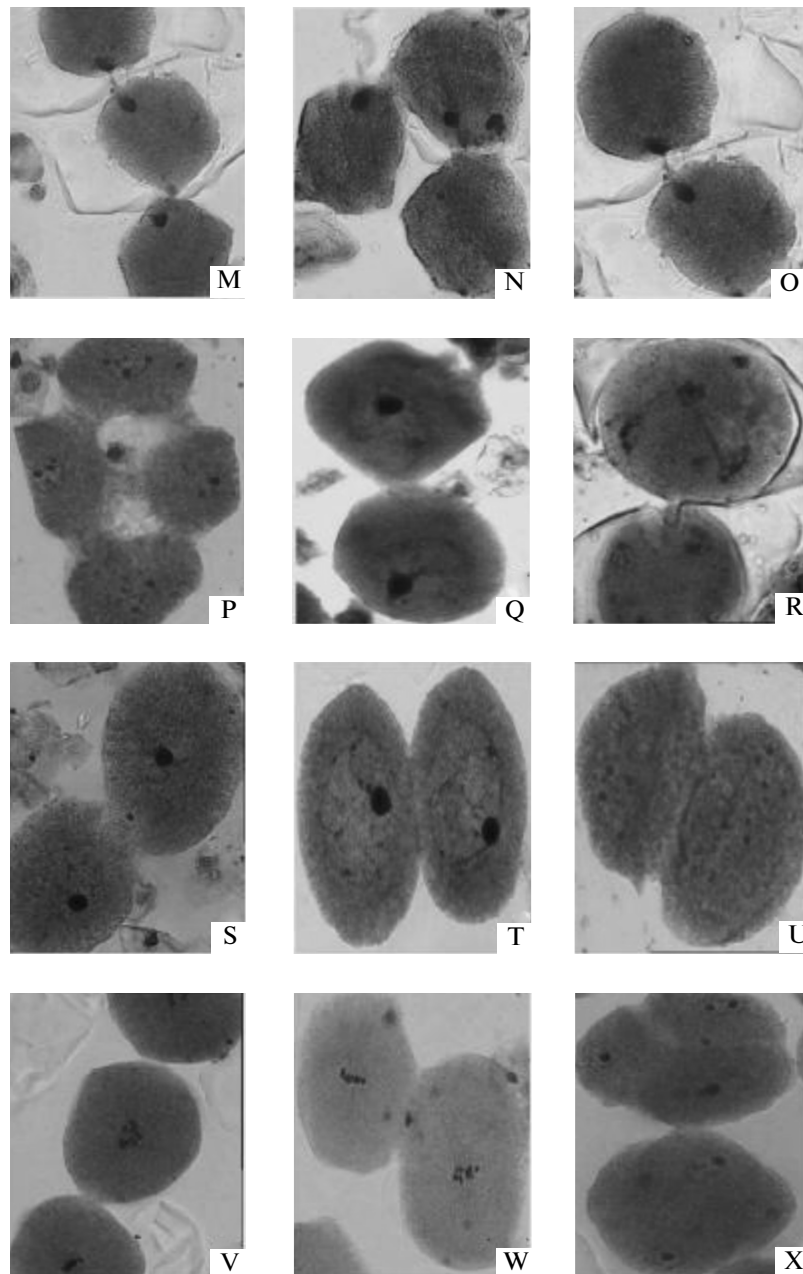
У растений кунжута цитомиксис охватывал от 2 до 5 материнских клеток пыльцы в виде цитомиктических каналов. Иногда прилежащие материнские клетки пыльцы соединялись двумя (или больше) слившимися каналами различной ширины. В некоторых случаях они были настолько широкими, что прилежащие мейоциты имели тенденцию к взаимному слиянию, чтобы облегчить перенос хроматина, а иногда происходило даже прямое слияние материнских клеток пыльцы в агрегаты, состоящие из двух и трех клеток (рис. 1L и 2U). Спонтанное передвижение хроматина чаще имело место во время мейоза I и очень редко — во время мейоза II, причем более интенсивно на ранних фазах (в лептотене и метафазе I). Миграция хроматина происходила всегда в одном направлении — от донора к клетке-рецептору. В большинстве клеток миграция была неполной и совсем пустые мейоциты встречались очень редко (рис. 2N). Кроме того были обнаружены случаи соединения цитоплазмы материнских клеток пыльцы на различных фазах мейоза (рис. 2V, 2W и 2X).

Явление цитомиксиса в материнских клетках пыльцы было изучено в зависимости от длительности обработки семян азидом натрия. Оказалось, что оно гораздо чаще происходит после 7-часовой обработки, чем при более коротких экспозициях (таблица). Судя по частоте встречаемости аномалий мейоза на фазах от пахитены до тетрад, в этом варианте опыта аберрации преобладают. Частота встречаемости аберрантных материнских клеток пыльцы в диплотене/метафазе, анафазе I и анафазе II выше, чем в нормальных материнских клетках пыльцы. Отмечены различные структурные аберрации хромосом. При диакинезе был виден один квадривалент и чаще — два унивалента. В некоторых клетках вместо 13 бивалентов при диакинезе и в метафазе I обнаружено всего 12 бивалентов. Можно также заметить раннее продвижение хромосом вверх и отсутствие движения бивалентов к метафазной пластинке (рис. 1I и 1J). В некоторых случаях не происходило расхождения хромосом.



**Рис. 1** (А–L). Мейоз у растений кунжута. Материнские клетки пыльцы на различных фазах мейоза.

- А. Материнская клетка пыльцы в норме, содержащая 13 хромосом.
- В. Метафаза I в норме.
- С. Вторичная ассоциация в метафазе I.
- Д. Анафаза I в норме.
- Е. Слипание в анафазе I.
- Ф. Нарушение ориентации в анафазе I.
- Г. Миграция ядерного материала к периферии клетки.
- Н. Нарушение ориентации в анафазе I.
- И. Образование мультивалентов.
- Ж. Замедленное движение в метафазе I.
- К. Слипание в анафазе I с задержкой расхождения к полюсам.
- Л. Слияние клеток, видны микроядра.



**Рис. 2 (M–X).** Материнские клетки пыльцы на различных этапах цитомиксиса.  
 М. Цитомиксис в цепочке из трех клеток.  
 N. Свободная материнская клетка пыльцы с перенесенным ядерным материалом.  
 O. Цитоплазматическая связь между двумя клетками.  
 P. Материнские клетки пыльцы, в которых произошел случайный цитомиксис.  
 Q. Клетки на начальном этапе цитомиксиса.  
 R. Миграция через цитомиктический канал.  
 S. Перенос хроматина по широкому каналу.  
 T. Боковой контакт.  
 U. Слияние клеток.  
 V. Образование цепочки клеток в метафазе.  
 W. Боковое слияние в метафазе I.  
 X. Цитомиксис на поздней телофазе II.

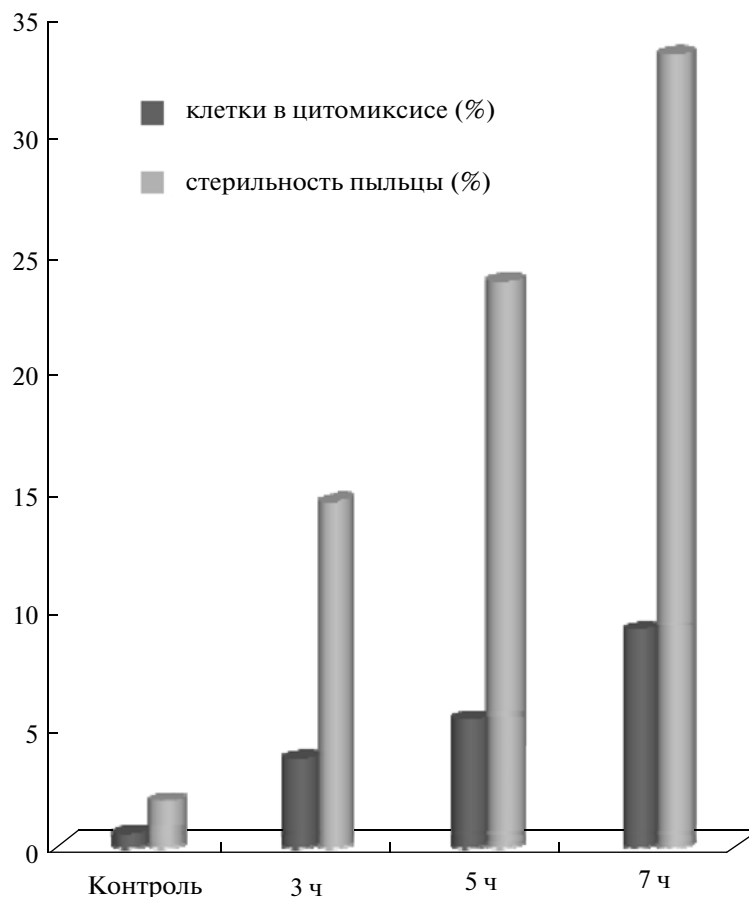


Рис. 3. Действие 0.5% азид натрия на цитомиксис и стерильность пыльцы у кунжута.

Анафаза I и анафаза II характеризуются замедленным расхождением хромосом к полюсам, наличием мостиков, фрагментов и частичным нарушением ориентации. Во время анафазы I у небольшой части клеток отмечено неравное распределение хроматина. На всех фазах мейоза I и мейоза II часто происходит слипание матрикса хромосом. В результате всех описанных нарушений на различных этапах микроспорогенеза к концу его формируются аномальные микроспоры с микроядрами, что в дальнейшем приведет к развитию пыльцевых зерен, имеющих и разный размер и, по-видимому, разное содержание хроматина. Судя по окрашиваемости пыльцы ацетокармином, с увеличением срока обработки азидом натрия фертильность пыльцы имеет тенденцию снижаться. Все перечисленные аномалии свидетельствуют о генетически несбалансированной природе пыльцы. Хотя доля окрашенных клеток велика, обнаруженные нарушения соответствуют уровню фертильности пыльцевых зерен. Размер пыльцевых зерен варьирует от 24 до 40 мкм. Меньшие по размеру зерна обычно нежизнеспособны, но больший размер еще не гарантирует их жизнеспособность.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Цитомиксис был открыт у *Crocus sativus* L. (Kornik, 1901). С тех пор это явление чаще всего описывают во время микроспорогенеза у многих растений (Omara, 1976; Bedi, 1990; Ghamma, Talaat, 2003). Кроме того, цитомиксис был обнаружен в клетках тапетума (Cooper, 1952), меристеме (Bobak, 1978), в эпидермисе листа и прилегающем к нему слое клеток (Tarkowaska, 1960), а также в клетках завязи (Koul, 1990). Сообщалось также, что у полиплоидных растений цитомиксис встречается чаще, чем у диплоидных (Singhal, 2008). Цитологические проявления цитомиксиса в мейозе у растений кунжута весьма разнообразны. Можно предположить, что в профазе I вероятнее всего от клетки к клетке передвигаются не отдельные хромосомы, а хромосомы внутри ядра, включая и ядерную оболочку. Будучи прикреплены к ядерной оболочке, хромосомы следуют внутри нее через цитомиксисный канал. Однако перенос ядерного материала происходил не только в первой и второй профазе, то есть при сохранении ядерной оболочки, но и на мобильных фазах мейоза, когда ядерная оболочка отсутствует.



Дальнейшая судьба мигрировавших хромосом не совсем ясна. Было показано, что такие дополнительные хромосомы, полученные клеткой, остаются в цитоплазме в том же состоянии спирализации, в котором они были во время переноса, после чего они либо дегенерируют, либо образуют пикнотические капельки (Kostritsyna и др., 1991). Вместе с тем нельзя исключить возможность их слияния с ядром клетки-рецептора (Bione и др., 2000).

У растений с отклонениями морфогенеза от нормы и проявлением цитомиксиса в различной степени, описаны другие аномалии мейоза, такие как деформация ядра в профазе II и дезориентация веретена во время мейоза II (Shamina и др., 2000, 2006). Это наблюдение подтверждается тем, что в контрольных растениях встречаемость цитомиксиса не возрастает. Указанные нарушения ведут к появлению аномалий различного происхождения на стадии тетрад, и потому практически невозможно установить на этой стадии, какие именно последствия вызваны исключительно миграцией хромосом.

Одной из характеристик цитомиксиса при цитологическом изучении является направление движения ядра, его частей и хромосом. По наблюдениям некоторых исследователей ядра и ядерный материал мигрируют в определенном направлении, и образуются цепочки клеток, объединенных между собой мигрировавшими хромосомами. Другие авторы настаивают на том, что все межклеточные миграции происходят случайно и что направление их движения не детерминировано (Romanov, Orlova, 1971). Согласно нашим наблюдениям, можно выявить некоторую тенденцию в направленности межклеточной миграции. На препаратах видно, что цепочки клеток чаще всего объединены передвигающимися хромосомами в местах контактов клеток. Ядра в таких клетках мигрируют в одном направлении. Однако наряду с этими наблюдениями в малом проценте случаев можно видеть клетки, которые являются рецепторами для двух соседних клеток, или даже пару клеток, которые “обмениваются” своим ядерным материалом. По нашему мнению цитомиксис начинается локально в каком-то месте пыльника (не обязательно только в одном) и распространяется радиально, вовлекая в миграцию все новые и новые мейоциты.

Наши данные ясно указывают, что у растений кунжута высокий уровень цитомиксиса был обусловлен повышением дозы азидата натрия. Определенный вклад в вариабильность цитомиксиса может внести и ее воздействие на экспрессию генов, контролирующих этот признак. Межклеточная миграция ядерного материала достигает максимума в середине профазы I; однако такая миграция может наблюдаться и на всех последующих фазах мейоза, в том числе и на стадии тетрад. Очевидно, что к последствиям цитомиксиса, обнаруживае-

мым на стадии тетрад, следует отнести цитопласты и полиады.

#### Благодарности

Авторы благодарны Отделу генетики Индийского Сельско-хозяйственного исследовательского Института (I.A.R.I.) в Нью Дели и Сельскохозяйственному Университету CSA в Канпуре за предоставление инбредных семян кунжута, и комиссии по грантам в Нью Дели за финансовую поддержку. Спасибо также руководителю кафедры ботаники в Аллахабадском Университете за возможность пользоваться необходимым оборудованием.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Basavaiah M. T. C. S. Cytomixis in pollen mother cells of *Urochloa panicoides* P. Beauv. (Poaceae) // *Cytologia*. 1987. V. 52. P. 69–74.
- Bauchan G. R. Cytomixis in *agropyron cristatum* // *Genome*. 1987. V. 29. P. 765–769.
- Bedi Y. S. Cytomixis in woody specie // *Proc. Indian Natl. Sci. Acad. (Plant Sci.)*. 1990. V. 100. № B. P. 233–238.
- Bione N. C. P., Pagliarini M. S., De Toledo J. F. F. Meiotic behavior of several brazilian soybean varieties // *Genet. Mol. Biol.* 2000. V. 23. P. 623–631.
- Bobak M., Herich R. Cytomixis as a manifestation of pathological changes after the application of trifluraline // *Nucleus*. 1978. V. 21. P. 22–26.
- Caetano-Pereira C. M., Pagliarini M. S. Cytomixis in maize microsporocytes // *Cytologia*. 1997. V. 62. P. 351–355.
- Cooper D. D. The transfer of deoxyribose nucleic acid from the tapetum to the microsporocytes at the onset of meiosis // *Cytologia*. 1952. V. 86. P. 271–274.
- Falisticco E., Tosti N., Falcinelli M. Cytomixis in pollen mother cells of diploid dactylis. One of the origins of 2n gametes // *J. Heredity*. 1995. V. 86. P. 448–453.
- F.A.O., 2004, FAOSTAT data, *Food and Agriculture Organization*, Rome.
- Feijo J., Pais S. Cytomixis in meiosis during the microsporogenesis of *Ophris lutea*: an ultrastructural study // *Caryologia*. 1995. V. 42. № 1. P. 37–48.
- Ghanma A. M., Talaat A. A. Cytomixis and its possible evolutionary role in a Kuwaiti population of *Diplotaxis harra* (*Brassicaceae*) // *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2003. V. 143. P. 169–175.
- Heslop-Harrison J. Cytoplasmic connexions between angiosperm meiocytes // *Ann. Bot.* 1966. V. 30. P. 221–234.
- I.A.E.A., 2001. Sesame improvement by induced mutations. TECDOC 1195.
- Kamal-Eldin A., Sesamin (a compound from sesame oil) increases tocopherol levels in rats fed ad libitum // *Lipids*. 1995. V. 30. P. 499–505.
- Kamra O. P. Chromatin extrusion and cytomixis in pollen mother cells of *Hordeum* // *Hereditas*. 1960. V. 46. P. 592–600.
- Kornicke M. Uber ortsverannderung von zellkernen. Niderrhein S.B. *Ges Natur Heilkunde Bonn*. 1901. V. 8. P. 14–25.

- Kostritsyna T.V., Soldatov I.V.* Cytomixis in the shoot apical meristem of hybrids of *Prunus domestica* L. *Persica vulgaris* Mill. // *Genetika*. 1991. V. 27. № 10. P. 1790–1794.
- Koul K.K.* Cytomixis in pollen mother cells of *Allopecurus arundinaceus* Poir // *Cytologia*. 1990. V. 55. P. 169–173.
- Mantu D.E., Sharma A.K.* Cytomixis in pollen mother cells of an apomictic ornamental *Ervatamia divaricata* (Linn.) Alston // *Cytologia*. 1983. V. 48. P. 201–207.
- Omara M.K.* Cytomixis in *Lolium perenne* // *Chromosoma*. 1976. V. 55. P. 267–271.
- Risueno M.C., Gimenez-Martin G., Lopez-Saez J.F., R.-Garcia M.I.* Connexions between meiocytes in plants // *Cytologia*. 1969. V. 34. P. 262–272.
- Romanov I.D., Orlova I.N.* Cytomixis and its consequences in microsporocytes triticales // *Genetika*. 1971. V. 7. № 12. P. 5–13.
- Shamina N.V., Sidorchuk Yu.V.* Dynamics of microtubular cytoskeleton in meiosis in the higher plants. X. The general scheme of the cytoskeleton cycle // *Tsitologiya*. 2006. V. 48. № 5. P. 427–437.
- Shamina N.V., Dorogova N.V., Zagorskaya A.A., Deineko E.V., Shumnyi V.K.* Disturbances of male bouchez D. Meiosis in tobacco transgenic line res91 // *Tsitologiya*. 2000. V. 42. № 12. P. 1173–1178.
- Sheidai M., Bagheri-Shabestareh E.S.* Cytomixis and unreduced pollen formation in some *Festuca* L. species of Iran // *Caryologia*. 2007. V. 604. P. 364–371.
- Sheidai M., Jaffari S., Taleban P., Keshavarzi M.* Cytomixis and unreduced pollen grain formation in *Alopecurus* L. and *Catbrosa* Beauv. (Poaceae) // *Cytologia*. 2009. V. 74. P. 31–41.
- Shneider T.* About the issue of cytomixis in plants // *Izv. AN Est. SSR*. 1975. V. 24. № 3. P. 199–209.
- Singhal V.K., Kumar P.* Cytomixis during microsporogenesis in the diploid and tetraploid cytotypes of *withania somnifera* L. Dunal 1852 (Solanaceae) // *Comparative Cytogenetics*. 2008. V. 2. № 1. P. 85–92.
- Singhal V.K., Kumar P.* Impact of cytomixis on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of Himalayan poppy (*Meconopsis aculeata* Royle) // *J. Biosci.* 2008. V. 33. № 3. P. 371–380.
- Tarkowaska J.* Cytomixis in the epidermis of scales and leaves and in meristems of root apex of *Allium cepa* L. // *Acta Soc. Bot. Poloniae*. 1960. V. 34. P. 27–44.

## Induction of Cytomixis Affects Microsporogenesis in *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae)

Girjesh Kumar and Ram Singh Yadav

Department of Botany, Plant Genetics Laboratory University of Allahabad, Allahabad-211002, U.P., India  
e-mail: ramsyadav.au@mail.com

**Abstract**—Cytomixis was recorded during microsporogenesis in sesame (*Sesamum indicum* L.), a member of the family Pedaliaceae. The phenomenon of cytomixis was observed at various stages of meiosis in 0.5% Sodium azide (SA) treated populations of *Sesamum indicum* L. Cytomixis was observed to occur through various methods, i.e. by forming cytoplasmic channels and direct fusion of pollen mother cells (PMCs), the former was more frequent than the latter. The migration of nuclear content involved all the chromatin/chromosomes or part of it from donor to recipient cell/cells. Some completely empty meiocytes were also observed. Stickiness, precocious movement, laggards, unorientation and micronuclei were observed in almost all the sets treated with various doses of SA. Increase in the doses of SA had a positive effect on the percentage of PMCs showing cytomixis and chromosomal abnormalities. The impact of cytomixis on meiotic behaviour, reduced pollen viability and heterogeneous sized pollen grains were observed.

**Keywords:** sodium azide, cytomixis, sesame, microsporogenesis.

## АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ЦИТОСТАТИКОВ НА ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И КЛЕТКИ ТЕРАТОКАРЦИНОМЫ МЫШИ

© 2012 г. О. Ф. Гордеева

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

E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.01.12 г.

Окончательный вариант получен 20.02.2012 г.

Плюрипотентные стволовые клетки млекопитающих способны неограниченно пролиферировать и дифференцироваться в различные типы клеток в культуре *in vitro*. Однако дифференцировка плюрипотентных клеток *in vitro* в большинстве случаев является асинхронной и неполной, а остаточные недифференцированные клетки при трансплантации реципиентам инициируют развитие тератом. Эти особенности плюрипотентных стволовых клеток ограничивают развитие безопасных технологий клеточной терапии на основе плюрипотентных стволовых клеток. Учитывая значительное сходство скорости роста плюрипотентных стволовых и раковых клеток, мы исследовали антипролиферативные и цитотоксические эффекты различных типов цитостатиков (митомидин С, этопозид, винбластин, циклогексимида) на недифференцированные и дифференцирующиеся эмбриональные стволовые, эмбриональные герминативные клетки, клетки бластоцист мыши, а также на тератокарциномные клетки и эмбриональные фибробласты мыши. Все использованные цитостатики наряду с антипролиферативными эффектами вызывали острые токсические процессы в недифференцированных плюрипотентных стволовых клетках мыши и клетках тератокарциномы, тогда как в дифференцирующихся эмбриональных стволовых клетках и эмбриональных фибробластах их эффекты были значительно слабее. Кроме того, клетки трофобласта бластоцист мыши были менее чувствительны к повреждающим эффектам цитостатиков по сравнению с клетками внутренней клеточной массы. При изучении отсроченных эффектов цитостатиков на недифференцированные эмбриональные стволовые клетки и эмбриональные фибробласты было обнаружено, что воздействие митомидина, этопозид и винбластин, но не циклогексимида, является необратимым, и выжившие клетки не способны к дальнейшей пролиферации. Тем не менее, число эмбриональных фибробластов, обработанных этопозидом и винбластином, не изменялось, в то время как недифференцированные плюрипотентные клетки, практически полностью подвергались апоптозу. Таким образом, различные цитотоксические эффекты этопозид и винбластин на недифференцированные плюрипотентные клетки и дифференцированные эмбриональные клетки позволяют рассматривать эти цитостатики и их аналоги в качестве препаратов-кандидатов для разработки методов избирательной элиминации остаточных недифференцированных плюрипотентных клеток в популяции дифференцирующихся клеток. Полученные нами данные впервые демонстрируют возможность селективной элиминации недифференцированных плюрипотентных клеток с использованием низкомолекулярных цитостатиков, применяемых в клинической практике. Однако для увеличения эффективности и безопасности этого подхода и предотвращения мутагенных, канцерогенных и тератогенных эффектов цитостатиков на плюрипотентные стволовые клетки и их дифференцированные клетки-производные необходимы широкомасштабные исследования цитостатических эффектов при различных дозах и схемах воздействия.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, бластоциста, эмбриональные герминативные клетки, тератокарцинома, цитостатики, митомидин, этопозид, винбластин, циклогексимид, ретиноевая кислота, дифференцировка, цитотоксичность, эмбриотоксичность.

Плюрипотентные стволовые клетки млекопитающих способны активно и неограниченно пролиферировать и дифференцироваться в различные типы клеток в культуре *in vitro*. Скорость роста плюрипотентных стволовых клеток сопоставима с таковой для раковых клеток. Структура клеточного цикла плюрипотентных стволовых клеток имеет

уникальные характеристики и значительно отличается от клеточного цикла нормальных соматических клеток (Savatier et al., 1994; 1996; Jirmanova et al., 2002). Большую часть всего времени клеточного цикла плюрипотентные стволовые клетки находятся в S-фазе, а G1- и G2-периоды у них значительно сокращены по сравнению с соответствующими

щими фазами клеточного цикла соматических клеток. Фактически, разделившиеся клетки вступают в новый раунд репликации ДНК практически сразу после завершения предыдущего митоза (Savatier et al., 1994.1996; Burdon et al., 2002; Stead et al., 2002; White et al., 2005; Fluckiger et al., 2006; Becker et al., 2006; Гордеева и др., 2011). В отличие от раковых клеток плюрипотентные стволовые клетки способны к спонтанной и индуцированной дифференцировке. Однако даже при индуцированной различными факторами дифференцировке некоторые клетки остаются недифференцированными, т.е. дифференцировка плюрипотентных клеток *in vitro* в большинстве случаев является асинхронной и неполной (Brederlau et al., 2006; Boyd et al., 2008; Sundberg et al., 2011). Причины этого явления неясны, но оно в значительной мере ограничивает развитие технологий клеточной терапии на основе плюрипотентных стволовых клеток, т.к. остаточные недифференцированные клетки при трансплантации инициируют развитие tumor.

Для развития безопасных клеточных технологий на основе плюрипотентных стволовых клеток используют несколько стратегий, направленных на устранение остаточных недифференцированных клеток из популяции дифференцирующихся клеток. Селекция определенных клеточных типов с помощью клеточных сортеров и генетическая модификация клеточных линий с помощью различных “суицидальных” конструкций являются перспективными методами, однако имеют ряд недостатков, которые ограничивают их эффективность (Kiuru et al., 2009; Tang et al., 2011).

С другой стороны, для ингибирования пролиферации раковых клеток разработаны и продолжают разрабатываться препараты с различными механизмами действия (Vander Heiden, 2011). Учитывая значительное сходство скорости роста плюрипотентных стволовых и раковых клеток, представляет интерес изучение эффектов различных групп цитостатических препаратов на недифференцированные и дифференцирующиеся плюрипотентные стволовые клетки. В представленной работе исследованы эффекты различных типов цитостатиков, применяемых в клинической практике для химиотерапии различных опухолей: алкилирующих агентов, образующих сшивки в структуре ДНК (митомидин С), ингибиторов топоизомеразы II (этопозид), ингибиторов сборки микротрубочек (винбластин) и ингибиторов синтеза белков (циклогексимид). Задачей нашего исследования являлось изучение прямых и отсроченных антипролиферативных и токсических эффектов разных типов цитостатиков на

плюрипотентные эмбриональные стволовые (ЭСК), эмбриональные герминативные клетки (ЭГК) и клетки внутренней массы бластоцисты мыши, а также на опухолевые клетки линии тератокарциномы (ЭТК) мыши и на нетрансформированные эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Культивирование клеток *in vitro*.** В работе были использованы ЭСК мыши линии R1, ЭГК мыши линии EGC-10, любезно предоставленные доктором А. Макларен (A. McLaren, WTCR Institute of Cancer and Developmental Biology, Cambridge, UK). ЭТК мыши линии F9 получены из Российской коллекции клеточных культур (Банк клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Плюрипотентные клеточные линии мыши культивировали в среде DMEM, содержащей 1 mM L-глутамин, 0.1 mM заменимых аминокислот, 0.1 mM  $\beta$ -меркаптоэтанола и 15% телячьей фетальной сыворотки (“HyClone”, США). Недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки мыши поддерживали на фидере из первичных эмбриональных фибробластов мыши, инактивированных митомицином С (10 мкг/мл, “Sigma”). В течение экспериментов ЭСК и ЭГК мыши культивировали в бесфидерной системе, в среде с фактором ингибирования лейкемии (leukemia inhibitory factor, LIF, 10 нг/мл, “Sigma”). МЭФ и ЭТК F9 культивировали в среде для плюрипотентных клеток без LIF. Для изучения влияния цитостатиков на дифференцированные клетки ЭСК R1 предварительно индуцировали к дифференцировке ретиноевой кислотой ( $10^{-6}$  M, “Sigma”) в течение 3 суток. На 4 сутки культивирования среду, содержащую ретиноевую кислоту, заменяли на стандартную среду для культивирования плюрипотентных клеток и добавляли цитостатики.

**Получение и культивирование доимплантационных эмбрионов мышей.** В работе использовали мышей линии C57Bl/6 из питомника лабораторных животных НПП “Пушино” ФИБХ РАН. Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями биоэтического комитета Института. Для получения эмбрионов с датированным сроком беременности животных спаривали, день обнаружения копулятивной пробки считали стадией E 0.5. Эмбрионы мышей на стадии бластоцисты (стадия E 4.0) извлекали из матки самки и культивировали в течение суток до их вылупления из блестящей оболочки в среде для культивирования плюрипотентных клеток в 4-луночных планшетах (“Nunc”, Дания). В каждой группе использовали по 15 эмбрионов.

**Изучение эффектов цитостатиков.** Для изучения цитостатических эффектов использовали митомин С, этопозид, винбластин, циклогексимид (все “Sigma”). На основании данных литературы из базы данных TOXNET, U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>) для используемых нами цитостатиков были выбраны активные дозы соответствующих препаратов: митомин С — 10 мкг/мл, этопозид — 10 мкМ, винбластин — 10 мкг/мл, циклогексимид — 10 мкг/мл. Все эксперименты были повторены дважды.

ЭСК, ЭГК и ЭТК высевали на планшеты плотностью 20 тыс. клеток/см<sup>2</sup> (“Greinerbio”, Германия). После достижения культурами 30–40% конfluence (через 30–33 ч) их культивировали в течение 24 ч в среде с цитостатиками, затем отмывали клетки средой и культивировали следующие 24 ч в среде без цитостатиков. По завершении эксперимента подсчитывали число живых клеток с помощью красителя трипанового синего. В выживших плюрипотентных и тератокарциномных клетках выявляли активность щелочной фосфатазы. При изучении отсроченных эффектов цитостатиков МЭФ и ЭСК подвергали действию цитостатиков в тех же концентрациях в течение 24 ч, а затем культивировали в стандартной среде без цитостатиков в течение последующих 5 суток.

Статистический анализ скорости роста клеточных культур проводили с использованием ANOVA и парного критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы  $p < 0.01$ .

**Гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы.** Клетки фиксировали 3%-ным раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (“Sigma”) в течение 20 мин. После промывки в фосфатно-солевом буфере образцы инкубировали в растворе, содержащем 10 мл 0.02 М буфера *tris*-HCl (pH 8.6), 1 мг нафтола AS-BI-фосфата и 5 мг красителя Fast Red-TR (“Sigma”), в течение 30–40 мин при температуре 37°C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

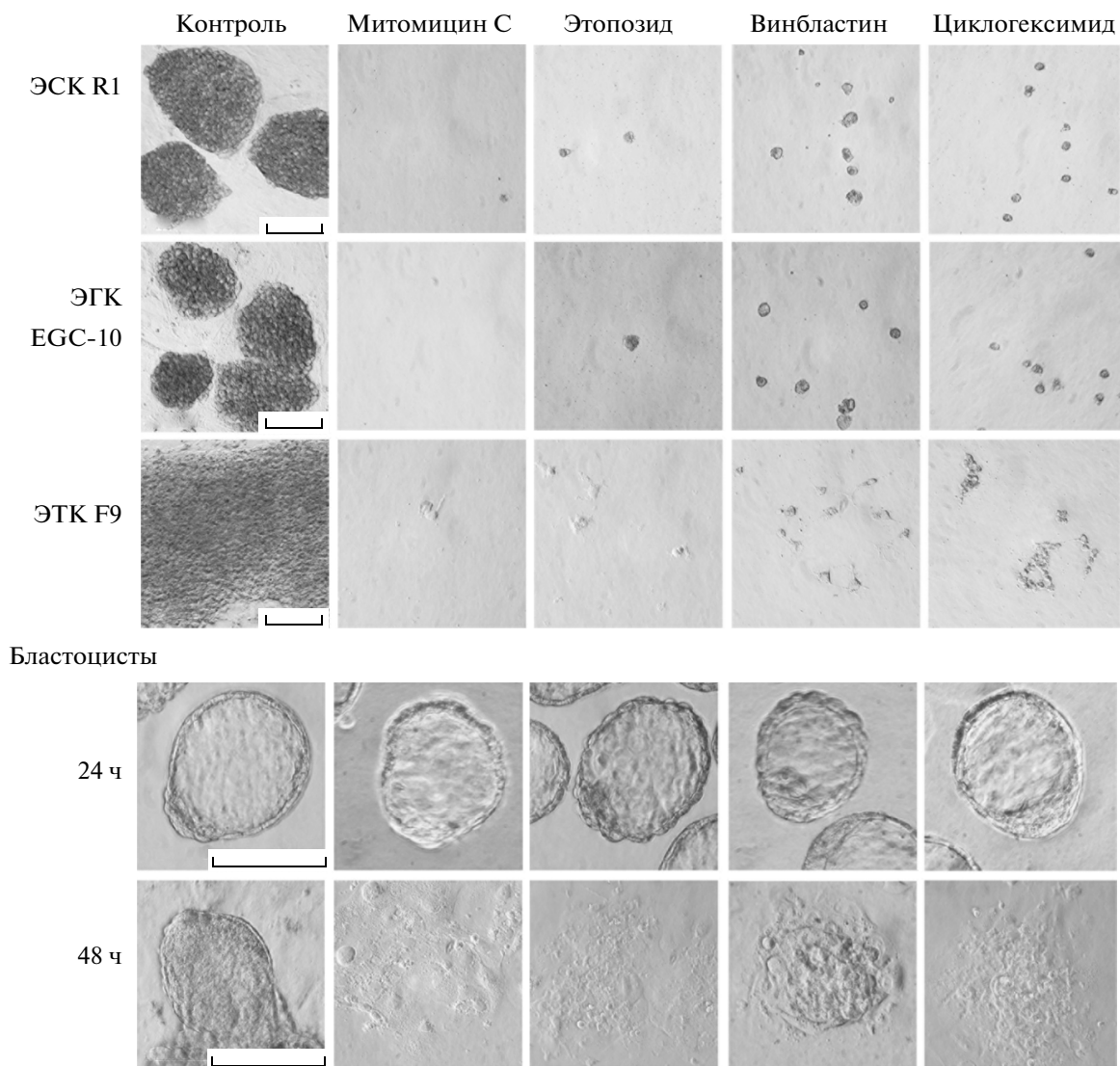
**Токсические и антипролиферативные эффекты цитостатиков на недифференцированные ЭСК, ЭГК, ЭТК и бластоцисты мыши.** Влияние цитостатиков на плюрипотентные клетки исследовали на бластоцистах мыши (E 4.0) и линиях плюрипотентных клеток, происходящих из различных источников: ЭСК — из внутренней клеточной массы бластоцист, а ЭГК — из ранних первичных половых клеток. Кроме того, в работе были использованы нуллипотентные ЭТК, являющиеся трансфор-

мированными аналогами плюрипотентных стволовых клеток, утратившими способность к дифференцировке. Для изучения антипролиферативных эффектов были использованы цитостатики с различными механизмами действия. В наших предыдущих исследованиях было установлено, что клетки всех используемых линий (R1, EGC-10 и F9) имеют практически идентичную структуру клеточного цикла с преимущественным нахождением клеток в S фазе и сходные профили экспрессии специфических генов (Гордеева и др., 2011). В экспериментах была использована следующая схема: посев клеток в одинаковой плотности → культивирование недифференцированных ЭСК, ЭГК и ЭТК до достижения 30–40% конfluence культуры → воздействие цитостатиков в течение 24 ч → отмена цитостатиков и культивирование в стандартной среде в течение последующих 24 ч. После завершения экспериментов подсчитывали число жизнеспособных клеток и выявляли в них активность щелочной фосфатазы.

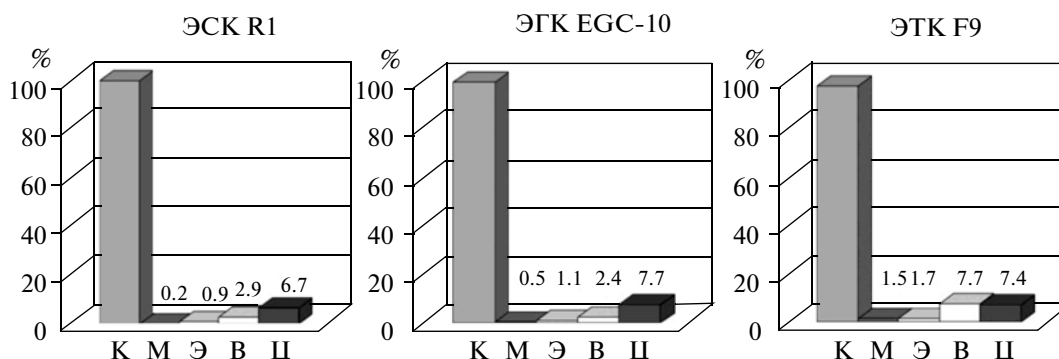
Анализ клеточного роста показал, что эффекты всех изучаемых цитостатиков были сходными для ЭСК, ЭГК и ЭТК. Наибольшие токсические и антипролиферативные эффекты оказывали митомин С и этопозид, т.к. после их воздействия выживали не более 1–2% клеток (рис. 1 и 2). Воздействие винбластина также подавляло рост и усиливало гибель клеток: лишь 1–4% клеток оставались жизнеспособными (рис. 1 и 2). Следует отметить, что эффекты винбластина на ЭСК, ЭГК и ЭТК различались: наибольшую чувствительность проявляли ЭСК и ЭГК (2.4–2.9% жизнеспособных клеток), наименьшую — ЭТК (7.7%). После воздействия циклогексимида на ЭСК, ЭГК и ЭТК мы наблюдали наибольшее число жизнеспособных клеток по сравнению с другими цитостатиками (рис. 1 и 2).

При воздействии изучаемых веществ на бластоцисты мыши никаких морфологических изменений в эмбрионах мы не наблюдали в течение 24 ч культивирования, и в связи с этим время экспозиции эмбрионов было увеличено до 48 ч. В течение этого времени бластоцисты прикреплялись к подложке планшета, и в ходе этого процесса нарушалась целостность трофобласта бластоцисты. По истечении 48 ч воздействия и последующих 24 ч культивирования бластоцист в среде без цитостатиков плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы полностью погибали, тогда как клетки трофобласта оставались жизнеспособными (рис. 2).

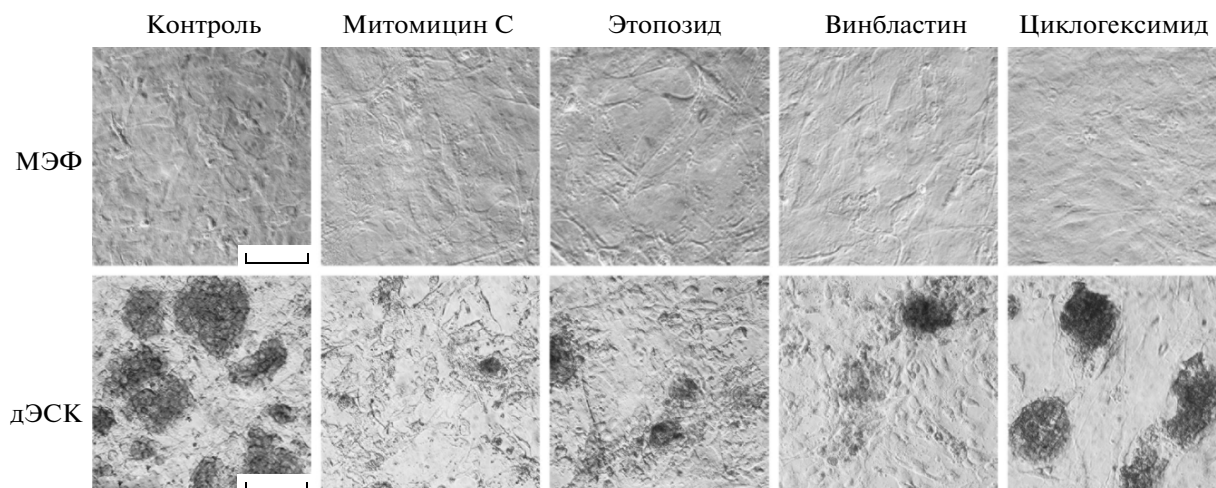
Таким образом, наши эксперименты показали, что все использованные в работе цитостатики наряду с антипролиферативными эффектами вызы-



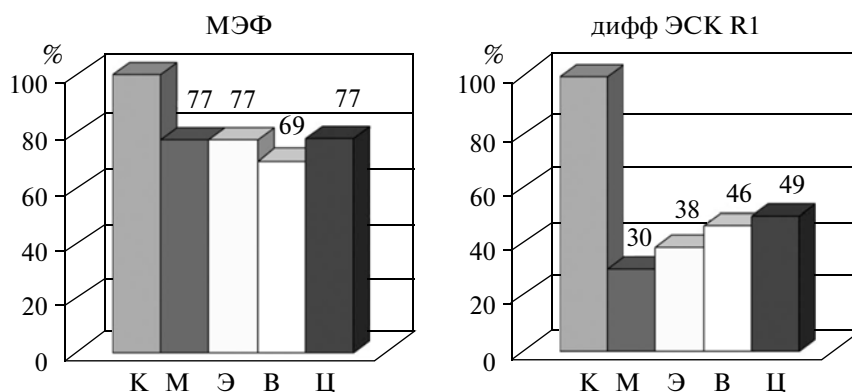
**Рис. 1.** Активность щелочной фосфатазы в недифференцированных плюрипотентных клетках мыши ЭСК R1, ЭГК EGC-10 и опухолевых клетках мыши ЭТК F9, подвергшихся воздействию цитостатиков в течение 24 ч. Морфология бластоцист мыши, подвергшихся воздействию цитостатиков в течение 24 и 48 ч. Масштаб: 100 мкм.



**Рис. 2.** Число жизнеспособных клеток ЭСК R1, ЭГК EGC-10 и ЭТК F9 в культурах, подвергшихся воздействию цитостатиков в течение 24 ч, а затем культивируемых в течение 24 ч в стандартной среде. По оси ординат – доля жизнеспособных клеток в процентах от контроля. Обозначения: К – контроль (100%); М – митомин; Э – этопозид; В – винбластин; Ц – циклогексимид. На гистограммах указаны точные значения процентных долей.



**Рис. 3.** Активность щелочной фосфатазы в ЭСК R1, индуцированных к дифференцировке ретиноевой кислотой, а затем подвергшихся воздействию цитостатиков в течение 24 ч. Морфология МЭФ, подвергшихся воздействию цитостатиков в течение 24 ч. Масштаб: 100 мкм.



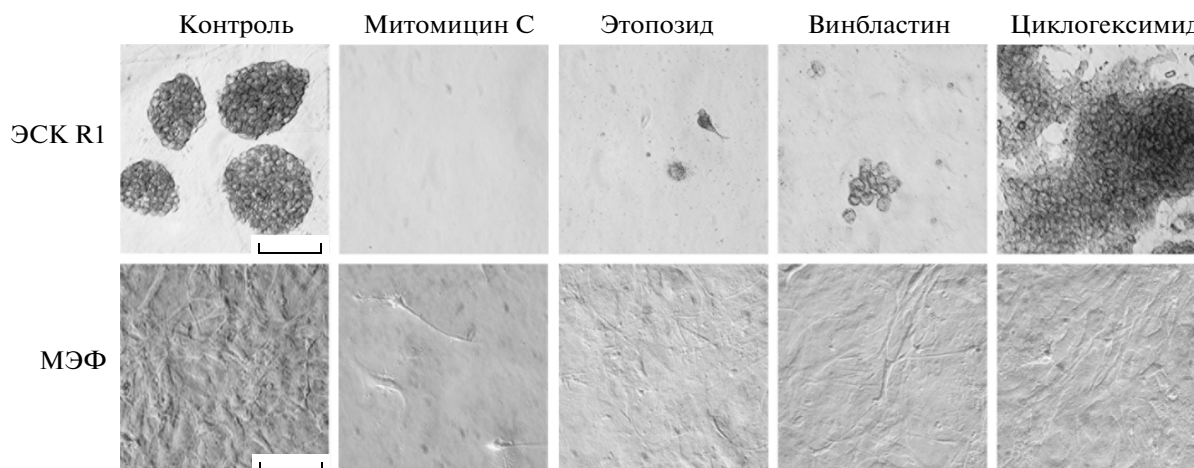
**Рис. 4.** Анализ роста дифференцированных ЭСК R1 и МЭФ, после воздействия цитостатиков в течение 24 ч. По оси ординат – доля жизнеспособных клеток в процентах от контроля. Обозначения: К – контроль (100%); М – митомин С; Э – этопозид; В – винбластин; Ц – циклогексимид. На гистограммах указаны точные значения процентных долей.

вают острые токсические процессы в плюрипотентных стволовых клетках мыши, а также в их опухолевых аналогах – ЭТК. Клетки трофобласта бластоцисты способны эффективно защищать внутреннюю клеточную массу от токсического действия цитостатиков при условии сохранения целостности трофоэктодермы. Клетки трофобласта менее чувствительны к повреждающим эффектам цитостатиков и лучше выживали по сравнению с клетками внутренней клеточной массы.

**Чувствительность дифференцирующихся ЭСК и МЭФ к действию различных типов цитостатиков.** Далее мы исследовали эффекты цитостатиков на дифференцированные клетки – эмбриональные фибробласты (эмбриональная мезенхима, стадия E 13.5) и на ЭСК, стимулированные к дифференцировке ретиноевой кислотой. Культуры ЭСК, подвергшиеся воздействию ретиноевой кислоты в

течение 3 сут, представляли собой смешанные популяции, состоящие из дифференцированных, дифференцирующихся и недифференцированных клеток. Доля недифференцированных клеток с высокой активностью щелочной фосфатазы была довольно высока на этой стадии дифференцировки (рис. 3). Изучение воздействия цитостатиков на МЭФ показало, что все вещества ингибируют пролиферативную активность клеток, но, в отличие от плюрипотентных и тератокарциномных клеток, не вызывают массовую клеточную гибель. Следует отметить, что все использованные цитостатики, независимо от механизма их токсического действия, ингибировали рост МЭФ на 30% по сравнению с контролем (рис. 4).

После воздействия цитостатиков на культуры ЭСК, предварительно индуцированных к дифференцировке ретиноевой кислотой, было обнару-



**Рис. 5.** Отдаленные эффекты цитостатиков в ЭСК R1 и МЭФ. Активность щелочной фосфатазы в ЭСК R1 и морфология МЭФ на 5 сут после отмены воздействия цитостаитиков. Масштаб: 100 мкм.

жено, что основной мишенью токсического действия являлись недифференцированные клетки, т.к. в опытных клеточных культурах сохранялись лишь единичные клетки, в которых была выявлена активность щелочной фосфатазы (рис. 3). Причем наибольшее число жизнеспособных недифференцированных клеток сохранялось в клеточных культурах, обработанных циклогексимида, как и при описанных выше воздействиях на недифференцированные ЭСК. В целом, после воздействия цитостатиков на популяции дифференцирующихся ЭСК число жизнеспособных клеток было значительно больше, чем после действия на недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки, т.к. дифференцирующиеся и дифференцированные ЭСК, как и МЭФ, были более устойчивы к действию цитостатиков (рис. 4).

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что все использованные цитостатики в выбранных дозах вызывают острые токсические эффекты в недифференцированных плюрипотентных стволовых клетках, тогда как в дифференцирующихся и дифференцированных эмбриональных клетках, способных к пролиферации, их эффекты были значительно слабее.

**Отсроченные эффекты цитостатиков на ЭСК и МЭФ.** Для выявления отсроченных эффектов цитостатиков мы исследовали выживаемость и рост недифференцированных ЭСК и МЭФ через 5 суток после воздействия. Результаты показали, что воздействие митомицина С на ЭСК приводило к полной гибели клеток, тогда как число жизнеспособных клеток, подвергшихся действию винбластина, не изменялось (рис. 5 и 6а). Однако число клеток в популяциях, подвергшихся воздействию этопозид и циклогексимида, возрастало

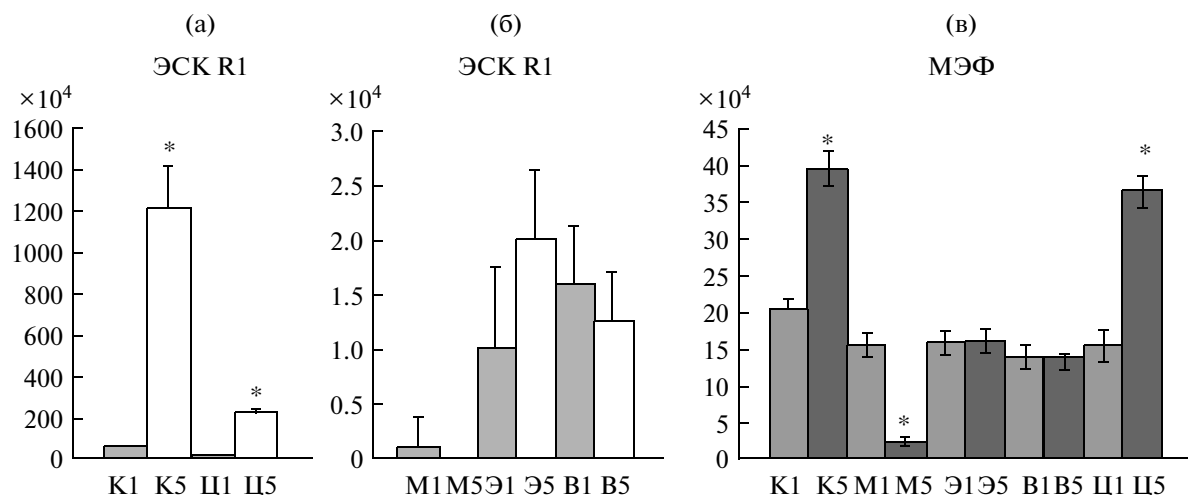
соответственно в 2 и 53 раза по сравнению с их числом, обнаруженным через 24 ч культивирования после отмены цитостатиков (рис. 6а, 6б). Стоит отметить, что, несмотря на значительный рост ЭСК, подвергшихся действию циклогексимида, он был существенно ниже, чем в контроле (Рис. 6б).

Изучение отсроченных эффектов цитостатиков на МЭФ показало, что, несмотря на незначительное снижение роста клеток (30%) в течение первых 24 ч после воздействия всех цитостатиков, на 5 сутки после отмены цитостатиков их эффекты существенно различались. Наибольший цитотоксический эффект проявлял митомицин С, т.к. на 5 сут после воздействия выживали только 6% клеток по сравнению с контролем и их число снижалось в 6 раз по сравнению с числом клеток через 24 ч после воздействия (рис. 5 и 6в). Число МЭФ на 5 сут после воздействия этопозид и винбластина не изменялось по сравнению с числом клеток через 24 ч после отмены цитостатиков, однако было в 2.5–3 раза ниже, чем в контроле (Рис. 5 и 6в). Наименьший отсроченный цитотоксический эффект на МЭФ проявлял циклогексимида. Число клеток на 5 сут после воздействия циклогексимида было практически одинаковым с контролем (91%), что свидетельствует об обратимости антипролиферативного и цитотоксического эффектов циклогексимида на МЭФ (рис. 5 и 6в).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В основе токсического действия цитостатиков лежит их способность повреждать генетический материал клеток или нарушать аппарат, обеспечивающий их пролиферацию, а также метаболизм





**Рис. 6.** Анализ отдаленных антипролиферативных и цитотоксических эффектов цитостатиков на рост ЭСК R1 (а, б) и МЭФ (в) на 5 сут после воздействия. По оси ординат – число жизнеспособных клеток, умноженное на  $10^4$ . Обозначения: K1, K5 – контроль на 1 и 5 сут после отмены цитостатиков; M1, M5 – митомин; Э1, Э5 – этопозид; B1, B5 – винбластин; Ц1, Ц5 – циклогексимид. \* – различия статистически достоверны при  $p < 0.01$ .

клетки. Наиболее чувствительными к цитотоксическому и генотоксическому действию цитостатиков являются активно делящиеся клетки в эмбрионах и в обновляющихся тканях взрослого организма. Последствия повреждений в клетках зависят от дозы цитостатиков и времени их воздействия. Высокие дозы вызывают антипролиферативный эффект и гибель клеток, более низкие – мутагенное, канцерогенное или тератогенное действие. Проведенные эксперименты по изучению эффектов цитостатиков с различными механизмами действия на недифференцированные плюрипотентные клетки мыши, а также клетки тератоканциномы показали, что их чувствительность к использованным цитостатикам была сходной, несмотря на различное происхождение изучаемых клеточных линий. Это можно объяснить тем, что все используемые линии имеют значительное сходство структуры их клеточного цикла (Гордеева и др., 2011). Время воздействия цитостатиков в эксперименте составляло 24 ч, что значительно больше времени удвоения популяции для ЭСК, ЭГК и ЭТК (14–16 ч) и длительности их клеточного цикла (11–14 ч). Таким образом, вероятность повреждения активно делящихся недифференцированных клеток была очень высока. В выбранных дозах все цитостатики проявляли острый цитотоксический эффект в недифференцированных ЭСК, ЭГК и ЭТК. Однако при тех же условиях (дозы и время экспозиции) воздействия цитостатиков на МЭФ и ЭСК, индуцированные к дифференцировке ретиноевой кислотой, их цитотоксические и антипролиферативные эффекты были значительно менее выражены. В основном, клеточной мише-

ню цитотоксического действия цитостатиков были остаточные недифференцированные клетки в популяциях дифференцирующихся ЭСК, тогда как дифференцированные клетки – производные ЭСК, как и МЭФ, были менее чувствительны к повреждающему действию. Эти эффекты можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, изменениями пролиферативной активности, т.к. в ходе дифференцировки ЭСК скорость их роста замедляется, продолжительность их клеточного цикла удлиняется и увеличивается доля клеток в  $G_1/G_0$  периоде клеточного цикла (Savatier et al., 1994, 1996; Jirmanova et al., 2002). Так в МЭФ, имеющих значительно более длинный клеточный цикл (время удвоения популяции 24–26 ч), воздействие всех цитостатиков в течение 24 ч не приводило к значительному снижению роста клеток. Кроме того, дифференцированные клетки могут переходить в  $G_0$  фазу клеточного цикла и становиться нечувствительными к повреждающему действию цитостатиков. Все эти изменения могут приводить к уменьшению вероятности повреждения клеток в период митоза. Во-вторых, снижение чувствительности клеток к цитостатикам может быть обусловлено изменениями в регуляции клеточной гибели. Известно, что в недифференцированных ЭСК повреждения ДНК не репарируются, и клетки подвергаются апоптозу, тогда как в дифференцирующихся ЭСК нарушения ДНК репарируются, и клетки продолжают двигаться по клеточному циклу (Burdon et al., 2002; Fluckiger et al., 2006; Becker et al., 2006; Chuykin et al., 2008; Momcilovic et al., 2009).

При изучении отсроченных эффектов цитостатиков на МЭФ и недифференцированные ЭСК было обнаружено, что воздействие митомицина, этопозид и винбластин является необратимым, и выжившие клетки не способны к дальнейшей пролиферации. Напротив, эффекты циклогексимида были обратимы: и МЭФ, и ЭСК быстро восстанавливали свой рост после его отмены. Тем не менее, число МЭФ, обработанных этопозидом и винбластином, оставалось на 5 сут таким же, как и через 24 ч после отмены цитостатиков, что свидетельствует о том, что эти цитостатики в выбранных дозах оказывают скорее антипролиферативный, но не цитотоксический эффект на дифференцированные эмбриональные клетки. В то же время, недифференцированные плюрипотентные клетки, подвергшиеся действию этих цитостатиков, практически полностью подвергаются апоптозу, а выжившие не способны к дальнейшей пролиферации. Эти результаты находятся в соответствии с полученными ранее данными о различных эффектах этопозид на недифференцированные ЭСК человека и дифференцированные из ЭСК гемопоэтические клетки (Vueno et al., 2009). Таким образом, различные цитотоксические эффекты этопозид и винбластин на недифференцированные плюрипотентные клетки и дифференцированные эмбриональные клетки позволяют рассматривать эти цитостатики и их аналоги в качестве препаратов-кандидатов для разработки методов избирательной элиминации остаточных недифференцированных плюрипотентных клеток из популяции дифференцирующихся клеток.

Ранее было показано, что этопозид, синтетический аналог растительного токсина подофиллотоксина, ингибирует топоизомеразу II, блокирует клетки в *S* и *G2* стадии клеточного цикла, а также индуцирует апоптоз, ингибируя синтез белков Mdm2 (Arriola et al., 1999; Ahn et al., 2011). Этопозид одобрен к применению для лечения мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легких, рака желудка, молочной железы и репродуктивных органов, лимфогранулематоза, неходжкинских лимфом, нелимфобластных лейкозов, сарком, нейробластом, хориокарцином (Perry, 2008). Однако он обладает высокой эмбриотоксичностью и тератогенностью (Nagao et al., 1999; Palo et al., 2005; Moneypenny et al., 2006; Vueno et al., 2009). Тем не менее, несмотря на сильный цитотоксический эффект этопозид, его генотоксические эффекты не столь выражены. Показано, что в ЭСК мыши с нокаутной инактивацией гена *p53*, воздействие этопозид не приводило к увеличению уровня мутаций в гене *Hprt* (Corbet et al., 1995). С другой стороны, в ЭСК человека и их клетках-производных

этопозид индуцировал различные перестройки в гене *MLL*, которые не имели селективного преимущества при последующем культивировании, но при хроническом воздействии этопозид число клеток с различными хромосомными аномалиями все же возрастало (Vueno et al., 2009).

Подобно этопозиду, растительный токсин винбластин — ингибитор сборки микротрубочек — широко применяется для лечения различных опухолей. Однако цитотоксические и тератогенные эффекты винбластин в половых клетках и ранних эмбрионах млекопитающих хорошо известны (Drasga et al., 1983; Russo et al., 1988; Weng et al., 1991; Jagetia et al., 1996; Palo et al., 2011). Кроме того, при воздействии винбластин на беременных мышей была обнаружена его высокая нейротоксичность, приводящая к морфофункциональным изменениям в мозгу потомков, а также нарушениям в их поведении (Van Calsteren et al., 2009; Nam et al., 2010). В этом контексте, при использовании винбластин для селективной элиминации недифференцированных клеток из популяции клеток, дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*, необходимо учитывать эти побочные эффекты для предотвращения риска структурно-функциональных нарушений в нейральных или других типах дифференцированных клеток.

Полученные нами данные впервые демонстрируют возможность селективной элиминации недифференцированных плюрипотентных клеток с использованием низкомолекулярных цитостатиков, применяемых в клинической практике. Однако для увеличения эффективности и безопасности этого подхода и предотвращения мутагенных, канцерогенных и тератогенных эффектов цитостатиков необходимы детальные исследования их эффектов при различных дозах и схемах воздействия на плюрипотентные стволовые клетки и дифференцированные клетки-производные.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379-а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Хайдуков С.В. Паттерны экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека связаны с регуляцией базового и первичного статусов плюрипотентности // Онтогенез. 2011. Т. 42. С. 403–424.
- Ahn J., Ko M., Lee C. et al. Srg3, a mouse homolog of BAF155, is a novel p53 target and acts as a tumor suppressor by modulating p21(WAF1/CIP1) expression // Oncogene. 2011. V. 30. P. 445–456.

- Arriola E.L., Lopez A.R., Chresta C.M. Differential regulation of p21waf-1/cip-1 and Mdm2 by etoposide: etoposide inhibits the p53-Mdm2 autoregulatory feedback loop // *Oncogene*. 1999. V. 18. P. 1081–1091.
- Becker K.A., Stein J.L., Lian J.B. et al. Establishment of histone gene regulation and cell cycle checkpoint control in human embryonic stem cells // *J. Cell Physiol*. 2006. V. 210. P. 517–526.
- Bueno C., Montes R., Catalina P., Rodríguez R., Menendez P. Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement // *Leukemia*. 2011. V. 25. P. 400–410.
- Boyd A.S., Wu D.C., Higashi Y., Wood K.J. A comparison of protocols used to generate insulin-producing cell clusters from mouse embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2008. V. 26. P. 1128–1137.
- Brederlau A., Correia A.S., Anisimov S.V. et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 1433–1440.
- Burdon T., Smith A., Savatier P. Signaling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells // *Trends Cell Biol*. 2002. V. 12. P. 432–438.
- Corbet S.W., Clarke A.R., Gledhill S., Bird C.C., Wyllie A.H. Embryonic stem cell-specific features of the cellular response to DNA-damaging agents // *J. Pathol*. 1995. V. 176 (Suppl). P. 17A.
- Chuykin I.A., Lianguzova M.S., Pospelova T.V., Pospelov V.A. Activation of DNA damage response signaling in mouse embryonic stem cells // *Cell Cycle*. 2008. V. 7. P. 2922–2928.
- Drasga R.E., Einhorn L.H., Williams S.D., Patel D.N., Stevens E.E. Fertility after chemotherapy for testicular cancer // *J. Clin. Oncol*. 1983. V. 1. P. 179–183.
- Fluckiger A.C., Marcy G., Marchand M. et al. Cell cycle features of primate embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 547–556.
- Jagetia G.C., Krishnamurthy H., Jyothi P. Evaluation of cytotoxic effects of different doses of vinblastine on mouse spermatogenesis by flow cytometry // *Toxicology*. 1996. V. 112. P. 227–236.
- Jirmanova L., Afanassieff M., Gobert-Gosse S. et al. Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells // *Oncogene*. 2002. V. 2. P. 515–528.
- Kiuru M., Boyer J.L., O'Connor T.P., Crystal R.G. Genetic control of wayward pluripotent stem cells and their progeny after transplantation // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. P. 289–300.
- Momčilović O., Choi S., Varum S. et al. Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated-dependent checkpoint signaling and G(2) but not G(1) cell cycle arrest in pluripotent human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2009. V. 27. P. 1822–1835.
- Money Penny C.G., Shao J., Song Y., Gallagher E.P. MLL rearrangements are induced by low doses of etoposide in human fetal hematopoietic stem cells // *Carcinogenesis*. 2006. V. 27. P. 874–881.
- Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Imai K. Developmental toxicity of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in rabbits after intravenous administration // *Teratog. Carcinog. Mutagen*. 1999. V. 19. P. 233–241.
- Nam C., Doi K., Nakayama H. Etoposide induces G2/M arrest and apoptosis in neural progenitor cells via DNA damage and an ATM/p53-related pathway // *Histol. Histopathol*. 2010. V. 25. P. 485–493.
- Palo A.K., Sahu P., Choudhury R.C. Etoposide-induced cytogenotoxicity in mouse spermatogonia and its potential transmission // *J. Appl. Toxicol*. 2005. V. 25. P. 94–100.
- Palo A.K., Pandit R.S., Choudhury R.C. Vinblastine-induced cytogenotoxicity in spermatogonia and its transmission in the germline cells of Swiss mice // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol*. 2011. V. 30. P. 113–121.
- Perry M.C. (ed.). The chemotherapy source book. Fourth Edition // Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2008; P. 1–739.
- Russo A., Pacchierotti F. Meiotic arrest and aneuploidy induced by vinblastine in mouse oocytes // *Mutat. Res*. 1988. V. 202. P. 215–221.
- Savatier P., Huang S., Szekely L. et al. Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts // *Oncogene*. 1994. V. 9. P. 809–818.
- Savatier P., Lapillonne H., van Grunsven L.A. et al. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells // *Oncogene*. 1996. V. 12. P. 309–322.
- Stead E., White J., Faast R. et al. Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities // *Oncogene*. 2002. V. 21. P. 8320–8333.
- Sundberg M., Andersson P., Akesson E. et al. Markers of pluripotency and differentiation in human neural precursor cells derived from embryonic stem cells and CNS tissue // *Cell Transplant*. 2011. V. 20. P. 177–191.
- Tang C., Lee A.S., Volkmer J.-P., Sahoo D. et al. An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells // *Nat. Biotechnol*. 2011. V. 29. P. 829–834.
- Van Calsteren K., Hartmann D., Van Aerschot L. et al. Vinblastine and doxorubicin administration to pregnant mice affects brain development and behaviour in the offspring // *Neurotoxicology*. 2009. V. 30. P. 647–657.
- Vander Heiden M.G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens // *Nat. Rev. Drug Disc*. 2011. V. 10. P. 671–684.
- Weng J.L., Kempainen B.W., Stringfellow D., Paxton R., Price S. Effects of a teratogen, vinblastine, on cellular proteins in an embryonic cell line // *Teratology*. 1991. V. 43. P. 462.
- White J., Stead E., Faast R. et al. Developmental activation of the Rb-E2F pathway and establishment of cell cycle regulated Cdk activity during embryonic stem cell differentiation // *Mol. Biol. Cell*. 2005. V. 16. P. 2018–2027.

## Antiproliferative and Cytotoxic Effects of Different Type Cytostatics on Mouse Pluripotent Stem and Teratocarcinoma Cells

O. F. Gordeeva

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia  
e-mail: olgagordeeva@yandex.ru*

**Abstract**—Pluripotent stem cells are able to proliferate indefinitely and differentiate in vitro into various cell types. However, in most cases in vitro differentiation of the pluripotent stem cells is asynchronous and incomplete, and the residual undifferentiated cells can initiate teratoma development after transplantation into recipients. These features of the pluripotent stem cells are the major issue for development of safe cell therapy technologies based on pluripotent stem cells. Considering significant resemblance of growth rates of pluripotent stem and cancer cells we investigated antiproliferative and cytotoxic effects of different type cytostatics (mitomycin C, etoposide, vinblastine and cycloheximide) on the undifferentiated and differentiating mouse embryonic stem cells, embryonic germ cells, blastocyst and on mouse embryonal teratocarcinoma cells and mouse embryonic fibroblasts. The findings showed that all cytostatics used induced both antiproliferative effects and acute toxic processes in undifferentiated pluripotent stem cells and embryonal teratocarcinoma cells whereas these effects were less in differentiating embryonic stem cells and embryonic fibroblast. Moreover, the trophoblast cells of mouse blastocysts were less sensitive to damaging effects of cytostatics than inner cell mass cells. The examination of deferred effects of cytostatics revealed that the effects of mitomycin C, etoposide and vinblastine, but not cycloheximide, were irreversible because survived cells were not able to proliferate. Nevertheless, the numbers of embryonic fibroblasts exposed to etoposide or vinblastine remained unchanged while vast majority of undifferentiated pluripotent cells treated underwent apoptosis. Thus, diverse effects of etoposide and vinblastine on the undifferentiated pluripotent stem cells and differentiated embryonic cells allow us to consider these cytostatics and their analogs as drug-candidates for selective elimination of the residual undifferentiated pluripotent stem cells from population of differentiating cells. These findings demonstrate for the first time the possibility of selective elimination of undifferentiated pluripotent stem cells using cytostatic drugs approved for clinic practice. However, to improve effectiveness and safety of this approach and to prevent mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects on undifferentiated pluripotent stem cells and their differentiated cell derivatives large-scale studies of cytostatic effects using different experimental design and active doses must be performed.

**Keywords:** embryonic stem cells, blastocyst, embryonic germ cells, teratocarcinoma, cytostatics, mitomycin C, etoposide, vinblastine, cycloheximide, retinoid acid, differentiation, cytotoxicity, embryotoxicity.

## КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 576.35

### ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРА И ИНГИБИТОРОВ $Ca^{2+}$ -КАНАЛОВ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ИНФУЗОРИЙ

#### *Tetrahymena pyriformis*

© 2012 г. И. В. Шемарова\*, Г. В. Селиванова, Т. Д. Власова

Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4

\*Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН,  
194223 Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, д. 44

Поступила в редакцию 04.05.10 г.

Окончательный вариант получен 23.08.11 г.

Установлено, что у инфузорий *T. pyriformis* под действием активатора (кофеина) и ингибиторов  $Ca^{2+}$ -каналов (верапамила),  $NiCl_2$  и  $CdCl_2$  происходит изменение содержания ДНК в макронклеусах. Кофеин (10 мМ) стимулирует синтез ДНК. Верапамил (5 мкМ),  $CdCl_2$  (125 мкМ),  $NiCl_2$  (100 мкМ) понижают содержание ДНК в макронклеусах уже к 30 мин после пролиферативной стимуляции. К 4 ч инкубации в макронклеусах тетрахимен, предобработанных верапамилом, содержится в среднем на 10% меньше ДНК, чем в контрольных клетках. Клетки, предобработанные  $CdCl_2$  и  $NiCl_2$ , отличаются от контрольных более низким содержанием ДНК практически на всех исследуемых сроках, но к 4 ч, восстанавливают уровень ядерной ДНК. Предполагается, что передача пролиферативных сигналов у *T. pyriformis* носит  $Ca^{2+}$ -зависимый характер.

**Ключевые слова:** *Tetrahymena pyriformis*, внутриклеточная сигнализация, пролиферация,  $Ca^{2+}$ , кофеин, верапамил,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , клеточный цикл.

Одноклеточные микроорганизмы представляют собой типичный пример системы с индуцированным синтезом ДНК и являются удобным объектом для изучения механизмов передачи и реализации митогенного сигнала в клетках эукариот.

В предыдущем исследовании мы обнаружили различия в действии кофеина на *Tetrahymena pyriformis*, стимулированные и не стимулированные эпидермальным фактором роста (ЭФР). Тогда же было показано, что ингибиторы PLC и PKC (соединение U73122 и хелететрин соответственно) существенно замедляют скорость синтеза ДНК (Шемарова и др., 2008). В клетках позвоночных животных действие PLC и PKC на пролиферацию связывают, прежде всего, с их способностью фосфорилировать субстраты, изменение активности которых в свою очередь влияет на активность  $Ca^{2+}$ -зависимых MAP-киназ (Нео et al., 2006; Lee et al., 2006). У одноклеточных изменение активности  $Ca^{2+}$ -зависимых киназ, вызванное повышением концентрации ионов  $Ca^{2+}$ , также является индуктором различных программируемых процессов (Шемарова, Нестеров, 2005), включая пролиферацию (Roisin et al., 2000). В связи с вышеизложенным, нам представлялось важным продолжить начатые исследования и выяснить, каким образом повлияет на синтез ДНК предобработка *T. pyriformis* активатором и ингибиторами  $Ca^{2+}$ -каналов.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Экспериментальная часть работы была выполнена на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* (амикронуклеусный штамм GL), выращиваемых аксенически при 28°C в среде следующего состава: 100 мг/л NaCl, 10 мг/л KCl, 10 мг/л  $CaCl_2$  и  $MgCl_2$ , 20 мг/л  $NaHCO_3$ , 1 г/л сухого экстракта бычьей печени ("Difco", США), 15 г/л пептона (Richter, Венгрия), 2 г/л сухого дрожжевого экстракта ("Serva", Германия) и 0.1 мл/л трисульфата. Условия выращивания клеток описаны ранее (Шемарова и др., 2002). В качестве исходной использовали 48-часовую культуру, в которой клетки находились в стационарной фазе роста (Ирлина, Меркулова, 1975). В опытные пробы объемом 5.0 мл добавляли 0.01 мл тестируемых веществ: 500 мМ кофеина, 2.5 мМ верапамила, 50 мМ хлористого никеля, 62.5 мМ хлористого кадмия. Пробы инкубировали 30 мин при 28°C, затем центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин, после чего отмывали от веществ минеральной средой Лозина-Лозинского и повторно центрифугировали при тех же условиях. К осадку опытных и контрольных клеток объемом 0.3 мл добавляли 0.7 мл свежей питательной среды (СПС). Сразу после добавления СПС 0.05 мл культуры из контрольной пробы фиксировали на предметном стекле (два микропрепарата) для последующего определения содержания ДНК в ядрах тетрахимен в

Влияние кофеина и ингибиторов Ca<sup>2+</sup>-каналов на содержание ДНК (отн. ед.) в ядрах *Tetrahymena pyriformis*

Сроки фиксации клеток, ч	Контроль	Верапамил	Кофеин	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>
0	4.87 ± 0.16	—	—	—	—
0.5	5.48 ± 0.16	4.75 ± 0.18	6.69 ± 0.16	4.53 ± 0.18	4.78 ± 0.15
1.0	5.54 ± 0.14	5.16 ± 0.15	6.69 ± 0.20	4.73 ± 0.17	5.44 ± 0.14
1.5	5.82 ± 0.14	4.68 ± 0.14	6.30 ± 0.17	5.24 ± 0.17	5.43 ± 0.19
2.0	5.44 ± 0.13	5.26 ± 0.14	6.35 ± 0.18	5.32 ± 0.16	4.59 ± 0.14
2.5	5.02 ± 0.15	5.62 ± 0.15	7.28 ± 0.18	5.15 ± 0.16	4.98 ± 0.15
3.0	6.00 ± 0.17	5.75 ± 0.15	6.34 ± 0.19	5.26 ± 0.18	5.24 ± 0.15
3.5	5.24 ± 0.15	5.03 ± 0.15	5.69 ± 0.14	6.12 ± 0.18	5.44 ± 0.16
4.0	5.40 ± 0.19	4.79 ± 0.16	7.51 ± 0.16	5.82 ± 0.19	5.35 ± 0.15

стартовой точке (0 мин). В дальнейшем отбор и фиксацию опытных проб проводили через каждые 30 мин на протяжении 4 ч культивирования тетрагимен при 28°C. Измерение содержания ДНК проводили в фиксированных жидкостью Карнуа и окрашенных по Фельгену микропрепаратах методом одноволновой абсорбционной цитофотометрии с использованием ядерных зондов диаметром 4, 6, 8 и 10 мкм. При этом измеряемые ядра инфузорий вписывались целиком в подобранные к их размеру зонды. Основная масса ядер вписывалась в зонды диаметром 6, 8 и 10 мкм. Фотометрирование ядер производилось при 550 нм с использованием 50× объектива. Содержание ДНК определяли по формуле:  $Q = D \times S$ , где  $D$  – оптическая плотность, создаваемая в пределах описывающих его зонда, а  $S$  – площадь зонда.

Данные представлены в виде среднearифметических значений и их ошибок, вычисленных по результатам измерения содержания ДНК в 100 клетках с обозначением доверительного интервала ( $\bar{x} \pm Sx$ ). Достоверность различия средних оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента.

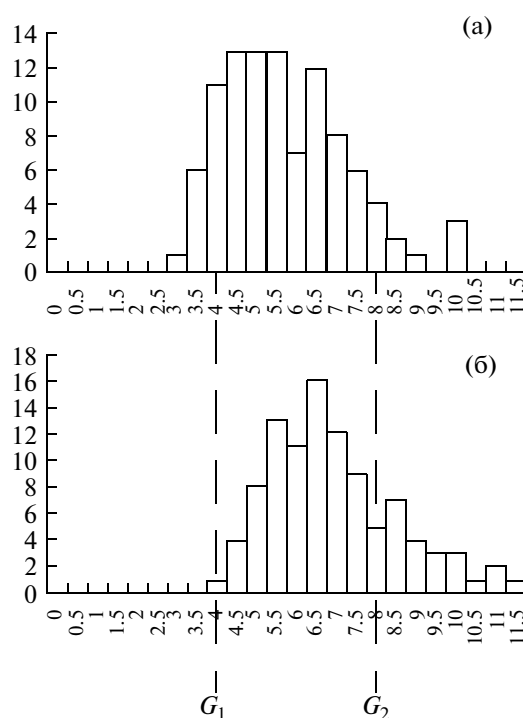
В работе использовали неорганические соли производства “Вектон” (Санкт-Петербург).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Действие кофеина.** В данных экспериментах мы изучали митогенное действие кофеина (10 мМ) на клетки, индуцированные к росту путем их переноса в СПС. В концентрации 10 мМ кофеин стимулировал синтез ДНК (таблица). Увеличение синтеза ДНК в опытных культурах отмечали уже через 0.5 ч от начала эксперимента. При этом относительное содержание ДНК в клетках, прединкубированных с кофеином, относительно контроля составило 122%. Повышенное содержание ДНК в опытных пробах отмечали практически на протяжении всего периода на-

блюдения (7 сроков из 8), причем на сроках 2.5 и 4 ч наблюдали наличие двух максимумов в содержании ДНК, превышающие максимум в контроле на 21 и 25% соответственно.

Из гистограмм распределения клеток по содержанию ДНК видно следующее. Во-первых, под действием кофеина по сравнению с контролем происходит более массовое и раннее вступление клеток в фазу  $G_2$  клеточного цикла, что может



**Рис. 1.** Распределение клеток *T. pyriformis* по содержанию ДНК без обработки (а) и после их предобработки 10 мМ кофеином через 0.5 ч после культивирования в СПС (б).

По оси абсцисс – содержание ДНК, отн. ед. По оси ординат – количество клеток, % (для рис. 1–5).

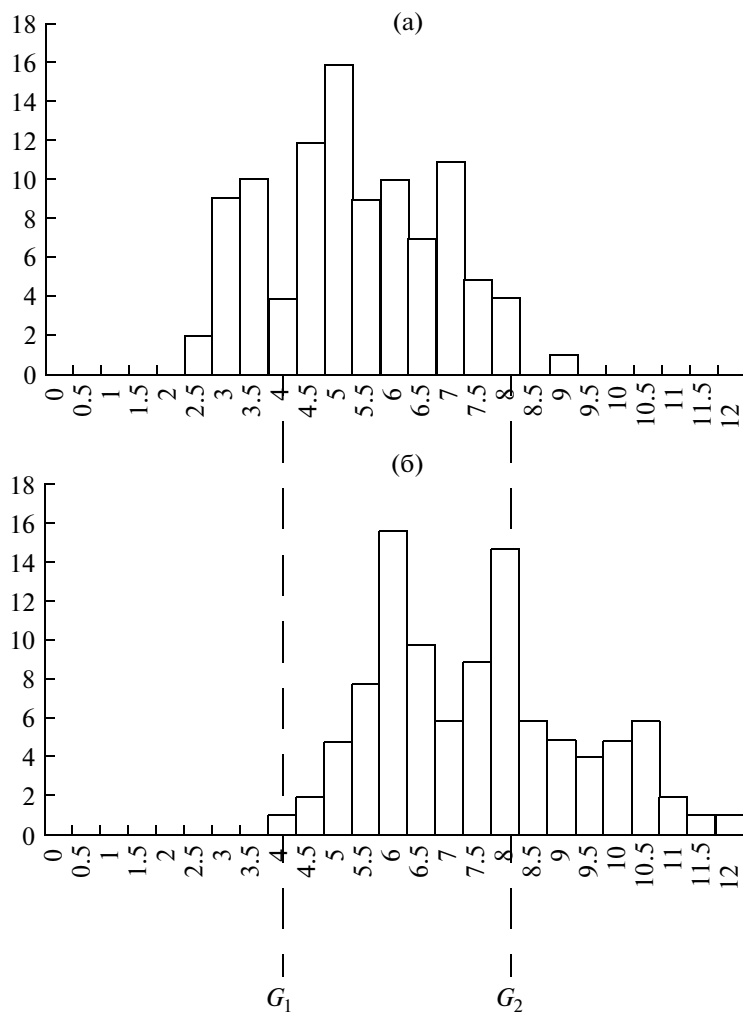


Рис. 2. Распределение клеток *T. pyriformis* по содержанию ДНК без обработки (а) и после их предобработки 10 мМ кофеином через 2.5 ч после культивирования в СПС (б).

свидетельствовать о его синхронизирующем и митогенном действии на тетрахимен (рис. 1а, 1б). Во-вторых, под действием кофеина клетки быстрее вступают в фазу синтеза ДНК и соответственно в фазу деления. На это указывает распределение опытных и контрольных клеток по фазам клеточного цикла на сроке 2.5 ч (рис. 2а, 2б). Из данных гистограммы видно, что на этом сроке большая часть популяции опытных клеток находилась в фазах  $G_2/S$  и  $G_2$ , в то время как контрольные клетки – в фазах  $G_1/S$  и  $S$ . Лишь к 3-м ч в контрольной популяции стали появляться клетки, характеризующиеся удвоенным, постсинтетическим количеством ДНК в фазе  $G_2$ . В-третьих, под действием кофеина происходит более раннее вступление клеток во второй клеточный цикл, на что указывает большее по сравнению с контролем количество опытных клеток, перешедших в фазу  $G_2$  клеточного цикла к 4-м ч культивирования (данные не показаны).

Полученные данные говорят о том, что в пороговых концентрациях кофеин стимулирует синтез ядерной ДНК у *T. pyriformis*. В литературе имеются примеры, свидетельствующие о митогенном действии физиологических концентраций кофеина на клетки. В частности, отмечено, что воздействие 20 мМ кофеина на первичную культуру стромальных клеток простаты стимулирует пролиферацию (Wu et al., 2005). Сходный эффект кофеина выявлен и в отношении небласттрансформированных клеток млекопитающих (Chiarella, Puglisi, 2004; Sacks et al., 2008), почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Martin et al., 2000; Kim et al., 2008), инфузорий *Tetrahymena thermophila* (Yakisich et al., 2006) и бактерий (Lawrence et al., 2005). В то же время имеются указания и на возможность ингибирующего действия кофеина на рост клеток разных типов (Isfort et al., 1996; Desfrere et al., 2007), в том числе и клеток низших эукариот (Yeung et al., 2006).

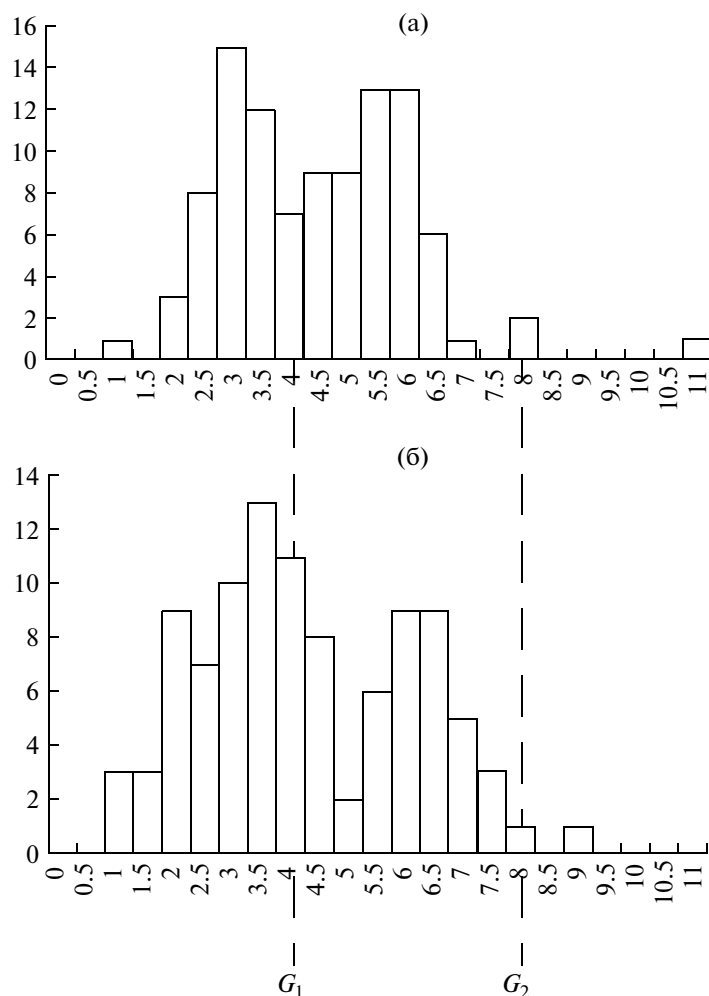


Рис. 3. Распределение клеток *T. pyriformis* по содержанию ДНК до и после их предобработки 5 мкМ верапамилом (а) и 125 мкМ хлористым кадмием (б) через 0.5 ч после культивирования в СПС.

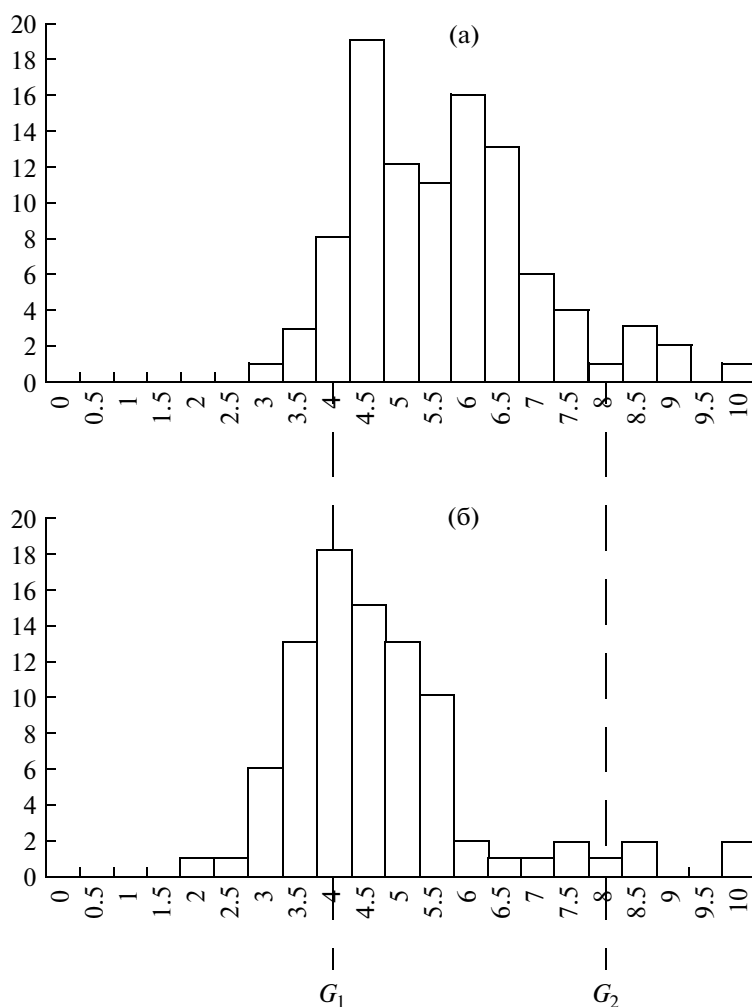
Механизм митогенного действия кофеина на клетки преимущественно связывают с его Ca<sup>2+</sup>-мобилизующей функцией и коактивацией пролиферативных сигнальных путей, зависящих от кальциевого сигнала. На это указывает корреляция между степенью стимуляции рецепторов факторов роста, внутриклеточной концентрацией Ca<sup>2+</sup> и активностью протеинкиназ (Ragel et al., 2007; Furuhashi et al., 2008; Ge et al., 2009). Ингибирующий эффект кофеина на рост клеток может быть обусловлен как его воздействием на генетический аппарат клетки через Ca<sup>2+</sup>-зависимый механизм регуляции экспрессии генов раннего ответа (Isfort et al., 1996), так и прямым блокирующим действием на ключевые ядерные киназы (Lambert, Carr, 2005). По-видимому, характер ответа клеток на воздействие кофеином зависит от видовых особенностей клеточных систем и от его концентрации.

Интересно, что экспериментальные данные, полученные на одноклеточных организмах, пол-

ностью подтверждают участие Ca<sup>2+</sup> в процессах регуляции событий клеточного цикла. Так, имеются указания на то, что изменение концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> влияет на продолжительность клеточного цикла у одноклеточной водоросли *Cryptocodinium cohnii* (Yeung et al., 2006), дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Martin et al., 2000; Kim et al., 2008) и инфузорий *Tetrahymena thermophila* (Yakisich et al., 2006). Пути воздействия кофеина на протистов практически не изучены, но имеются основания полагать, что в основе его действия на синтез ДНК лежат Ca<sup>2+</sup>-зависимые механизмы регуляции активности ядерных киназ, сходные с таковыми в клетках высших эукариот (Martin et al., 2000; Yakisich et al., 2006; Kim et al., 2008).

**Действие ингибиторов Ca<sup>2+</sup>-каналов.** Для того, чтобы выяснить, насколько скорость синтеза ДНК у одноклеточных зависит от вне- и внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, в следующей серии экспериментов культуры тетрахимен мы прединкубировали с блокаторами Ca<sup>2+</sup>-каналов различных типов. Ре-





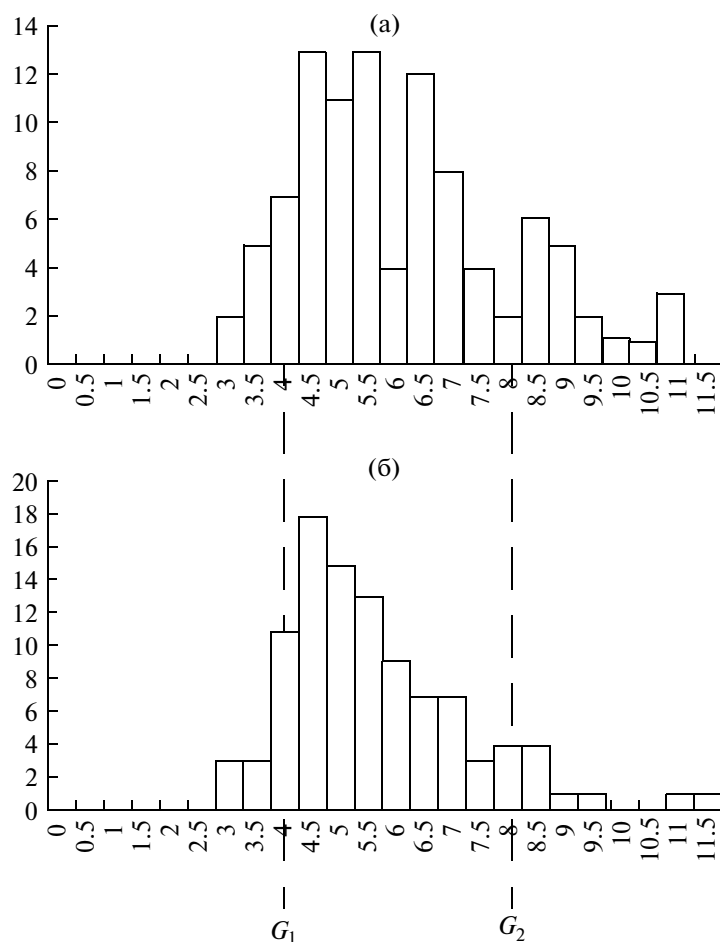
**Рис. 4.** Распределение клеток *T. pyriformis* по содержанию ДНК без обработки (а) и после их предобработки 100 мкМ хлористым никелем (б) через 2 ч после культивирования в СПС.

зультаты опытов отражены в таблице и на рисунках 3–5.

Все испытуемые ингибиторы (верапамил,  $\text{CdCl}_2$  и  $\text{NiCl}_2$ ) задерживали вступление клеток в клеточный цикл (таблица). По сравнению с контролем на нулевом сроке опытные клетки в присутствии ингибиторов дольше оставались в пререпликативном периоде, о чем свидетельствует отсутствие увеличения содержания ДНК в опытных клетках на сроке 0.5 ч. В фазу синтеза ДНК (2 ч культивирования) наименьшее содержание ДНК отмечено в клетках, прединкубированных с  $\text{NiCl}_2$ . В этом случае содержание ядерной ДНК в опытных клетках составило 87% относительно контроля на том же сроке, в то время как в клетках, прединкубированных с  $\text{CdCl}_2$  и верапамилем, – 97 и 98% соответственно. В постсинтетическую фазу на сроке 3 ч все опытные клетки имели пониженное по сравнению с контролем содержание ДНК, а именно: клетки, прединкубированные с  $\text{CdCl}_2$ , содержали в среднем 87%

ДНК, с  $\text{NiCl}_2$  и верапамилем – 87 и 96% ДНК соответственно. Вступление контрольных клеток в новый клеточный цикл отмечали на сроке 3.5 ч, что сопровождалось снижением максимального содержания ДНК в ядрах клеток. В опытных клетках снижение максимального уровня ядерной ДНК наблюдали только в клетках, прединкубированных с верапамилем, а в клетках, прединкубированных с  $\text{CdCl}_2$  и  $\text{NiCl}_2$ , напротив, отмечали более высокое содержание ДНК, что может говорить о разном действии испытуемых ингибиторов на тетрахимен (подробнее эти результаты обсуждаются ниже).

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла показал, что под действием верапамила и  $\text{CdCl}_2$  сразу после пролиферативной стимуляции (на сроке 0.5 ч) происходит увеличение (по сравнению с контролем) доли клеток с диплоидным содержанием ДНК (рис. 1а и 3а, 3б), что может быть связано с вступлением в цикл субпопуляции клеток, перешедших в пререплика-



**Рис. 5.** Распределение клеток *T. pyriformis* по содержанию ДНК без обработки (а) и после их преобработки 100 мкМ хлористым никелем через 4 ч после культивирования в СПС (б).

тивный период в фазе  $G_2/M$  (Епифанова и др., 1988). По-видимому, именно они влияют на смещение показателей гистограммы вправо и нивелируют разницу в содержании ДНК в контрольных и опытных пробах на протяжении последующих фаз клеточного цикла. Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что верапамил и  $\text{Cd}^{2+}$  с одной стороны инициируют деление клеток, находящихся вне клеточного цикла в фазе  $G_2/M$  (абортное клеточное деление), но с другой, тормозят синтез ДНК в клетках, вступивших в клеточный цикл в фазе  $G_1/G_0$ . Чтобы прояснить ситуацию, требуется использование более совершенных методов синхронизации клеточной культуры. Примененный в нашей работе наиболее щадящий физиологический метод синхронизации (перенос клеток в свежую питательную среду) не позволяет на этапе активации пролиферации получить однородную популяцию клеток, синхронизированных в фазе  $G_1$  клеточного цикла, что затрудняет интерпретацию полученных результатов (Шемарова и др., 2002). Интересно, что на сроке 3.5 ч (соответствующем

постмитотической фазе клеточного цикла) в опытных культурах, прединкубированных с верапамилем, обнаруживались полиплоидные клетки. Такие же клетки наблюдали исследователи, использующие жесткие условия ядерной синхронизации (Scherbaum, Zeuthen, 1954; Zeuthen, 1971). По-видимому, их появление обусловлено нарушением верапамилем репликации ДНК, что приводит к появлению aberrантных клеток, вступающих в фазу  $G_1$  второго клеточного цикла с удвоенным количеством ДНК.

В клетках млекопитающих верапамил и  $\text{Cd}^{2+}$  инициируют значительно более выраженную задержку продвижения клеток по клеточному циклу (Grier, Mastro, 1985; Paquet et al., 1990; Koo et al., 2008; Singh et al., 2009). Объясняется это тем, что в систему  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции программируемых клеточных процессов в клетках позвоночных животных включены мембранные белки и гены, предположительно отсутствующие у протистов (Шемарова, Нестеров, 2005). В частности, у большинства видов одноклеточных микроорганизмов отсутствуют потенциалуправ-

ляемые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы ( $\text{Ca}(v)$ ), через которые в электровозбудимые клетки позвоночных поступают основные потоки внеклеточного кальция. Однако у инфузорий такие каналы есть (Шемарова, Нес-теров, 2005), поэтому мы предполагаем возможность их участия в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза и, следовательно, в контроле программируемых  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых процессов. Полученные в этом эксперименте данные позволяют полагать, что регуляция пролиферации у тетрахимен лишь в незначительной степени зависит от  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающего через  $\text{Ca}(v)$ -каналы. По-видимому поступающий через эти каналы  $\text{Ca}^{2+}$  участвует преимущественно в регуляции цилиарной активности, обеспечивающей специфический и практически мгновенный ответ инфузорий на механическое раздражение.

Примечательно, что ионы  $\text{Cd}^{2+}$  в наших экспериментах также не оказывали заметного действия на пролиферацию тетрахимен.  $\text{Cd}^{2+}$  относится к группе неорганических блокаторов неселективных ионных каналов плазматической мембраны и модуляторов активности  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа (Guangqin et al., 2004). На клетки позвоночных животных  $\text{Cd}^{2+}$  оказывает плеiotропное действие, а в высоких концентрациях вызывает задержку клеточного роста и апоптоз (El Azzouzi et al., 1994; Singh et al., 2009). Мы предположили получить результаты, свидетельствующие о сходстве в механизмах действия  $\text{Cd}^{2+}$  на клетки высших и низших эукариот. Однако полученные данные не подтвердили наших предположений. Учитывая результаты по действию на синтез ДНК верапамила, можно предположить, что внеклеточный  $\text{Ca}^{2+}$ , который поступает через ионные каналы плазматической мембраны, используется исключительно для регуляции мембранной активности клеток.

Интересный результат получен нами и при использовании  $\text{NiCl}_2$ , неселективного блокатора электроуправляемых и емкостных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Важно отметить, что в отличие от  $\text{Cd}^{2+}$  и верапамила,  $\text{Ni}^{2+}$  в наших экспериментах оказал на синтез ДНК длительное ингибирующее действие. При этом синтез ядерной ДНК снижался, по крайней мере, на протяжении двух клеточных циклов (до 4-х ч культивирования). Из представленных в таблице данных видно, что через 0.5 ч после пролиферативной стимуляции в опытных клетках, прединкубированных с  $\text{Ni}^{2+}$ , содержание ДНК в ядрах было значительно ниже, чем в контроле. Низкая митотическая активность тетрахимен, прединкубированных с  $\text{Ni}^{2+}$ , сохранялась на протяжении всего периода наблюдения (4 ч). Показательны и результаты анализа гистограмм распределения этих клеток по фазам клеточного цикла. По клеточному циклу продвигалась лишь незначительная часть популяции клеток (менее 10%), перешедшая в пререпликативный период в

фазе  $G_2/M$ , (также как и при воздействии верапамилом), а остальная часть клеточной популяции задерживалась на границе фаз  $G_1/S$ . Особенно наглядно это видно из гистограммы, представленной на рис. 4, демонстрирующей распределение клеток по содержанию ДНК через 2 ч культивирования. На момент окончания эксперимента (4 ч), когда контрольные клетки вступали во второй клеточный цикл, клетки, прединкубированных с  $\text{Ni}^{2+}$ , все еще содержали промежуточное количество ДНК (рис. 5).

В литературе имеются примеры подавления синтеза ДНК под действием  $\text{Ni}^{2+}$  (Fischer, Skreb, 2001; Moll et al., 2002; Wong et al., 2006). Большинство авторов связывает это с его блокирующим действием на  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы (Yang et al., 2005; Wong et al., 2006), хотя имеются доказательства и его прямого воздействия на генетический аппарат клетки (Wozniak et al., 2006; Caicedo et al., 2008; Salnikow, Zhitkovich, 2008).

Считается, что  $\text{Ni}^{2+}$  – неселективный блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (Wong et al., 2006). Эффективность  $\text{Ni}^{2+}$  как блокатора установлена в отношении  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L- и T-типов, а также емкостных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, управляемых высвобождением  $\text{Ca}^{2+}$  из депо (Clarson et al., 2003; Yang et al., 2005). Причем ингибирующее действие  $\text{Ni}^{2+}$  в отношении емкостных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов является наиболее выраженным (Ng, Gurney, 2001; Padar et al., 2005; Yang et al., 2005). В клетках Metazoa такие каналы локализируются в мембране  $\text{Ca}^{2+}$ -депонирующих структур, сопряженных с плазматической мембраной (Vannier et al., 1999). Важно подчеркнуть, что в их структуру входят белки TRP, активируемые временным изменением мембранного потенциала (Minke, Selinger, 1996; Vannier et al., 1999), поэтому механизм их регуляции также носит потенциал-зависимый характер. Последнее позволяет предположить наличие функциональной связи между изменением мембранного потенциала и ингибирующим действием  $\text{Ni}^{2+}$  на синтез ДНК. Ранее мы уже отмечали значительную роль мембранного потенциала в сигнальной трансдукции у низших эукариот и подчеркивали, что особо важное значение он играет в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых программируемых процессов (Шемарова, 2007). В этой связи полученные в эксперименте с  $\text{Ni}^{2+}$  результаты представляется возможным объяснить следующим образом.  $\text{Ni}^{2+}$  вызывает блокаду емкостных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, вследствие чего кальциевые депо, опустошенные в результате деполяризации мембраны в СПС, не заполняются, и митогенный сигнал из-за отсутствия кальциевой волны дальше по сигнальной цепочке не идет. Исследования с использованием методов визуализации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  позволят прояснить этот вопрос.

Таким образом, на основании полученных результатов и литературных данных представляется возможным полагать, что в *T. pyriformis* митогенный сигнальный путь носит Ca<sup>2+</sup>-зависимый характер. Этот путь активируется кофеином, который стимулирует высвобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, и блокируется NiCl<sub>2</sub>, ингибитором емкостных Ca<sup>2+</sup>-каналов, которые управляются высвобождением Ca<sup>2+</sup> из депо.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Авдонин П.В., Ткачук В.А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. М.: Наука, 1994. 288 с.
- Епифанова О.И., Полуновский В.А., Терских В.В. Регуляция размножения клеток в процессе специализации, старения и неопластической трансформации. М.: ВИНТИ. Итоги науки и техники, 1988. Т. 11. 120 с.
- Ирлина И.С., Меркулова Н.А. Выращивание больших масс *Tetrahymena pyriformis*, пригодных для биохимических исследований и синхронизация делений инфузорий // Цитология. 1975. Т. 17. № 10. С. 1208–1215.
- Шемарова И.В. Роль сдвигов мембранного потенциала на начальных стадиях проведения сигнала в клетках низших эукариот // Цитология. 2007. Т. 49. № 11. С. 952–265.
- Шемарова И.В., Нестеров В.П. Эволюция механизмов Ca<sup>2+</sup> сигнализации. Роль ионов Ca<sup>2+</sup> в передаче сигнала у низших эукариот // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2005. Т. 41. № 4. С. 303–313.
- Шемарова И.В., Нестеров В.П. Эволюция механизмов Ca<sup>2+</sup> сигнализации. Роль Ca<sup>2+</sup> в регуляции фундаментальных клеточных функций // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2008. Т. 44. № 4. С. 341–351.
- Шемарова И.В., Селиванова Г.В., Власова Т.Д. Влияние эпидермального фактора роста и инсулина на пролиферацию и синтез ДНК в клетках цилиат *Tetrahymena pyriformis* // Цитология. 2002. Т. 44. № 11. С. 1097–1103.
- Шемарова И.В., Селиванова Г.В., Власова Т.Д. Изменение содержания ДНК у стимулированных ЭФР инфузорий *Tetrahymena pyriformis* под действием кофеина, KCl и ингибиторов PLC и PKC // Цитология. 2008. Т. 50. № 11. С. 999–2004.
- Cai X. Unicellular Ca<sup>2+</sup> signaling 'toolkit' at the origin of metazoa // Mol. Biol. Evol. 2008. V. 25. P. 1357–1361.
- Caicedo M., Jacobs J.J., Reddy A. et al. Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T-cells demonstrates Ni<sup>2+</sup> and V<sup>3+</sup> are more toxic than other metals: Al<sup>3+</sup>, Be<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mo<sup>5+</sup>, Nb<sup>5+</sup>, Zr<sup>2+</sup> // J. Biomed. Mater. Res. A. 2008. V. 86. P. 905–913.
- Chiarella P., Puglisi R., Sorrentino V. et al. Ryanodine receptors are expressed and functionally active in mouse spermatogenic cells and their inhibition interferes with spermatogonial differentiation // J. Cell Sci. 2004. V. 117. P. 4127–4134.
- Clarson L.H., Roberts V.H., Hamark B. et al. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in first trimester and term human placenta // J. Physiol. 2003. V. 550. P. 515–528.
- Desfrere L., Olivier P., Schwendimann L. et al. Transient inhibition of astrocytogenesis in developing mouse brain following postnatal caffeine exposure // Pediatr. Res. 2007. V. 62. P. 604–609.
- El Azzouzi B., Tsangaris G.T., Pellegrini O. et al. Cadmium induces apoptosis in a human T cell line // Toxicology. 1994. V. 88. P. 127–139.
- Fischer A.B., Skreb Y. In vitro toxicology of heavy metals using mammalian cells: an overview of collaborative research data // Arh. Hig. Rada Toksikol. 2001. V. 52. P. 333–354.
- Furuhashi I., Abe K., Sato T. et al. Thrombin-stimulated proliferation of cultured human synovial fibroblasts through proteolytic activation of proteinase-activated receptor-1 // J. Pharmacol. Sci. 2008. V. 108. P. 104–111.
- Ge C., Yu M., Petite J.N. et al. Epidermal growth factor-induced proliferation of chicken primordial germ cells: involvement of calcium/protein kinase C and NFKB1 // Biol. Reprod. 2009. V. 80. P. 528–536.
- Grier C.E., Mastro A.M. Mitogen and co-mitogen stimulation of lymphocytes inhibited by three Ca<sup>2+</sup> antagonists // J. Cell Physiol. 1985. V. 124. P. 131–136.
- Guangqin Z., Yu F., Dongmei Y., Xuemei H. et al. Contribution of spontaneous L-type Ca<sup>2+</sup> channel activation to the genesis of Ca<sup>2+</sup> sparks in resting cardiac myocytes // Sci. China C Life Sci. 2004. V. 47. P. 31–37.
- Heo J.S., Lee Y.J., Han H.J. EGF stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca<sup>2+</sup> influx and p44/42 MAPKs // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2006. V. 290. P. C123–C133.
- Isfort R.J., Cody D.B., Stuard S.B. et al. Calcium functions as a transcriptional and mitogenic repressor in Syrian hamster embryo cells: roles of intracellular pH and calcium in controlling embryonic cell differentiation and proliferation // Exp. Cell Res. 1996. V. 226. P. 363–371.
- Kim K.Y., Truman A.W., Levin D.E. Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal // Mol. Cell Biol. 2008. V. 28. P. 2579–2589.
- Koo J.S., Choi W.C., Rhee Y.H. et al. Quinoline derivative KB3-1 potentiates paclitaxel induced cytotoxicity and cycle arrest via multidrug resistance reversal in MES-SA/DX5 cancer cells // Life Sci. 2008. V. 83. P. 700–708.
- Lambert S., Carr A.M. Checkpoint responses to replication fork barriers // Biochimie. 2005. V. 87. P. 591–602.
- Lawrence J.R., Swerhone G.D., Wassenaar L.I. et al. Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities // Can. J. Microbiol. 2005. V. 51. P. 655–669.
- Lee M.Y., Lee S.H., Kim Y.H. et al. Effect of EGF on [3H]-thymidine incorporation and cell cycle regulatory proteins in primary cultured chicken hepatocytes: involvement of Ca<sup>2+</sup>/PKC and MAPKs // J. Cell Biochem. 2006. V. 99. P. 1677–1687.
- Martín H., Rodríguez-Pachón J.M. et al. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 1511–1519.

- Minke B., Selinger Z. The roles of trp and calcium in regulating photoreceptor function in *Drosophila* // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1996. V. 6. P. 459–466.
- Moll V., Weick M., Milenkovic I. et al. P2Y receptor-mediated stimulation of Müller glial DNA synthesis // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002. V. 43. P. 766–773.
- Ng L.C., Gurney A.M. Store-operated channels mediate  $\text{Ca}^{2+}$  influx and contraction in rat pulmonary artery // *Circ. Res.* 2001. V. 89. P. 923–929.
- Padar S., Bose D.D., Livesey J.C. et al. 2-Aminoethoxydiphenyl borate perturbs hormone-sensitive calcium stores and blocks store-operated calcium influx pathways independent of cytoskeletal disruption in human A549 lung cancer cells // *Biochem. Pharmacol.* 2005. V. 69. P. 1177–1186.
- Paquet J.L., Brunelle G., Donnadieu E. et al. Role of external calcium on the growth of aortic smooth muscle cells in SHR // *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 1990. V. 83. P. 1179–1182.
- Ragel B.T., Couldwell W.T., Wurster R.D. et al. Chronic suppressive therapy with calcium channel antagonists for refractory meningiomas // *Neurosurg. Focus.* 2007. V. 23. P. E10.
- Roisin M.P., Robert-Gangneux F., Creuzet C. et al. Biochemical characterization of mitogen-activated protein (MAP) kinase activity in *Toxoplasma gondii* // *Parasitol. Res.* 2000. V. 86. P. 588–598.
- Sacks R.S., Firth A.L., Remillard C.V. et al. Thrombin-mediated increases in cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$  involve different mechanisms in human pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2008. V. 295. P. L1048–L1055.
- Salnikow K., Zhitkovich A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium // *Chem. Res. Toxicol.* 2008. V. 21. P. 28–44.
- Scherbaum O., Zeuthen E. Induction of synchronous cell division in mass culture of *Tetrahymena pyriformis* // *Exp. Cell Res.* 1954. V. 6. P. 221–227.
- Singh K.P., Kumari R., Pevey C. et al. Long duration exposure to cadmium leads to increased cell survival, decreased DNA repair capacity, and genomic instability in mouse testicular Leydig cells // *Cancer Lett.* 2009. V. 279. P. 84–92.
- Vannier B., Peyton M., Boulay G. et al. Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry channel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 2060–2064.
- Wong C.K., Lai T., Holly J.M. et al. Insulin-like growth factors (IGF) I and II utilize different calcium signaling pathways in a primary human parathyroid cell culture model // *World J. Surg.* 2006. V. 30. P. 333–345.
- Wozniak K., Czechowska A., Blasiak J. Nickel(II) affects poly(ADP-ribose) polymerase-mediated DNA repair in normal and cancer cells // *Z. Naturforsch. [C].* 2006. V. 61. P. 142–148.
- Wu C., Fry P.M., Sui G., Fry C.H. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  regulation in a human prostate stromal cell culture // *Neuro-urol. Urodyn.* 2005. V. 24. P. 81–88.
- Yakisich J.S., Sandoval P.Y., Morrison T.L. et al. TIF1 activates the intra-S-phase checkpoint response in the diploid micronucleus and amitotic polyploid macronucleus of *Tetrahymena* // *Mol. Biol. Cell.* 2006. V. 17. P. 5185–5197.
- Yang H., Mergler S., Sun X. et al. TRPC4 knockdown suppresses epidermal growth factor-induced store-operated channel activation and growth in human corneal epithelial cells // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 32230–32237.
- Yeung P.K., Lam C.M., Ma Z.Y. et al. Involvement of calcium mobilization from caffeine-sensitive stores in mechanically induced cell cycle arrest in the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* // *Cell Calcium.* 2006. V. 39. P. 259–274.
- Zeuthen E. Synchronization of the *Tetrahymena* cell cycle // *Adv. Cell Biol.* 1971. V. 2. P. 111–152.

## Influence of Activator and Inhibitors of $\text{Ca}^{2+}$ Channels on Proliferative Activity in *Tetrahymena pyriformis* Infusoria

I. V. Schemarova<sup>a</sup>, G. V. Selivanova<sup>b</sup>, and T. D. Vlasova<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences pr. M. Toreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia*

<sup>b</sup> *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

**Abstract**—It was determined that change in DNA content in macronuclei occurs in the *T. pyriformis* infusoria under the influence of an activator (caffeine) and inhibitors of  $\text{Ca}^{2+}$  channels (verapamil),  $\text{NiCl}_2$ , and  $\text{CdCl}_2$ . Caffeine (10 mM) stimulates DNA synthesis. Verapamil (5  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CdCl}_2$  (125  $\mu\text{M}$ ), and  $\text{NiCl}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) decrease DNA content in macronuclei by 30 min after proliferative stimulation. By 4 h of incubation, there is, on average, 10% less DNA in macronuclei of *Tetrahymena* preprocessed with verapamil than in the control cells. The cells preprocessed with  $\text{CdCl}_2$  and  $\text{NiCl}_2$  differ from the control cells by lower DNA content almost at all studied periods, but they restore the level of nuclear DNA by 4 h. It is assumed that transmission of proliferative signals in the *T. pyriformis* has a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent character.

**Keywords:** *Tetrahymena pyriformis*, intracellular signaling, proliferation,  $\text{Ca}^{2+}$ , caffeine, verapamil,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , cell cycle.

УДК 591.156:599.742.4(470.5)

## ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РАЗМЕРНОГО ПОЛОВОГО ДИМОРФИЗМА У СОБОЛЯ В ПРИРОДЕ И НЕВОЛЕ

© 2012 г. В. Г. Монахов

Институт экологии растений и животных УрО РАН

620144 Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

E-mail: mon@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 29.03.11 г.

Окончательный вариант получен 17.05.11 г.

Исследовали межполовые различия краниометрических признаков у соболей разного пола и возраста в природных ( $n = 2338$ ) и зверосовхозной ( $n = 516$ ) популяциях. Различия между размерами черепа у природных самцов и самок, как правило, высокосignификантны ( $p < 0.001$ ). Динамика размеров хорошо коррелирует с возрастом. В клеточной популяции различия между полами в размерах черепа также статистически значимы ( $p < 0.01$ ), но корреляция размеров с возрастом отсутствует. В природных популяциях показатели ПД положительно коррелируют с возрастом, при максимуме в 9 лет и минимуме — у сеголетков. Значительное увеличение индекса ПД идет до 3 лет, далее динамика напоминает циклический процесс с повторением максимальных значений на каждый 4-й год при общем тренде к росту показателя. Наивысшие значения показателя ПД у клеточных соболей отмечаются в 3–5 лет, а минимальные — в возрастных группах 6–9 и 13–14 лет. Сеголеткам 6–10 месяцев возраста в природе свойственны тенденции к общему росту (не выраженные в интродуцированной популяции бассейна р. Вах) и к увеличению индекса ПД с возрастом, в ваховской — к его уменьшению. Удельная скорость роста черепа у самцов в 1.8 раза выше, чем у самок. Возрастная динамика размеров и векторы скоростей между полами, как правило, не согласованы. Результаты исследования согласуются с теорией Геодакяна (1991) о дихроморфизме. Различия в возрастных проявлениях полового диморфизма и постнатального роста черепа в природных и совхозной популяциях соболя обусловлены, на наш взгляд, различной направленностью отбора.

*Ключевые слова:* возрастные группы, краниометрия, половой диморфизм, промысловые выборки, совхозная популяция, *Martes*.

Половой диморфизм как частный случай полиморфизма привлекает внимание зоологов довольно давно. Феномен различия размеров у самцов и самок, в частности у млекопитающих, известен с начала накопления подробных сведений о морфологии отдельных видов.

В классе млекопитающих Mammalia половой диморфизм (ПД) в размерах — явление не всеобщее, поскольку у некоторых представителей (семейства землероек Soricidae, бобровых Castoridae, мышинных Muridae, хомяковых Scurtidae, гиеновых Hyenidae) различия между самцами и самками почти не выражены, а у некоторых китообразных (Cetacea) наоборот, самки крупнее самцов. В то же время в ряде таксономических групп Mammalia самцы по размерам ощутимо превосходят самок (отряды Pinnipedia, Carnivora).

Среди кунцеобразных (семейство Mustelidae) явление размерного полового диморфизма (преобладание самцов в размерах) имеет широкое распространение. Данной теме посвящено значительное количество исследований (Шубин, Шубин,

1975; Erlinge, 1979; Moors, 1980; Wiig, 1982; Герасимов, 1983; Dayan, Simberloff, 1994; Holmes, Powell, 1994; Abramov, Tumanov, 2003; Abramov, Puzachenko, 2005; Zalewski, 2007). Однако на примере важного в практическом отношении пушного вида — соболя *Martes zibellina* L. — таких примеров немного и практически все они сосредоточены в книжных изданиях (Тимофеев, Надеев, 1955; Гептнер и др., 1967; Монахов, Бакеев, 1981; Бакеев и др., 2003; Монахов, 2006). Журнальных статей по данному вопросу практически нет (Шубин, Шубин, 1975; Монахов, 2009). Между тем, в последние десятилетия накоплен значительный объем данных по морфологии этого вида, позволяющий отразить многие стороны его биологии. В частности, пул данных по краниометрии, который накоплен нами, охватывает практически весь ареал вида (47 популяционных группировок от Сахалина и Камчатки на востоке до Печоры на западе, от Южного Забайкалья на юге до р. Дудинка на севере. Кроме того, ведутся исследования морфологии со-

боля, разводимого специально для получения ценных шкурок в условиях звероферм.

Не так давно опубликован материал (Монахов, 2009) о географической и хронографической изменчивости размерного полового диморфизма, хронодиморфизме, соболя в западной части ареала. В данном сообщении мы хотим огласить результаты изучения возрастной изменчивости полового диморфизма соболя на примере природных популяций и зверьков, разводимых на звероферме. Этот вопрос ранее не исследовался.

В отношении возрастной динамики различий между самцами и самками предложено “онтогенетическое правило полового диморфизма”: “если по какому-либо признаку существует популяционный половой диморфизм, то в онтогенезе (с возрастом) этот признак меняется, как правило, от женской формы к мужской” (Геодакян, 1983, 1991). Автор теории объясняет ее сущность, употребляя термин “дихронизм” (дихроморфизм), понимая его как возрастное запаздывание в развитии признака у женского пола, т. е. доминирование женской формы диморфного признака в начале онтогенеза и мужской в конце. Другими словами в онтогенезе (с возрастом) половой диморфизм должен усиливаться. Проверку данного утверждения В.А. Геодакян (1983) проводил на примере антропометрических признаков.

В литературе по диким хищным млекопитающим (Carnivora) крайне мало данных о динамике размеров самцов и самок на протяжении всей жизни животных (Россолимо, Павлинов, 1974; Павлинов, 1977; Hartova et al., 2010), что напрямую связано с точным определением их возраста методом Клевезаль-Клейненберга (1967), который дает необходимый результат, однако при значительном объеме материала его применение связано с известными трудностями. В настоящее время мы имеем возможность проанализировать такие данные на примере краниометрических признаков соболя в природе и неволе, оценить межполовые различия в размерах для разных возрастных групп, т. е. возрастную динамику полового диморфизма.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Изучены значительные по объему выборки черепов соболя из региона Урала-Зауралья за 1979–2002 гг. ( $n = 2127$ , хранится в зоологическом музее ИЭРиЖ УрО РАН, Екатеринбург) и Западного Саяна, бассейн р. Кизир, 1977–1981 гг. ( $n = 211$ , хранится в ВНИИ охотничьего хозяйства и звероводства, Киров). Для сравнений привлечена выборка животных, разводимых на соболеферме Салтыковского племенного зверосовхоза Московской области за 2001–2009 гг. ( $n = 516$ , коллекция зоомузея ИЭРиЖ УрО РАН, Екатеринбург). Всего исследовано 1921 экз. сеголетков и 933 экз. зверьков возраста 1–18 лет. Возраст животных из природных выборок определяли методами В.С. Смирнова

(1960) и Г.А. Клевезаль и С.Е. Клейненберга (1967), возраст соболей зверосовхоза известен из племенных книг.

Каждый череп с помощью штангенциркуля с точностью до 0.1 мм измеряли по 18 промерам: 1) основная длина; 2) кондилобазальная длина (КБД); 3) общая длина; 4) длина мозговой части; 5) длина лицевой части; 6) длина зубного ряда верхней челюсти; 7) длина ряда коренных зубов; 8) диаметр затылочного отверстия; 9) длина слуховых барабанов; 10) ширина мозговой капсулы; 11) наибольшая ширина черепа (НШ); 12) ширина затылочных мышечков; 13) ширина хоан; 14) лицевая ширина по линии между скуловыми отверстиями; 15) ширина ряда резцов верхней челюсти; 16) ширина слуховых барабанов; 17) высота в области слуховых барабанов (наибольшая высота, НВ); 18) высота в области межглазничного сужения.

Для оценки величины полового диморфизма применяли показатель  $I_{SD}$ , предложенный Россолимо и Павлиновым (1974):  $I_{SD} = 100 (X_{\sigma} - X_{\varphi}) / X_{\varphi}$ , где:  $I_{SD}$  – величина (индекс) полового диморфизма (ИПД), выраженный в процентах;  $X_{\sigma}$  и  $X_{\varphi}$  – средние величины признаков для самцов и самок. Подобный показатель, апробированный многими исследователями (Holmes, Powell, 1994; Abramov, Tumanov, 2003; Рожнов, Абрамов, 2006), использовался нами ранее (Монахов, 2009).

Для оценки интенсивности возрастных изменений размеров черепа между двумя возрастными половыми группами применяли показатель удельной скорости роста  $c$  по Шмальгаузену (1935) для стандартных промежутков времени:  $c = (\lg v - \lg v_0) / \lg e$ ; где:  $v_0$  и  $v$  – величины признаков в начале и в конце наблюдаемого периода роста,  $e$  – основание натурального логарифма.

В работе для выявления различий и закономерностей применяли статистические возможности пакета STATISTICA 5.5 для Windows.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Вначале были высчитаны ИПД для всех животных приуральской выборки и определены величины межполовых различий. Оказалось, что эти величины не одинаковы для всех изученных признаков. При цифровой обработке данных было выявлено, что признак 8 (диаметр затылочного отверстия) варьирует в выборках хаотично. Подробное изучение показало, что это происходит по причине разрушения краев затылочного отверстия при очистке черепов после выварки. Вследствие этого данный признак исключен из анализа.

Исследованные краниометрические признаки вносят разный вклад в межполовые различия. Так, у приуральских взрослых соболей (рис. 1а;  $n = 788$ ) наивысшие значения ИПД демонстрируют не только промеры, имеющие наибольшие величины (1–5), но и характеризующие длину зубного ряда (6–7) и высоту черепа (№ 18). Минимальные

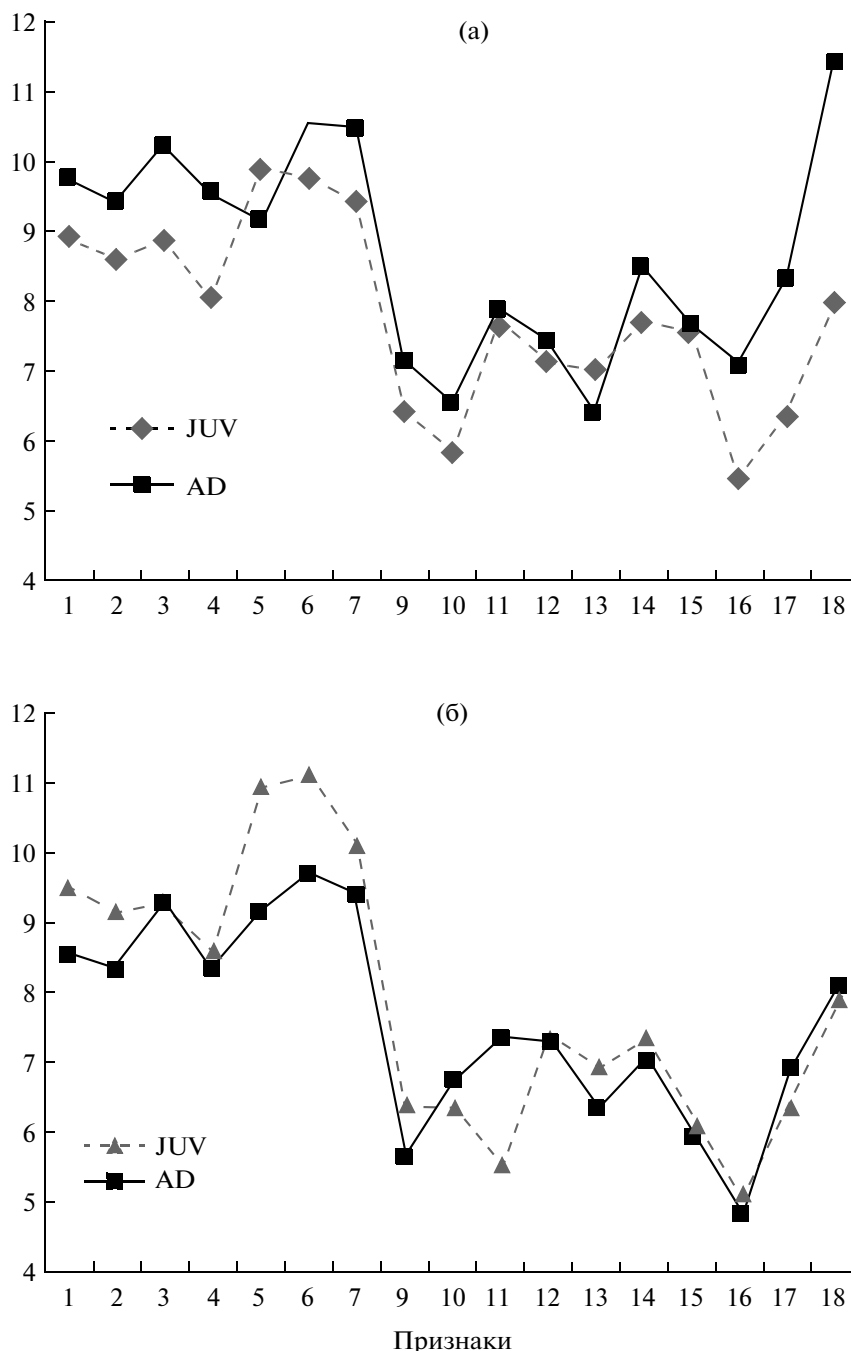


Рис. 1. Значения индекса полового диморфизма (%) у сеголетков и взрослых соболей Приуралья (а) и клеточной популяции (б).

$I_{SD}$  отмечены для признаков 13 (ширина хоан), 10 (ширина мозговой части), 16 (ширина bullae) и 9 (длина bullae). Варьирование среднего ИПД (8.67%) фиксируется в пределах от 5.34% (признак 16) до 11.49% (признак 18). Абсолютный минимум показателя 2.49% (признак 13; группа 5+), абсолютный максимум 14.98% (признак 7; группа 9+).

Наивысшие значения ИПД в совхозной популяции среди взрослых показали (рис. 16;  $n = 145$ ) те же признаки, что и в приуральской (№ 1–7, 18).

Минимальными были значения признаков 16, 9, 15 и 13. Значения остальных – ниже среднего уровня (7.60%). Варьирование среднего  $I_{SD}$  находится в пределах от 4.84% (признак 16) до 11.16% (признак 6).

Варьирование ИПД у сеголетков в Приуралье (рис. 1,  $n = 1339$ ) идет, в целом, также как среди взрослых, однако у первых средний ИПД ниже ( $I_{SD-JUV} = 7.79\%$ ). Обратим внимание, что по двум признакам 5 (длина мозговой части) и 13 (ширина



**Таблица 1.** Размеры самцов и самок приуральского аборигенного соболя и их различия

Возраст, годы	КБД, мм				ИПД %	Число зверьков ( $n = 1601$ )		
	♂	±SE	♀	±SE		♂	♀	Всего
6 мес.	83.43	0.12	76.99	0.10	7.48	334	344	678
9 мес.	83.97	0.19	77.10	0.15	8.03	143	142	285
1	84.25	0.20	77.60	0.17	8.21	111	116	227
2	84.54	0.28	77.34	0.28	8.73	57	35	92
3	85.42	0.33	77.85	0.60	9.25	28	19	47
4	84.75	0.40	78.08	0.41	7.90	27	27	54
5	84.38	0.44	77.46	0.29	8.14	23	31	54
6	85.47	0.33	77.87	0.42	9.30	33	29	62
7	84.85	0.50	77.99	0.41	8.68	14	13	27
8	85.56	0.55	77.99	0.34	8.99	14	15	29
9	86.14	0.60	77.35	0.60	10.14	12	6	18
10	85.32	0.60	77.33	0.52	8.86	6	6	12
11	85.05	0.79	78.60	0.78	8.44	6	2	8
12	87.18	1.46	78.85	0.77	9.77	4	4	8

хоан) показатель для сеголетков выше. В клеточной популяции средний ИПД у сеголетков выше (7.90%,  $n = 371$ ) и по 10 признакам из 17 их показатели превосходят значения для взрослых, при равенстве в трех случаях.

Что касается возрастных изменений размеров черепа самцов и самок, то их можно оценить по данным табл. 1. В ней представлены материалы по всем изученным приуральским (бассейны рек Лозьва, Демьянка, Юган) популяциям, за исключением ваховской, образованной байкальскими интродуцентами, размеры которых существенно меньше, чем в остальных. По представленным в таблице данным хорошо различимо увеличение размеров, в частности, КБД, с возрастом как у самцов ( $r = 0.79$ ;  $F_{1,12} = 20.54$ ;  $p = 0.00069$ ), так и у самок ( $r = 0.65$ ;  $F_{1,12} = 8.65$ ;  $p = 0.0124$ ). При этом соответствие величин КБД в возрастных группах самцов и самок оказалось довольно высоким при  $r = 0.65$  ( $F_{1,12} = 8.77$ ;  $p = 0.011$ ). По остальным признакам статистически значимые положительные корреляции размеров были отмечены ( $r = 0.56-0.91$ ;  $p = 0.038-0.0003$ ) по семи признакам. Наивысшим коэффициент корреляции был по признаку 14 (ширина между скуловыми отверстиями,  $r = 0.907$ ), а минимальным по признаку 5 (длина лицевой части,  $r = 0.558$ ). В одном случае вариация размеров (признак 18, высота в области межглазничного сужения) по возрастным группам у самцов и самок проявила статистически значимую отрицательную корреляцию  $r = -0.59$  ( $p = 0.027$ ). Остальные признаки не показали значимых взаимосвязей ( $r < 0.49$ ;  $p > 0.05$ ), т.е. динамика значений

признаков между полами, в основном, не проявляет согласованности.

Различия между размерами черепа самцов и самок высокозначимы ( $p < 0.001$ ): величины критерия  $t$  варьируют, к примеру, по КБД, в возрастных группах: 6 мес. 41.99; 9 мес. 28.72; 1+ 25.46; до 5.05 в группе 12+. По признаку 11 (НШ) значения  $t$  были: в группе 6 мес. 31.32; 9 мес. 23.24; 1+ года 19.78; до 4.47 в группе 12+ ( $p < 0.001$ ). По наибольшей высоте черепа (№ 17) различия между половыми группами также высокозначимы: значения  $t$  были 26.95; 17.7; 20.18 и 2.41 соответственно.

Переходя к возрастной динамике  $I_{SD}$  (табл. 1), надо заметить, что его связь с возрастом в природной популяции оказалась достаточно тесной и значимой ( $r = 0.60$ ;  $F_{1,12} = 6.78$ ;  $p = 0.023$ ), что можно интерпретировать, как положительный возрастной тренд величины ПД. Наивысших значений  $I_{SD}$  достигают в 9-м возрастном классе: 10.14% (табл. 1).

Обратившись к материалу по клеточной популяции (данные по возрастным классам, из-за малого количества животных в каждом из них, пришлось объединить в группы, включающие по два-пять возрастов) заметили динамику размерных показателей, отличную от наблюдавшейся в природных группировках вида. Оказалось, что увеличение размеров совхозных соболей происходит у самцов до возраста 3–5 лет, у самок – 6–9 лет, а в последующих возрастных группах идет закономерное снижение размеров черепа (табл. 2, рис. 26). Корреляции динамики размеров (КБД) с возрастом: у самцов  $r = -0.54$ , у самок  $r = -0.079$ , т.е. процесс уменьшения размеров превалирует над

**Таблица 2.** Размеры самцов и самок соболя в клеточной популяции и их различия

Возраст, годы	КБД, мм				ИПД %	Число зверьков (n = 509)		
	♂	±SE	♀	±SE		♂	♀	Всего
0	83.31	0.16	76.28	0.14	7.92	197	170	367
3–5	85.53	0.60	75.95	0.39	12.18	16	4	20
6–9	84.02	0.37	78.24	0.71	7.31	14	10	24
10–12	83.55	0.39	76.84	0.32	8.02	16	30	46
13–14	83.00	0.61	76.62	0.29	7.36	8	29	37
15–19	82.73	0.51	75.70	0.54	8.68	12	3	15

**Таблица 3.** Изменения размеров черепа у сеголетков разных популяций соболя в период с октября по февраль

Месяц года (возраст в мес.)	Самцы							Самки						
	n	КБД	±SE	НШ	±SE	НВ	±SE	n	КБД	±SE	НШ	±SE	НВ	±SE
Зап. Саян (р. Кизир) 1977–1981 N = ♂99/112♀														
10 (6)	15	78.83	0.59	36.47	0.28	31.63	0.27	25	73.73	0.34	34.83	0.25	29.83	0.18
11 (7)	27	79.05	0.41	36.64	0.16	31.61	0.25	20	74.19	0.73	35.04	0.33	29.99	0.26
12 (8)	20	79.43	0.18	36.58	0.18	31.71	0.20	10	73.21	0.49	34.32	0.21	29.53	0.20
1 (9)	32	80.07	0.33	36.59	0.13	31.38	0.15	45	73.45	0.18	34.60	0.20	29.36	0.10
2 (10)	5	80.18	0.82	36.86	0.19	31.28	0.42	12	73.49	0.53	34.61	0.27	29.61	0.26
р. Вах 1979–1989 N = ♂100/101♀														
10 (6)	10	81.81	0.55	37.67	0.22	32.07	0.21	10	75.48	0.39	34.09	0.23	30.23	0.22
11 (7)	78	81.40	0.22	36.87	0.12	32.11	0.11	83	74.93	0.19	34.09	0.10	30.06	0.08
12 (8)	3	81.95	0.04	36.33	0.40	30.87	0.31	6	74.43	0.29	33.90	0.28	30.40	0.21
1–2(9–10)	9	82.34	0.39	36.67	0.39	30.71	0.26	2	75.05	1.80	34.25	0.25	28.90	0.42
Приуралье 1979–1989 N = ♂228/259♀														
10 (6)		–	–	–	–	–	–	7	76.46	0.50	34.73	0.34	30.57	0.29
11 (7)	98	83.41	0.23	36.93	0.11	32.35	0.11	108	77.01	0.18	34.47	0.09	30.47	0.08
12 (8)	54	83.45	0.27	36.91	0.13	32.23	0.13	63	76.51	0.23	34.18	0.12	30.42	0.10
1 (9)	34	84.77	0.33	37.21	0.16	32.57	0.15	41	77.29	0.24	34.70	0.13	30.38	0.13
2 (10)	42	83.63	0.27	37.35	0.17	32.26	0.12	40	77.00	0.27	34.53	0.14	30.18	0.16
Зверосовхоз 2001–2007 N = ♂197/170♀														
10 (6)	197	83.31	0.16	36.41	0.07	32.65	0.07	170	76.28	0.14	34.49	0.07	30.71	0.07

увеличением, наблюдаемым в первые годы жизни. По данным этой же табл. 2, у клеточных соболей значение  $I_{SD}$  (12.18%) наивысшее в 3–5 лет. Причем, что совсем не характерно для диких соболей, наименьшие величины показателей межполовых различий в совхозной популяции отмечаются не у сеголетков, а в возрастных группах 6–9 и 13–14 лет ( $I_{SD} < 7.36$ ). Взаимосвязь индекса ПД с возрастом низкая отрицательная ( $r = -0.287$ ;  $F_{1,4} = 0.36$ ;  $p = 0.581$ ).

Имеющийся у нас материал позволил провести сравнения размеров черепа среди сеголетков разных сроков добычи, а значит, и возраста. В табл. 3 для примера используются только три размерных признака из восемнадцати изученных. Оказалось, что тренды увеличения размеров характерны в большей степени самцам. Самки же демонстрируют либо уменьшение, либо хаос. Мы оценили соответствие показателей размеров прибылых между половыми группами. По признаку 2, КБД, корреляция размеров самок и самцов высокая ( $r = 0.92$ ;

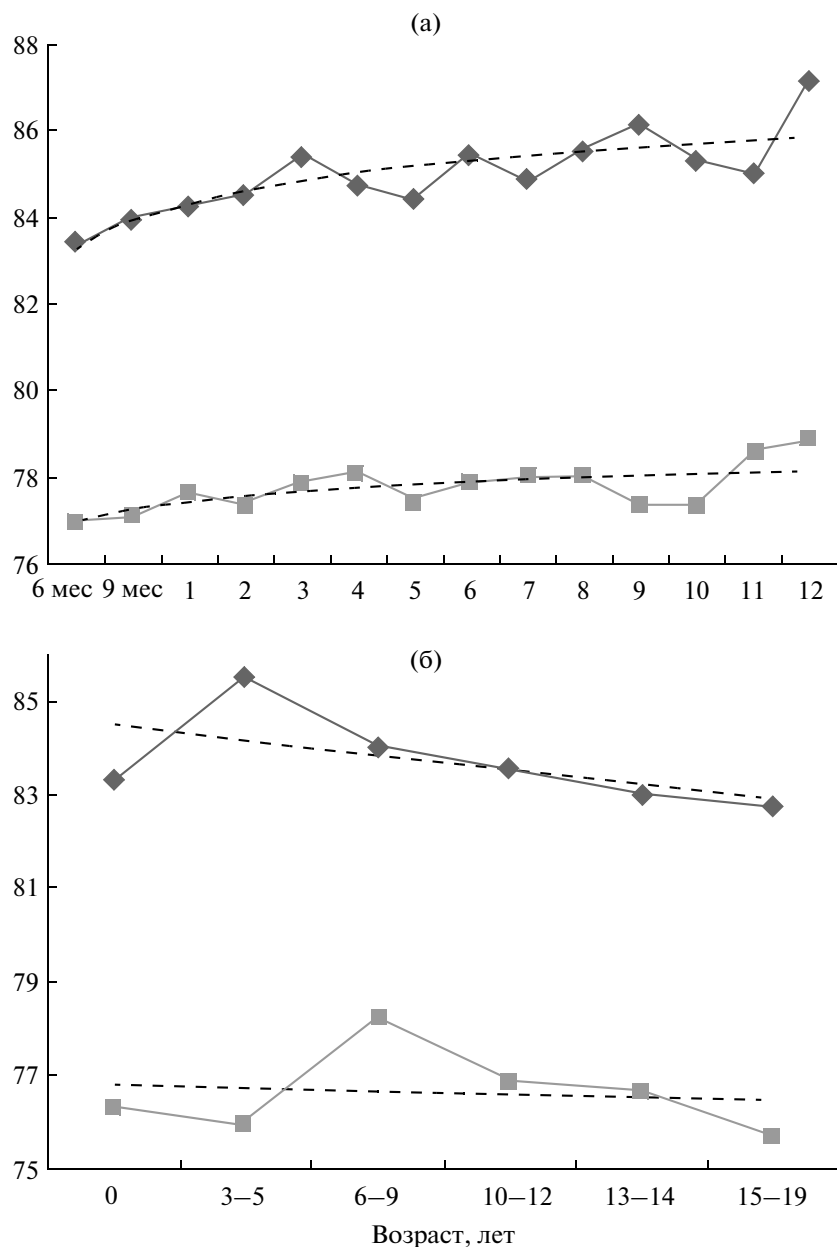


Рис. 2. Соотношение размеров черепа (КБД, мм) и возраста самцов и самок в природных (а) и клеточной (б) популяциях. Тренды обозначены прерывистыми линиями.

$R^2 = 0.86$ ;  $F_{1,12} = 64.95$ ;  $p = 0.00001$ ). По ширине черепа корреляция между полами оказалась низкой и отрицательной ( $r = -0.094$ ;  $p = 0.76$ ), что свидетельствует об отсутствии связи в возрастной динамике признака у самцов и самок. Сравнения по высоте черепа показало положительную и значимую корреляцию ( $r = 0.67$ ;  $R^2 = 0.45$ ;  $F_{1,12} = 8.85$ ;  $p = 0.0126$ ) между размерами черепа самцов и самок (табл. 3).

Если сравнить размеры одновозрастных самцов и самок прибылых из природных популяций, то самыми мелкими оказываются зверьки Зап. Саяна, самыми крупными — приуральские, а интроду-

центы Ваха имеют промежуточные показатели (табл. 3). Сеголетки в клеточной популяции (забой зверьков на товарную продукцию производится только в октябре, когда возраст прибылых равен 6 месяцам) по размерам ближе к приуральским.

После вычислений ИПД ( $I_{SD}$ ) сравнили его динамику у сеголетков в трех природных выборках. В целом выраженность показателя в них различается: средний  $I_{SD}$  выше в Приуралье (7.7%), немного ниже в бассейне Ваха (7.5%) и самый низкий (6.6%) в Западном Саяне. Это заметно и по диаграммам рис. 3. Во всех трех выборках возрастную тенденцию к увеличению показателя ПД демон-

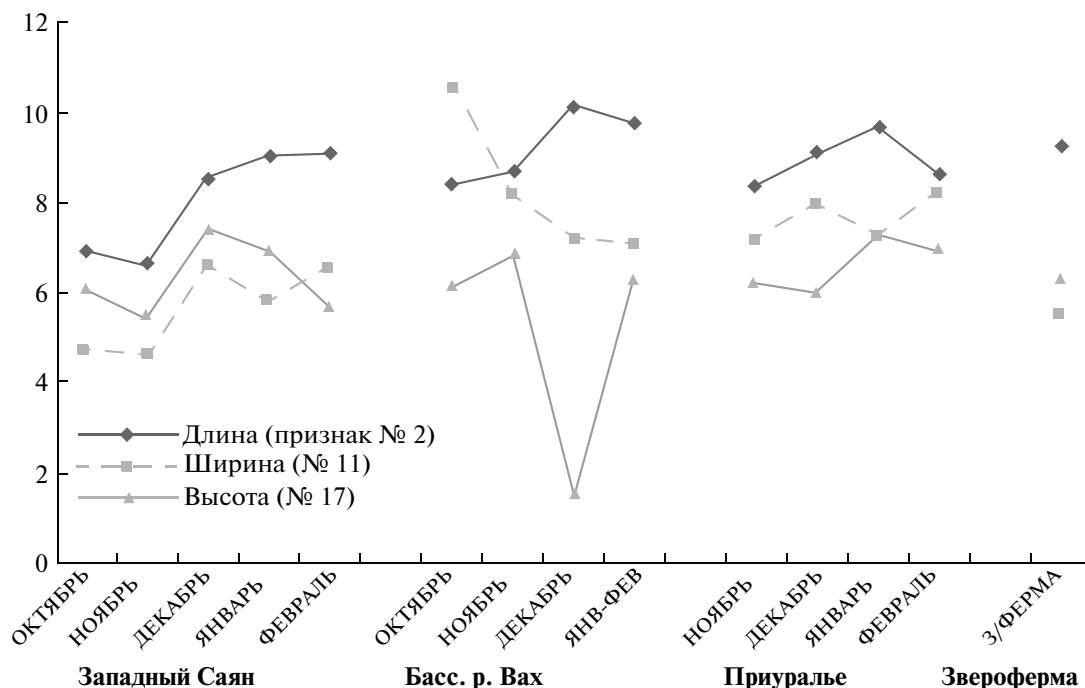


Рис. 3. Динамика индекса полового диморфизма ( $I_{SD}$ , %) по трем краниометрическим признакам у сеголетков разного срока добычи в западном Саяне, бассейне реки Вах, Приуралье, а также совхозной популяции.

стрирует признак длины (КБД, № 2) черепа. Такую же тенденцию, но только для саянской и приуральской выборки, показали ширина (НШ, № 11) и высота (НВ, № 17), но ваховские сеголетки проявили тенденцию к уменьшению  $I_{SD}$  по ширине и нечеткую — по высоте черепа.

Мы вслед за Россоломо и Павлиновым (1974), сделавшим это для лесной куницы, имеем возможность оценить возрастные изменения удельной скорости роста в природных группировках соболя. Рис. 4 отображает средние удельные скорости изменения размеров по 17 краниометрическим признакам для каждой группы возраста до 12+ лет у самцов и самок соболя, а также их разности ( $c_{\sigma} - c_{\text{♀}}$ ). Среди сеголетков от 6 до 9 месяцев удельная скорость роста значительно выше у самцов. В следующем интервале (от 9 мес. до 1 года) она резко снижается, причем у самцов значительно, а у самок снижение продолжается до 2 лет. Далее у самцов идет повышение темпов роста черепа до 3 летнего возраста, у самок же до 4 лет. В последующих возрастных интервалах в скорости роста для обоих полов фиксируются чередующиеся положительные и отрицательные тренды, совпадающие лишь в интервалах 5–6 и 7–8 (повышения), 6–7 и 8–9 лет (понижения).

Также нами были рассчитаны средние для двенадцати возрастных групп темпы изменений отдельных краниометрических признаков (рис. 5) у самцов и самок соболя Приуралья. Самцы демонстрируют положительную направленность изме-

нений (рост) по всем признакам, за исключением наибольшей высоты черепа (которая с возрастом непрерывно уменьшается), единственный признак, демонстрирующий (также и у самок) постоянно отрицательный средний тренд. Наибольшие коэффициенты роста (более 0.003) показали признаки 1, 2, 3, 4 (длин черепа и мозгового отдела), 14 (ширина между скуловыми отверстиями) и 15 (ширина ряда резцов). Низкие (но положительные) скорости изменений у самцов отмечены для 7 (длина ряда коренных), 10 (ширина мозговой капсулы) и 18 (высота в области межглазничного сужения) признаков.

У самок картина возрастных изменений признаков в значительной мере отлична от самцов (рис. 5). Для шести признаков фиксируются отрицательные тренды: по трем из них (№№ 7, 10, 18) минимальные скорости имеют также и самцы (см. выше). Признаки 9 (длина bullae) и 12 (ширина мышелков) показали самые низкие отрицательные тренды. В список признаков с наибольшими коэффициентами роста (более 0.003) у самок попадают лишь два: 5 (длина лицевого отдела) и 13 (ширина хоан).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучаемого в данной работе региона известно исследование Павлинина (1963), который нашел межполовые различия у тобольских (*M. zibellina zibellina*) соболей, равными 8.7%. В монографии Г. Монахова и Бакеева (1981) показано, что

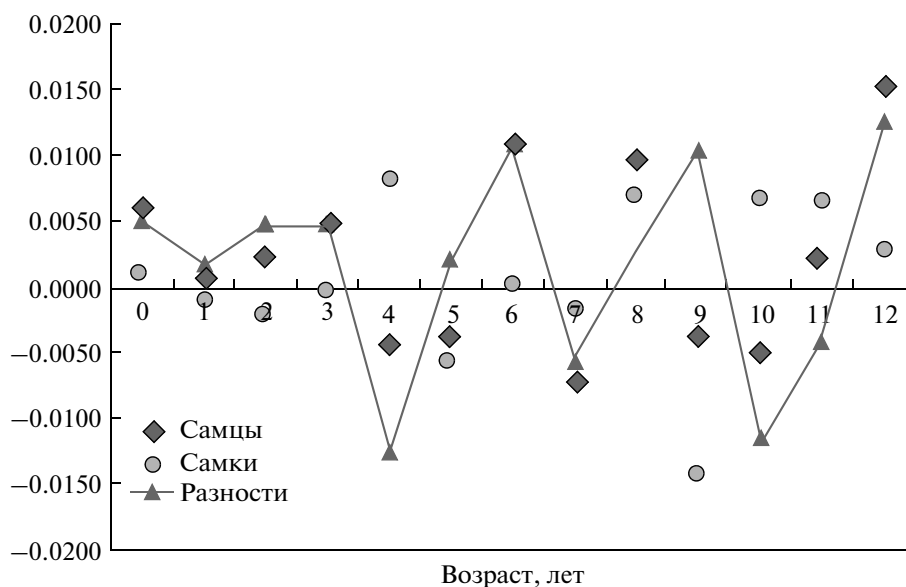


Рис. 4. Возрастные различия в удельной скорости изменения размеров черепа ( $c$ ) у самцов и самок соболя в природе. В возрастной группе 0 показаны изменения от 6 до 9 месяцев, в группе 1 – от 9 месяцев до 1 года.



Рис. 5. Средние удельные скорости ( $c$ ) изменения краниметрических признаков у самцов и самок соболя в природе.

в трех урало-приобских популяциях вида межполовые различия варьировали от 6.6 до 9.8%. Сведения о ПД в двух приуральских популяциях соболя есть также в статье Павлинова и Россолимо (1979): для Печоры межполовые различия составили 9.8%, для Свердловской области – 10.0%.

По результатам наших исследований (Монахов, 2009) межполовые различия по КБД в 10 приуральских выборках соболей варьировали от 8.58 до 10.26%, а в шести выборках лесных куниц *Martes martes* L. – от 7.64 до 9.11%. Усредненные по десяти

признакам различия  $I_{SD}$  по всем изученным выборкам равнялись соответственно 9.03% у соболя и 8.39% у куницы лесной.

Анализ полученных разными авторами данных о проявлениях ПД у соболя, позволил предположить также и многолетнюю временную (хронографическую) изменчивость ПД, которую можно назвать проявлением хронодиморфизма, а также и возрастную изменчивость феномена. Многолетняя динамика ПД была показана нами на примере ряда десятилетних выборок XX в.: большинство

хронотрендов имели возвратно-поступательную динамику (Монахов, 2009). В отношении возрастных различий в показателях ПД у соболя сведений в литературе не найдено.

Имеются сведения о размерном ПД у другого представителя рода – куницы лесной, обитающей в Приуралье в зоне трансгрессии ареалов совместно с соболем. Так, в упоминавшейся работе Павлинина (1963) различия в кондилобазальной длине у самцов и самок куниц составили 5.7% для шалинской, 7.2% – тобольской, 8.9% – башкирской и 9.7% – для челябинской популяций. В этом же источнике имеются данные для расчета ИПД по соболям тобольского подвида: басс. Сев. Сосьвы – 7.24%, Тапсуя – 9.57%, Кондо-Сосьвинского заповедника – 9.03%, Ивдельского (8.88%) и Гаринского районов Свердловской области (8.52%).

Межполовые различия размеров черепа у зверьков разного возраста изучали на примере печорских куниц Россолимо и Павлинов (1974). Они установили, что возрастная динамика ПД по КБД демонстрировала слабую тенденцию к уменьшению, по лицевой длине – уменьшение и снова рост к возрасту 2+ с дальнейшей стабилизацией. Половой диморфизм по большинству остальных признаков имел тенденцию к возрастанию до 5 лет со снижением в старших возрастных группах. Данные о различиях ИПД по кондилобазальной длине для печорских куниц представлены в работе Павлинова (1977), который обнаружил их наибольшими у сеголетков (9.41%), а у взрослых животных варьирующими от 8.03 до 8.71%.

Для сравнения с результатами Россолимо и Павлинова (1974), уточним данные по возрастной динамике показателей полового диморфизма (рис. 6) у соболя, полученные нами. В природных выборках заметен общий тренд к увеличению ПД с возрастом. Однако он не равномерен: самые высокие значения показателей ПД приходятся на группы возраста 3, 6, 9 и 12 лет. Значительное увеличение ПД идет до возраста 3 года, далее динамика напоминает циклический процесс с повторением максимальных значений на каждый 4-й год. Причем каждый последующий максимум больше предыдущего, исключая последний (рис. 6а). Эта динамика весьма сходна с возрастным трендом КБД самцов на рис. 2а. Сходные результаты получены при исследовании краниометрии и ПД лисицы обыкновенной *Vulpes vulpes* в Чехии (Hartova et al., 2010).

Зависимость ПД от возраста соболей в совхозной популяции в корне иная. К сожалению, мы не можем оценить размеры зверьков возрастов 1 и 2 года, поскольку в преднамеренный забой на товарную продукцию они не попадают и остаются на племя до выявления их репродуктивных способностей. Если по воспроизводству (или другим параметрам) они дисквалифицируются, то на забой пойдут уже в возрасте 3 и более лет. В результате, к

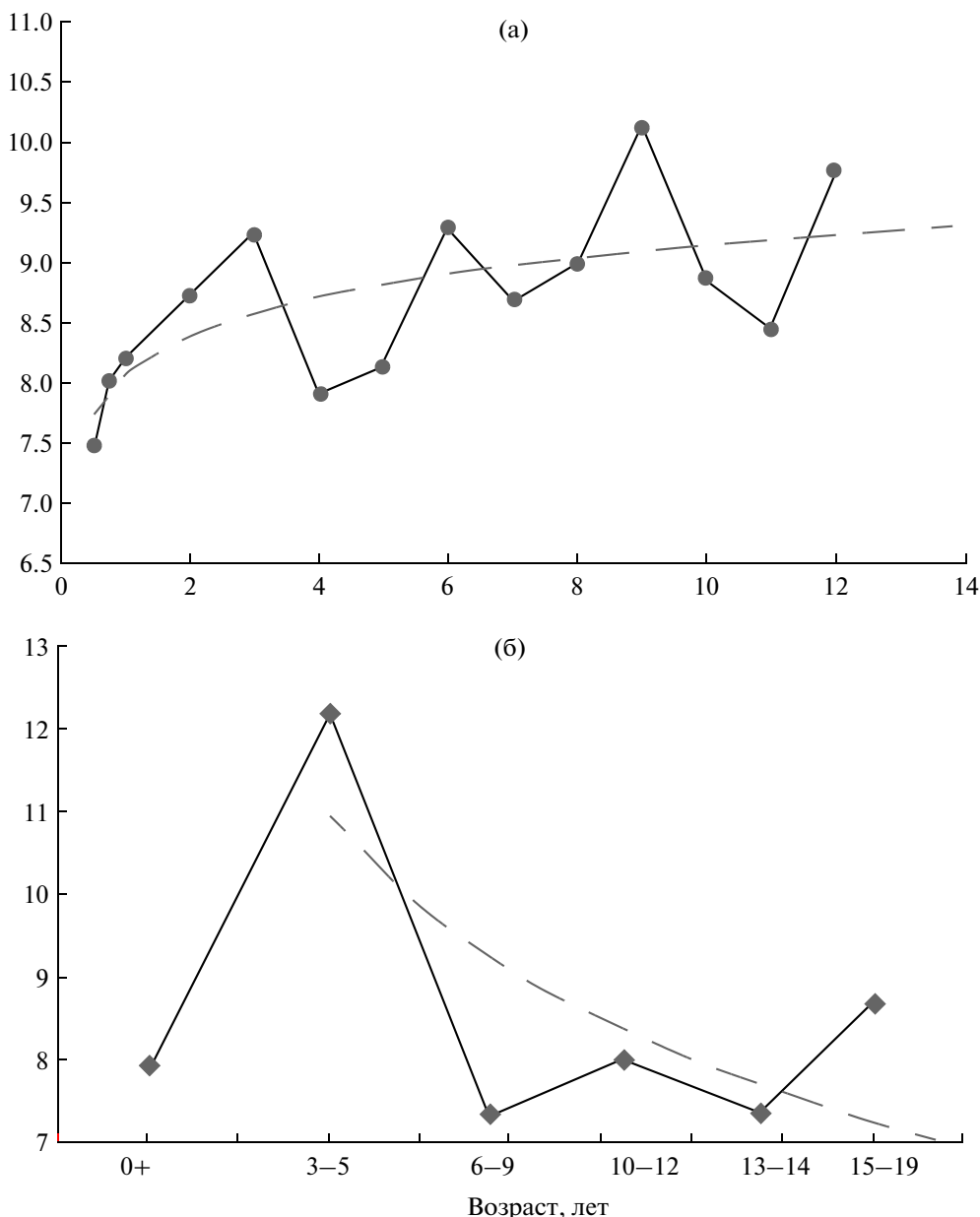
трем годам зверьки демонстрируют увеличение ПД, но оно сменяется уменьшением до уровня, даже более низкого, чем у сеголетков. В последующих возрастных группах показатели ПД колеблются в пределах 1.3% (рис. 6б) при общем тренде уменьшения ИПД.

Отличия в динамике размерного ПД у куницы (по данным Россолимо и Павлинова, 1974) и соболя в природе существенны: у куницы  $I_{SD}$  по КБД резко снижается к 1 году и выходит на “плато”, у соболя же имеет общую тенденцию роста вплоть до возраста 12 лет, со снижениями в группах возраста 4, 7 и 11 лет.

В большинстве случаев направленность изменений размеров между полами рассогласована (см. рис. 5), что видно также по результатам оценки корреляции размеров самцов и самок по отдельным признакам (см. выше). Для ряда видов *Maternalia* исследователи отмечали 3, 4 и более фаз постнатального роста (Мина, Клевезаль, 1976). У самцов и самок соболя также видны подобные фазы, но, как указывали Мина и Клевезаль (1976), такие проявления “фазовости” в росте биологически трудно интерпретируемы. Возможно, на наш взгляд, они связаны с принадлежностью соболей к поколениям животных, родившихся на разных фазах популяционных циклов.

Сравнивая возрастную динамику размеров черепа у куницы (по данным Россолимо и Павлинова, 1974) и соболя, отметим, что кунице свойствен высокий темп роста сеголетков (вдвое выше у самок), который у самцов снижается в 2 раза в интервале 1–5 лет, а у самок в 6 раз к 4 годам, далее у обоих полов наблюдаются тренды роста со скоростями 0.002–0.013. У соболя также самый высокий прирост у сеголетков, но от 6 до 9 месяцев, причем у самцов в 5 раз выше, чем у самок (рис. 4). В последующие интервалы у самцов он продолжается со скоростями от 0.0007 (1 год) до 0.0044 (3 года), чтобы смениться уменьшением в 4 и 5 лет (–0.0043; –0.0036). У самок же в группах 1–3 и 5 лет наблюдается деградация размеров, прерываемая в 4 года значительным ростом (0.0081). В последующие возрастные интервалы до 12+ лет у соболей обоего пола наблюдается смена положительных и отрицательных трендов, иногда значительных ( $c = \pm 0.0100$ –0.0150, рис. 4). Средние удельные скорости роста у самцов 0.0009; у самок 0.0005.

По нашим данным, момент окончания роста черепа у соболя нами не установлен, увеличение КБД происходит вплоть до последней, 12-й возрастной группы (табл. 1, рис. 1). Возможно, это происходит и в возрастных группах старше 13 лет. Но поскольку у нас данная группа составная, т.е. включает зверьков нескольких возрастов (8 самцов 12–17 лет, 9 самок 12–18 лет), то достоверно об этом говорить нельзя: нужно иметь репрезентативное количество зверьков в возрастных классах по-



**Рис. 6.** Возрастная динамика показателя полового диморфизма  $I_{SD}$  (%) соболя в природных (а) и совхозной (б) популяциях. На графике (а) в интервале 0–1 указаны значения точек для групп возраста 6 и 10 месяцев и 1+ лет. Тренды обозначены прерывистыми линиями.

сле 12-го, чего достичь трудно — их в популяциях крайне мало.

Для соболя, как хорошо видно по рис. 6, проявление ПД отмечается уже с 6-месячного возраста, хотя Мина и Клевезаль (1976) указывают на отсутствие либо слабую выраженность его на более ранних стадиях постнатального онтогенеза, что также можно было бы предположить из теоретических положений Геодакяна (1991) о дихронизме. По комплексу из 17 краниометрических признаков самцы Приуралья превосходят самок на 8.71%. С 6 месяцев до престарелого возраста межполо-

вые различия ярко выражены, однако, им присуща возрастная динамика (от  $-1.23$  до  $2.66\%$ ), которая между полами во времени практически не согласована.

Таким образом, исследовав межполовые различия краниометрических признаков у соболя, мы можем заключить следующее.

1. Превосходство в размерах черепа самцов над самками отмечено по признакам длины, имеющим наибольшие величины (№№ 1–7 и в высоте черепа в области межглазничного сужения. Мини-

мальные значения показали признаки 9, 16 (длина и ширина bullae) и 13 (ширина хоан).

2. Различия между размерами черепа у природных самцов и самок, как правило, высокосignификантны ( $p < 0.001$ ). Динамика размеров (по КБД) хорошо коррелирует с возрастом. В совхозной популяции межполовые различия в размерах черепа также статистически значимы ( $p < 0.01$ ), однако корреляция размеров с возрастом у них отрицательная:  $r_{\sigma} = -0.54$ ;  $r_{\text{♀}} = -0.079$  ( $p > 0.05$ ). Размеры клеточных самцов увеличиваются до возраста 3–5 лет, а самок до 6–9 лет, далее идет снижение размеров.

3. Для природной популяции характерна положительная связь показателей ПД с возрастом, наивысшие их значения регистрируются в 9-м возрастном классе, а минимальные — у сеголетков. Значительное увеличение ПД идет до возраста 3 года, далее динамика напоминает циклический процесс с повторением максимальных значений на каждый 4-й год при общем тренде к росту показателя. Положение В.А. Геодакяна (1991) о том, что с возрастом межполовые различия должны усиливаться, подтверждается на примере природных популяций соболя. Наоборот, в совхозном стаде связь ПД с возрастом отсутствует. Наивысшие значения  $I_{SD}$  у клеточных соболей отмечаются в 3–5 лет, а минимальные — в возрастных группах 6–9 и 13–14 лет.

4. Сеголеткам 6–10 месяцев возраста в природе свойственна общая тенденция к росту, однако практически не выраженная в интродуцированной популяции бассейна р. Вах. В саянской и приуральской выборках у сеголетков отмечается четкая тенденция к увеличению ИПД с возрастом, а в ваховской — тренд к уменьшению.

5. Средняя удельная скорость роста черепа у сеголетков 6–9 месяцев значительно выше у самцов. Она резко снижается в следующем интервале (9 мес. — 1+ лет), но увеличивается к 3 летнему возрасту. У самок в группах 1–3 года скорости отрицательные, но в 4 года сменяются увеличением темпа. В дальнейшем скорости роста для обоих полов испытывают положительные и отрицательные тренды, меняющиеся у самок через год, у самцов с периодичностью 2–4 года. Средняя удельная скорость роста у самцов 0.0009; у самок 0.0005. В большинстве случаев направленность изменений размеров самцов и самок не согласована.

6. Практически по всем признакам (за исключением наибольшей высоты, которая с возрастом непрерывно уменьшается) у самцов удельные скорости изменений черепа положительны. Наибольшие коэффициенты роста (более 0.003) у них фиксируются для длин черепа и мозгового отдела, ширине между скуловыми отверстиями и ширине ряда резцов (№№ 1–4, 14, 15). У самок наивысшие темпы отмечены для трех признаков: длины лицевого отдела, ширины хоан и ширины между скуловыми отверстиями (№№ 5, 13, 14). У них отрицательные скорости роста получены по шести при-

знакам: оба признака высоты показали самые низкие значения,  $< -0.002$ ; выше этого порога (но отрицательными) были темпы изменений у признаков: длина коренных, длина bullae, ширина мозговой части и ширина мышечков.

7. Различия в возрастных проявлениях постнатального роста черепа и полового диморфизма в природных и совхозной популяциях соболя обусловлены, на наш взгляд, различной направленностью отбора. В природных популяциях Приуралья естественный отбор выступает, в аборигенных группировках, как стабилизирующий, а в интродуцированной — как движущий, благодаря чему в ней сохраняются мелкие (по сравнению с обскими аборигенами) размеры прибайкальских переселенцев-основателей. В совхозном стаде человек поддерживает особую структуру производственного поголовья (на одного самца приходится 4–5 самок, в природе 1 : 1). При этом формирование его сочетается с отбором на плодовитость и темный мех.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана Президиумом РАН, проект 12-П-45-2002. Автор выражает благодарность за помощь в работе с коллекциями А.А. Сеницыну, Ю.М. Лисенкову (Киров), М.Н. Ранюк (Екатеринбург).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бакеев Н.Н., Монахов Г.И., Сеницын А.А. Соболя. Вятка (Киров): ВНИИОЗ, 2003. 336 с.
- Геодакян В.А. Онтогенетическое правило полового диморфизма // Доклады РАН. 1983. Т. 269. № 2. С. 477–481.
- Геодакян В.А. Эволюционная теория пола // Природа. 1991. № 8. С. 60–69.
- Гептнер В.Г., Наумов Н.П., Юргенсон П.Б. и др. Млекопитающие Советского Союза. Т. 2. Ч. 1. М.: Высш. шк., 1967. 1004 с.
- Герасимов С. Видово специфични особенности и полов диморфизъм на размерите черепните признаци при *Martes martes* и *Martes foina* от България // Acta zoologica bulgarica. 1983. № 22. С. 9–25.
- Клевезаль Г.А., Клейнберг С.С. Определение возраста млекопитающих по слоистым структурам зубов и кости. М.: Наука, 1967. 144 с.
- Мина М.В., Клевезаль Г.А. Рост животных. М.: Наука, 1976. 291 с.
- Монахов В.Г. Динамика размерной и фенетической структуры соболя в ареале. Екатеринбург: НИСО УрО РАН, Банк культурной информации, 2006. 202 с.
- Монахов В.Г. Изменчив ли половой диморфизм? Факты по приуральским видам рода *Martes* // Изв. РАН. Сер. биол. 2009. № 1. С. 55–63.
- Монахов Г.И., Бакеев Н.Н. Соболя. М.: Лесная промышленность, 1981. 240 с.
- Павлинин В.Н. Тобольский соболя. Свердловск: УФ АН СССР, 1963. 112 с.



- Павлинов И.Я. Возрастные изменения черепа лесной куницы в позднем постнатальном периоде развития // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1977. Т. 82. Вып. 5. С. 33–50.
- Павлинов И.Я., Россолимо О.Л. Географическая изменчивость и внутривидовая систематика соболя (*Martes zibellina* L.) на территории СССР // Млекопитающие: Исслед. по фауне Сов. Союза. М.: МГУ, 1979. С. 241–256.
- Рожнов В.В., Абрамов А.В. Половой диморфизм перевязки *Vormela peregusna* (Carnivora, Mustelidae) // Изв. РАН. Сер. биол. 2006. № 2. С. 183–187.
- Россолимо О.Л., Павлинов И.Я. Половые различия в развитии, размерах и пропорциях черепа лесной куницы *Martes martes* (Mammalia, Mustelidae) // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1974. Т. 79. Вып. 6. С. 23–35.
- Смирнов В.С. Определение возраста и возрастные соотношения у млекопитающих на примере белки, ондатры и пяти видов хищников // Тр. Ин-т биологии. УФ АН СССР. 1960. Вып. 14. С. 97–112.
- Тимофеев В.В., Надеев В.Н. Соболя. М.: Заготиздат, 1955. 404 с.
- Шубин И.Г., Шубин Н.Г. Половой диморфизм и его особенности у куньих // Журн. общ. биологии. 1975. Т. 36. № 2. С. 283–290.
- Abramov V.A., Puzachenko A.Yu. Sexual dimorphism of craniological characters in Eurasian badger, *Meles* spp. (Carnivora, Mustelidae) // Zool. Anzeiger. 2005. V. 8. № 2. P. 365–402.
- Abramov V.A., Tumanov I.L. Sexual dimorphism in the skull of the European mink *Mustela lutreola* from NW part of Russia // Acta Theriol. 2003. V. 48. № 2. P. 239–246.
- Dayan T., Simberloff D. Character displacement, sexual dimorphism and morphological variation among British and Irish mustelids // Ecology. 1994. V. 75. P. 1063–1073.
- Erlinge S. Adaptive significance of sexual dimorphism in weasel // Oikos. 1979. V. 33. P. 233–245.
- Hartova-Nentvichova M., Andera M., Hart V. Sexual dimorphism of cranial measurements in the red fox *Vulpes vulpes* (Canidae, Carnivora) from the Czech Republic // Folia Zool. 2010. V. 59 (4). P. 285–294.
- Holmes T., Powell R.A. Morphology, ecology, and the evolution of sexual dimorphism in North American *Martes* // Martens, sables and fishers: biology and conservation. Eds. Buskirk S.W., Harestad A.S., Raphael M.G., Powell R.F. / N.-Y.: Cornell University Press, 1994. P. 72–84.
- Moors P.J. Sexual dimorphism in body size of mustelids (Carnivora): the roles of food habits and breeding systems // Oikos. 1980. V. 34. P. 147–158.
- Wieg O. Sexual dimorphism in the skull of the feral american mink (*Mustela vison* Schreber) // Zoologica Scripta. 1982. V. 11. № 4. P. 315–316.
- Zalewski A. Does size dimorphism reduce competition between sexes? The diet of male and female pine martens at local and wider geographical scales // Acta Theriol. 2007. V. 52. № 3. P. 237–250.

## Age Changes in the Sexual Size Dimorphism in Sables in Nature and Captivity

V. G. Monakhov

*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620144 Russia*

*e-mail: mon@ipae.uran.ru*

**Abstract**—Inter-sexual differences in craniometric parameters were studied in sables of varying sex and age in natural ( $n = 2338$ ) and farm ( $n = 516$ ) populations. In nature, the differences between the skull size in males and females are, as a rule, high ( $p < 0.001$ ) and the size dynamics correlate well with age. In the cell population, the difference in the skull size between the sexes is statistically significant ( $p < 0.01$ ), but the correlation of sizes with age is absent. In natural populations, parameters of sexual dimorphism (SD) correlate positively with age, with a maximum correlation found in the animals aged nine and a minimum found in yearlings. The index of sexual dimorphism grows considerably until three years of age, after which the dynamics resemble a cyclical process with a repetition of maximum values each fourth year with a general trend of growth in the parameter. The highest values of SD in cell sables are registered at 3–5 years of age, while the minimum ones are noted in the age groups of 6–9 and 13–14 years of age. In nature, yearlings aged 6–10 months are characterized by a tendency to general growth (which is not manifested in the introduced population from the basin of the Vakh River) and increase in the SD index with age. The Vakh population is characterized by a decrease in the SD index. The specific rate of skull growth in males is 1.8-fold higher than in females. The age dynamics of the sizes and the vectors of rates between the sexes are not in accordance, as a rule. The results of our study correspond to the theory by Geodakyan (1991) about dichromorphism. In our opinion, the differences in age manifestations of sexual dimorphism and postnatal skull growth in natural and farm sable populations are determined by the different directions of selection.

**Keywords:** age groups, craniometry, sexual dimorphism, commercial samplings, farm population, *Martes*.

УДК 57.017.642:599.322/324

## РАННЯЯ ЭМБРИОНАЛЬНАЯ СМЕРТНОСТЬ У ВОДЯНОЙ ПОЛЕВКИ (*Arvicola terrestris* L.)

© 2012 г. Г. К. Исакова, Г. Г. Назарова\*, В. И. Евсиков\*

Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090 Новосибирск, проспект Лаврентьева, д. 10  
E-mail: isakova@math.nsc.ru

\*Институт систематики и экологии животных СО РАН  
630091 Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 11  
E-mail: galinanazarova@mail.ru

Поступила в редакцию 11.01.11 г.  
Окончательный вариант получен 24.01.12 г.

Проведено морфологическое изучение сорока восьми 3–4-дневных зародышей от восьми самок водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.). Полученные данные показали, что ранние эмбриональные потери у водяной полевки могут составлять 30–35%, а основной причиной этих потерь являются аномалии оогенеза.

*Ключевые слова:* водяная полевка *Arvicola terrestris*, ранняя эмбриональная смертность.

Эмбриональная смертность у млекопитающих, включая человека, составляет не менее 50%, причем основная доля эмбриональных потерь приходится на ранний доимплантационный период (Brambell, 1948; Wilson, 1980; Edmonds et al., 1982; Wasser, Barash, 1983). Спектр нарушений раннего развития отличается у разных видов животных. В матке мыши *Mus musculus* через 3.5 дней после спаривания встречались погибшие яйцеклетки и остановка дробления зародыша (Титенко, 1977). Среди 6–7-дневных зародышей норки *Mustela vison* находились погибшие и неоплодотворенные яйцеклетки и резорбирующиеся зародыши (Беляев и др., 1981). У соболя *Martes zibellina* один из восьми диапаузных зародышей был на стадии двух бластомеров, в то время как остальные содержали ~500–1000 клеток (Исакова, 2004). При изучении раннего эмбрионального развития серебристо-черной лисицы *Vulpes vulpes* (Беляев и др., 1986) наблюдались неоплодотворенные яйцеклетки и остановка дробления зародышей.

Водяная полевка (*Arvicola terrestris* L.) обитает на большей части Евразии. Благодаря способности адаптироваться к совершенно разным условиям внешней среды, а также наличию полиморфизма по окраске шерстного покрова этот вид широко используется в эколого-генетических (Евсиков, Мошкин, 1994; Евсиков и др., 1997) и генетико-физиологических (Бажан, 2000) исследованиях. Кроме того, в природе встречаются особи водяной полевки с трисомией по самой малой аутосоме, что похоже на трисомию у людей с синдромом Дауна.

Это значит, что *Arvicola terrestris* может быть ценным лабораторным животным для выяснения механизмов возникновения этого типа хромосомной патологии у человека (Fredga, 1968). Еще одной особенностью водяной полевки является высокая частота спонтанного прерывания беременности в периимплантационном периоде. В природной популяции в разные фазы популяционного цикла доля самок с резорбцией всех имплантирующихся эмбрионов варьировала от 8.6% на пике ее численности до 33.5% на спаде (Евсиков и др., 1999). У самок, разводимых в лаборатории, это свойство физиологии репродукции сохраняется (Vazhan et al., 1999; Назарова, Евсиков, 2010). Поэтому водяная полевка может быть также полезным лабораторным животным для решения проблем медицины репродукции. Таким образом, водяная полевка заслуживает всестороннего изучения, и в особенности – ее эмбрионального развития. Документация хронологии событий эмбриогенеза разных видов животных необходима также для оценки тератогенного воздействия факторов внешней среды (Evans, Sack, 1973).

В природе период размножения водяной полевки длится с марта по август, число щенков в помете может быть от 1 до 10 (в среднем – 4.2), а продолжительность жизни не превышает двух лет (Пантелеев, 1968). Введение водяной полевки в лабораторное разведение позволило установить, что продолжительность ее беременности составляет 20–22 дня, причем сезон размножения в неволе не изменялся, а продолжительность жизни составляет

Вес тела и половых органов матери и состояние эмбриогенеза у водяной полевки в интервале времени от 3 до 4 дней после спаривания

Номер самки	Вес			Число				Диаметр развивающихся эмбрионов, мм
	тела самки, г	рогов матки (пара), мг	яичников (пара), мг	желтых тел	эмбрионов			
					всего	развивающихся	резорбированных	
1 (358)*	159.0	290	20	7	1	1	0	0.15
2 (383)	134.0	280	14	5	5	5	0	0.15
3 (233)	111.2	143	18	6	5	2	3	0.10
4 (402)	136.5	240	21	8	8	7	1	0.1–0.125
5 (338)	108.6	190	11	5	4	3	1	0.125
6 (313)	138.7	230	17	6	6	5	1	0.1–0.125
7 (365)	137.0	200	23	5	5	5	0	0.1–0.12
8 (435)	136.4	226	30	6	6	2	2	0.125
M ± SE	132.5 ± 6.6	226.0 ± 17.5	19.2 ± 2.0	6.0 ± 0.4	5.0 ± 0.7	4.0 ± 0.7	1.0 ± 0.4	0.12 ± 0.07

\* В скобках обозначен возраст самки, дни.

2.5 года (Blake, 1982; Наследова и др., 1984; Бажан, 2000; Weigl, 2005). Как и у других грызунов с сезонным ритмом размножения, наступление половой зрелости у водяной полевки в основном определяется не ее возрастом, а сезоном года. Щенки, родившиеся в марте–апреле, уже в мае–июне могут спариваться и дважды в течение этого же сезона дать потомство. Щенки же, родившиеся во второй половине лета, становятся половозрелыми на следующий год и могут принести до 5 пометов за данный сезон. Кроме того, половое созревание у водяных полевок зависит от физического состояния матери во время беременности (Назарова, Евсиков, 2007).

У самок, выловленных из природной популяции, доимплантационная смертность, оцениваемая по разнице между числом желтых тел беременности и числом мест имплантации, в среднем была 3.6%, а постимплантационные потери (доля эмбрионов, находившихся в состоянии резорбции, по отношению к числу мест имплантации) – 3.2% (Евсиков и др., 1999). Что касается раннего эмбрионального развития и ранней эмбриональной смертности у водяной полевки, то таких данных пока нет. В данном сообщении представлены полученные нами предварительные данные о развитии и смертности зародышей в раннем эмбриональном периоде у водяной полевки лабораторного разведения.

Колония водяных полевок *Arvicola terrestris*, поддерживаемая при институте систематики и экологии животных (Новосибирск), была основана в 1984 г. Первые выводки были получены от беременных самок, отловленных в подтаежной зоне Западной Сибири (Новосибирская область). Животные содержались индивидуально в металличе-

ских клетках 30 × 25 × 50 см при свободном доступе к воде и корму (вареное зерно, морковь, проростки пшеницы, сено) и при естественном фотопериоде. В период размножения клетки соединяли с помощью трубки-перехода диаметром 5 см и длиной 7 см. Коэффициент родства брачных партнеров не превышал 0.125. У самок от 10 до 12 ч ежедневно брали вагинальные мазки. День обнаружения сперматозоидов считался как 0 день беременности. При данной использованной системе разведения погрешность в определении возраста эмбрионов могла быть от нескольких минут до 24 часов.

Всего было исследовано 8 беременных самок в возрасте от 8 до 15 мес, все вступили в спаривание с самцами в апреле–мае. Через 72 часа после обнаружения сперматозоидов, что предполагает срок беременности от 3 до 4 суток, самку умерщвляли путем смещения шейных позвонков, вынимали и взвешивали матку и яичники. В яичниках подсчитывали число желтых тел, указывающее число овулировавших яйцеклеток. Каждый рог матки промывали физиологическим раствором под контролем микроскопа, измеряли диаметр зародышей, определяли число погибших и развивающихся эмбрионов и стадию развития развивающихся эмбрионов. Наличие полости, разделяющей эмбриобласт и трофобласт, рассматривалось как признак перехода от стадии морулы к стадии бластоцисты. Один малый эмбрион и три эмбриона среднего размера были зафиксированы в охлажденной смеси метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Затем их окрашивали 2%-ным ацетоуксусным орсеином, приготавливали тотальные давленные препараты и подсчитывали число клеток в зародыше.

В таблице представлены данные о возрасте и весе тела каждой самки, а также морфологические

данные о состоянии их репродуктивной системы и эмбриогенеза. Очевидно, что по данным столь малой выборки нельзя судить о закономерностях функционирования репродуктивной системы животного. Тем не менее, следует отметить, что самка 3, самая молодая в данной группе, имела наименьший вес тела и матки, наименьший размер эмбрионов и наиболее высокую эмбриональную смертность по сравнению с остальными.

Размер зародышей варьировал от 0.1 до 0.125 мм в диаметре. Эмбрионы, выглядевшие здоровыми, находились на стадии поздней морулы или бластоцисты. Число клеток, подсчитанное в четырех из них, было 16, 48, 54 и 72. Приблизительно такие же размеры, число клеток и стадию развития имели 3.5-дневные эмбрионы лабораторной мыши (McLaren, Bowman, 1973; Дыбан и др., 1975; Титенко, 1977). Интересно отметить, что одноклеточный эмбрион японской луговой полевки *Microtus montebelli* значительно меньше в диаметре по сравнению с одноклеточными эмбрионами других млекопитающих (Makayama et al., 1994). Этот обнаруженный факт указывает на то, что разноморфное в тайминге эмбриогенеза и в морфологии эмбрионов может проявляться на самых ранних стадиях развития и определяться таксономической принадлежностью животного.

20% вымытых зародышей были в состоянии резорбции. Они были правильной круглой формы, значительно меньшего размера по сравнению с развивающимися эмбрионами-сибсами, с тонкой прозрачной оболочкой и бесструктурным неокрашивающимся содержимым. Вполне вероятно, что это были овулировавшие аномальные яйцеклетки. Других нарушений раннего развития эмбрионов (фрагментация бластомеров, неоплодотворенные яйцеклетки, остановка дробления) не встречалось.

Всего у 8 исследованных самок овулировало 48 яйцеклеток. Из них 32 (~67%) выглядели успешно развивающимися зародышами. Остальные ~17% яиц не были обнаружены в матке. Это может означать, что они погибли в яйцевыводке или же были нежизнеспособны уже в фолликуле яичника, хотя были вовлечены в процесс овуляции. Овуляция нежизнеспособных яиц наблюдалась у мыши (McLaren, Bowman, 1973) и норки (Беляев и др., 1981), причем увеличение ранней эмбриональной смертности, вызванное мутацией по окраске меха у норок, происходит как раз за счет овуляции аномальных яйцеклеток (Беляев и др., 1981). То же самое мы наблюдали у лисиц, селекционированных на ручной тип поведения (неопубликованные данные). Резорбция в матке по отношению к числу желтых тел составила 16.7%, а общие эмбриональные потери на данной стадии — 33.4%.

Таким образом, результаты данной работы предполагают сходство в хронологии событий ран-

него эмбриогенеза у водяной полевки и мыши. Можно полагать также, что ранние эмбриональные потери у водяной полевки составляют 30–35%, а основным причинным фактором этих потерь являются аномалии оогенеза.

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты №№ 09-04-01712 и 11-04-00277-а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бажан Н.М. Физиологические механизмы поддержания изменчивости по гену агути в популяциях водяной полевки (*Arvicola terrestris*). Дисс. ... докт. биол. наук. Новосибирск: ИГиГ СО РАН, 2000. 282 с.
- Беляев Д.К., Исакова Г.К., Назарова Г.Г. Влияние генотипа на развитие норок в раннем эмбриональном периоде // Докл. АН СССР. 1981. Т. 260. № 5. С. 1251–1253.
- Беляев Д.К., Исакова Г.К., Трут Л.Н. Раннее эмбриональное развитие серебристо-черных лисиц в условиях domestikации // Журн. общ. биол. 1986. Т. 47. № 4. С. 450–452.
- Дыбан А.П., Пучков В.Ф., Баранов В.С., Самошкина Н.А., Чеботарь Н.А. Лабораторные млекопитающие // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 505–566.
- Евсиков В.И., Мошкин М.П. Динамика и гомеостаз природных популяций животных // Сиб. экол. журн. 1994. Т. 1. № 4. С. 331–346.
- Евсиков В.И., Назарова Г.Г., Музыка В.Ю. Физическое состояние и репродуктивные характеристики самок водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.) // Экология. 2008. № 6. С. 436–436.
- Евсиков В.И., Назарова Г.Г., Рогов В.Г. Генетико-экологический мониторинг циклирующей популяции водяной полевки (*Arvicola terrestris*) на юге Западной Сибири // Генетика. 1997. Т. 33. № 8. С. 1133–1143.
- Евсиков В.И., Назарова Г.Г., Рогов В.Г. Популяционная экология водяной полевки (*Arvicola terrestris* L.) в Западной Сибири. Сообщение I. Репродуктивная способность самок, полиморфных по окраске шерстного покрова, на разных фазах динамики численности популяции // Сиб. экол. журн. 1999. № 1. С. 59–68.
- Исакова Г.К. Об активности эмбрионального генома соболя на стадии задержанной имплантации // Докл. РАН. 2004. Т. 397. № 1. С. 128–130.
- Наследова Н.И., Плотникова Н.С., Иванова Л.Н. Размножение водяных полевок (*Arvicola terrestris*) в контролируемых условиях // Зоол. журн. 1984. Т. 58. Вып. 5. С. 745–748.
- Назарова Г.Г., Евсиков В.И. Наступление половозрелости у водяных полевок зависит от физического состояния матери во время беременности // Докл. РАН. 2007. Т. 412. № 4. С. 568–570.

- Назарова Г.Г., Евсиков В.И. Скорость роста, репродуктивная способность и выживаемость в условиях вивария водных полевок, изъятых из природной популяции в разные фазы цикла численности // Экология. 2010. № 4. С. 287–291.
- Пантелеев П.А. Популяционная экология водяной полевки. М.: Наука, 1968. 251 с.
- Титенко Н.В. Доимплантационное развитие эмбрионов мышей при гомо- и гетерогенной беременности // Онтогенез. 1977. № 1. С. 27–33.
- Bazhan N.M., Yakovleva T.V., Makarova E.N. Agouti locus may influence reproduction under food deprivation in the water vole (*Arvicola terrestris*) // J. Exp. Zool. 1999. V. 283. P. 573–579.
- Blake B.H. Reproduction in captive water vole, *Arvicola terrestris* // J. Zool. Lond. 1982. V. 198. P. 524–529.
- Brambell F.W.R. Prenatal mortality in mammals // Biol. Rev. 1948. V. 23. P. 370–407.
- Edmonds D.K., Lindsay K.S., Miller J.F., Williamson E., Wood P.J. Early embryonic mortality in women // Fertil. Steril. 1982. 38. P. 447–453.
- Evans H.E., Sack W.O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references // Anat. Histol. Embryol. 1973. V. 2. № 1. P. 11–45.
- Fredga K. Idiogram and trisomy of the water vole (*Arvicola terrestris* L.), a favourable animal for cytogenetic research // Chromosoma (Berl.). 1968. V. 25. P. 75–89.
- McLaren A., Bowman P. Genetic effects on the timing of early development in the mouse // J. Embryol. Exp. Morph. 1973. V. 30. P. 491–498.
- Wakayama T., Matsubara Y., Imamura K., Kurohmaru M., Hayashi Y., Fukuta K. Development of early-stage embryos of the Japanese field vole, *Microtus montebelli*, in vivo and in vitro // J. Reprod. Fertil. 1994. V. 101. P. 663–666.
- Wasser S.K., Barash D.P. Reproductive suppression among female mammals: implications for biomedicine and sexual selection theory // Q. Rev. Biol. 1983. V. 58. P. 513–538.
- Weigl R. Longevity of mammals in captivity from the living collections of the world. Stuttgart: E. Schweizerbart, 2005. 214 p.
- Wilson J.G. Environmental effects on intrauterine death in animals // Porter I.H., Hook E.B. (eds.) Human embryonic and fetal death. New York: Academic Press, 1980. P. 19–27.

## Early Embryonic Mortality in Water Vole (*Arvicola terrestris* L.)

G. K. Isakova<sup>a</sup>, G. G. Nazarova<sup>b</sup>, and V. I. Evsikov<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,  
pr. Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

e-mail: isakova@math.nsc.ru

<sup>b</sup> Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,  
ul. Frunze 11, Novosibirsk, 630091 Russia

e-mail: galinanazarova@mail.ru

**Abstract**—A morphological study of forty-eight 3–4-day embryos from eight females of the water vole (*Arvicola terrestris* L.) was conducted. The Data obtained demonstrated that early embryonic losses in the water vole can be 30–35%, and the main cause of these losses is anomalies of oogenesis.

**Keywords:** *Arvicola terrestris* water vole, early embryonic mortality.