

	Название статьи	Страницы	Цит.
	ОБЗОР		
<input type="checkbox"/>	ОБОЛОЧКИ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ КАК МИШЕНЬ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я.	309	0
	БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ		
<input type="checkbox"/>	СТАБИЛЬНОСТЬ РАЗВИТИЯ ЛИСТА <i>PISUM SATIVUM</i> L. ПРИ ДЕЙСТВИИ ФОРМАЛЬДЕГИДА В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ ДОЗ Ерофеева Е.А.	320	2
	БИОХИМИЯ РАЗВИТИЯ		
<input type="checkbox"/>	ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ КОМПЛЕКСА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ БЕЛКОВЫХ ИНГИБИТОРОВ В ГРЕНЕ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА Ярыгин Д.В., Минькова Н.О., Филлипович Ю.Б.	325	0
	КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ, МЕТАМОРФОЗ		
<input type="checkbox"/>	НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ И МЕТАМОРФОЗА <i>AURELIA AURITA</i> (CNIDARIA, SCYPHOZOA) Майорова Т.Д., Косевич И.А., Мелехова О.П.	333	0
	ГАМЕТОГЕНЕЗ		
<input type="checkbox"/>	ОСОБЕННОСТИ РОСТА И РАЗВИТИЯ СЕМЕННИКОВ В ПОСТПУБЕРТАТНОМ ПЕРИОДЕ У МЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ РТ И СВА/LAC Гуторова Н.В., Клещёв М.А., Осадчук Л.В.	350	0
	ФИЗИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ		
<input type="checkbox"/>	РЕПРОДУКТИВНЫЙ УСПЕХ САМЦОВ АУТБРЕДНОЙ ЛИНИИ ICR ПРИ РАЗМНОЖЕНИИ НА ФОНЕ АНТИГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ Герлинская Л.А., Масленникова С.О., Завьялов Е.Л., Концева Г.В., Мошкин М.П.	357	0
	ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ		
<input type="checkbox"/>	ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОМНЫХ РАЙОНОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭКСПРЕССИЮ <i>LAWC/TRF2</i> В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ <i>D. MELANOGASTER</i> Симонова О.Б., Модестова Е.А., Воронцова Ю.Е., Черезов Р.О.	366	1

ОБОЛОЧКИ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ КАК МИШЕНЬ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

© 2012 г. И. Н. Рожкова¹, Е. Ю. Брусенцев¹, С. Я. Амстиславский^{1, 2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН
630090 Новосибирск, проспект Лаврентьева, д. 10

² Новосибирский государственный университет
630090 Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

E-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 28.09.11 г.

Окончательный вариант получен 16.11.11 г.

В обзоре описано строение и функция оболочек ооцитов и доимплантационных зародышей млекопитающих. Для успешного проведения замораживания эмбрионов и, особенно, редеривации необходима целостность оболочек зародыша. В то же время в некоторых случаях при проведении ЭКО или при замораживании эмбрионов некоторых видов млекопитающих результаты могут улучшаться, если оболочки перфорируют, нарушая их целостность. Рассмотрены современные репродуктивные технологии, такие как замораживание эмбрионов, экстракорпоральное оплодотворение, ICSI, искусственный хэтчинг, иммуноконтрацепция и редеривация, и роль оболочек ооцитов и ранних зародышей в контексте этих технологий. Рассмотрены особенности проведения этих технологий у разных видов млекопитающих с акцентом на роль оболочек в этом процессе.

Ключевые слова: оболочки эмбрионов, криоконсервация эмбрионов, ЭКО, искусственный хэтчинг, иммуноконтрацепция, редеривация.

В последнее время оболочкам яйцеклеток (ооцитов) и доимплантационных зародышей уделяют большое внимание (Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008; Van Soom et al., 2010). Одной из основных оболочек, которая характерна для всех преимплантационных эмбрионов млекопитающих, является *zona pellucida*, или, как ее называют в русскоязычной литературе, прозрачная оболочка (Амстиславский и др., 1991; Rankin et al., 2000; Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008). Эта структура формируется у млекопитающих ооцитом и окружающими его фолликулярными клетками, являясь впоследствии, после овуляции и оплодотворения ооцита, естественным барьером между эмбрионом и окружающей средой; эта основная оболочка играет важнейшую роль в оплодотворении яйцеклетки (ооцита) и последующем развитии эмбриона и сохраняется у большинства видов млекопитающих до стадии поздней бластоцисты (Denker, 2000; Bedford, 2004; Van Soom et al., 2010). Именно благодаря наличию *zona pellucida* размер эмбриона на преимплантационных стадиях развития меняется у большинства млекопитающих незначительно (Senger, 2003). Исключение составляют предста-

вители семейства хищных (Amstislavsky, 2009), а также кролики (Böving, 1957) и лошади (Betteridge, 1989). Однако у кролика и лошади, а также некоторых других животных наряду с прозрачной оболочкой (или вместо нее) на определенной стадии преимплантационного развития появляются дополнительные оболочки (Böving, 1957; Betteridge, 1989; Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008), состав и свойства которых существенно отличаются от *zona pellucida*. Успех многих современных репродуктивных технологий зависит от свойств оболочек преимплантационных эмбрионов (Montag et al., 2000; Papanikolaou et al., 2008; Kawase et al., 2009; Van Soom et al., 2009; Sills, Palermo, 2010; Van Soom et al., 2010). В данном обзоре наибольшее внимание уделено роли оболочек эмбриона в процессах иммуноконтрацепции, редеривации, замораживания и криоконсервации, экстракорпорального оплодотворения и некоторых других эмбриотехнологических методах. Наибольшее внимание уделено млекопитающим, хотя в ряде случаев приведены результаты работ, полученные на сумчатых.

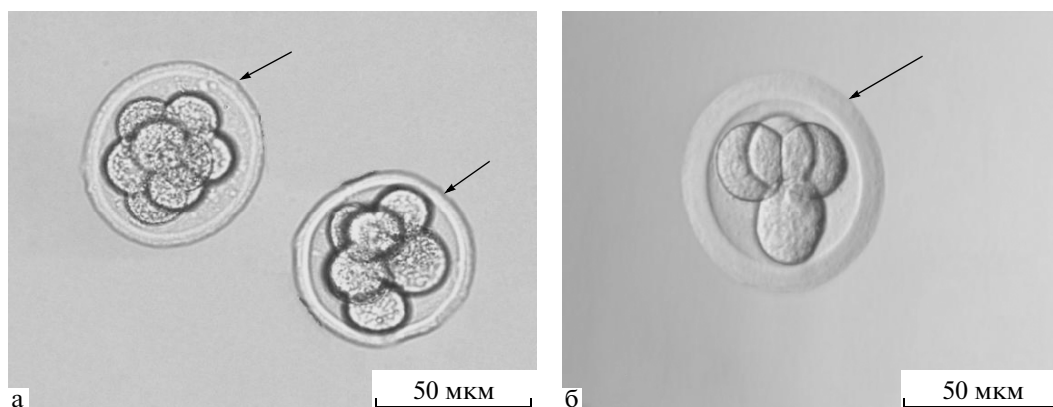


Рис. 1. Дробящийся эмбрион мыши (а) и хомячка Кэмпбэлла (б) на 3-й день развития. Стрелкой указана прозрачная оболочка. Эмбрионы были заморожены на программном замораживателе CL8800 (CryoLogic) и после хранения при температуре жидкого азота были разморожены при 38 градусах Цельсия и сфотографированы на инвертированном микроскопе Leica Microsystems DM IL LED.

СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА *ZONA PELLUCIDA* И ДРУГИХ ОБОЛОЧЕК ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Прозрачная оболочка млекопитающих эластична (Schwartz et al., 1996), снабжена порами (Dudkiewicz, Williams, 1977) и является достаточно прочной барьерной структурой, ограждающей яйцеклетки и эмбрионы от механических и биологических факторов, в частности, от вирусов (Van Soom et al., 2010). Физические свойства *zona pellucida*, такие как характер пористости, прочность, толщина, проницаемость для воды и других неорганических компонентов и другие характеристики, изменяются в зависимости от ряда факторов: вида животного, стадии развития зародыша, а также зависят от того, получен ли эмбрион *in vivo* или *in vitro* (Van Zoom et al., 2010). Толщина прозрачной оболочки и характеристики проницаемости различны у разных видов млекопитающих. Например, у мышей она тонкая (5 мкм), а у свиней толстая и прочная (16 мкм) (Bedford, 2004). Даже в пределах одного таксона могут быть существенные видовые различия характеристик *zona pellucida*. Так, например, у двух видов грызунов — мыши (*Mus musculus*) и хомячков Кэмпбэлла (*Phodopus campbelli*), по нашим наблюдениям, имеются весьма существенные различия в толщине прозрачной оболочки (рис. 1)

Исследования проницаемости *zona pellucida* ооцитов и зигот мыши показали, что вещества с низкой молекулярной массой могут свободно проходить через прозрачную оболочку (Legge, 1995). Нужно, однако, принять во внимание тот факт, что проницаемость прозрачной оболочки для молекул зависит не только от их размера, но также и от других биохимических или физико-химических факторов, таких как их гидрофиль-

ные/липофильные свойства. Так, например, липиды относительно легко проникают через прозрачную оболочку мыши (Turner, Horobin, 1997).

По химическому составу *zona pellucida* состоит из гликопротеидов — соединений белков с углеводами и представляет собой внеклеточный гликокаликс. В образовании прозрачной оболочки ооцитов и эмбрионов млекопитающих принимают участие четыре гликопротеида: ZP1, ZP2, ZP3 и ZP4, хотя не все виды животных имеют в *zona pellucida* этот набор целиком. Некоторые авторы используют другие обозначения для этих гликопротеидов: ZPA, ZPB, ZPC (Martinez, Harris, 2000; Delves et al., 2002b; Naz et al., 2005; Eade et al., 2009). Как было показано на лабораторной мыши, молекулы гликопротеидов ZP2 и ZP3 соединяются друг с другом попеременно и образуют цепочки, соединенные друг с другом через “мостики” (состоящие из молекул ZP1), в результате чего образуется структура, похожая на сеть (Wassarman, 1988). ZP2 и ZP3 играют большую роль в процессах оплодотворения, причем у мышей и большинства других видов млекопитающих ZP3 выступает в роли рецептора при взаимодействии сперматозоида и яйцеклетки (Vazquez et al., 1989; Hirsch et al., 1994). Углеводные части этого гликопротеида выступают в качестве видоспецифичных лигандов для связывания со сперматозоидами и у разных видов различаются по химическому составу (Moller et al., 1990; Nagdas et al., 1994).

У мышей прозрачная оболочка состоит лишь из трех гликопротеидов: ZP1, ZP2, ZP3 (Wassarman, 1988; Rankin et al., 2000). В исследованиях на нокаутных линиях мышей, у которых был произведен избирательный нокаут соответствующих генов и один из этих гликопротеидов не экспрессировался, была выявлена роль каждого из них в процессе оплодотворения яйцеклетки и в развитии зародыша. Было установлено, что важней-

шую роль в процессе оплодотворения яйцеклеток мышей играет гликопротеид ZP3 (Liu et al., 1996; Rankin et al., 2000).

Поскольку у млекопитающих оплодотворение моноспермное, то для того чтобы эмбрион развивался нормально, в яйцеклетку должно попасть не более одного сперматозоида (Soupart, Strong, 1975). После проникновения сперматозоида структура *zona pellucida* меняется, и эти изменения являются частью сложного механизма, осуществляющего блок полиспермии и препятствующего проникновению более одного сперматозоида в яйцеклетку (Soupart, Strong, 1975). Данный механизм заключается в общем случае в том, что в результате высвобождения содержимого кортикальных гранул от гликопротеидов (ZP2 и ZP3) отщепляются углеводные остатки, что препятствует взаимодействию других сперматозоидов с измененной прозрачной оболочкой (Soupart, Strong, 1975).

Прозрачная оболочка удерживает клетки эмбриона вместе в заданном ею объеме (Van Zoom et al., 2010), и целостность ее является важным фактором на определенных этапах развития зародыша *in vivo* (Bronson and McLaren, 1970). По мере развития преимплантационных зародышей и движения их по яйцеводу и матке *zona pellucida* у эмбрионов большинства млекопитающих в большей или меньшей мере модифицируется по структуре и химическому составу. У многих видов млекопитающих, например, по мере продвижения дробящихся зародышей по яйцеводу на прозрачной оболочке аккумулируется протеин, который образуется в яйцеводах под действием эстрогенов (Murray, Messinger, 1994; Hill et al., 1996; Vuhli et al., 2000). При попадании эмбрионов в матку на *zona pellucida* адсорбируются белковые соединения (мукопротеиды), выделяемые маточными железами, при этом структура и характеристики прозрачной оболочки у многих, если не всех, млекопитающих изменяются (Denker, 2000). У некоторых видов млекопитающих по мере движения по репродуктивным путям появляются дополнительные оболочки, которые существуют наряду с *zona pellucida*, либо заменяют ее (Betteridge, 1989; Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008). Особенно хорошо они изучены у кролика и лошади (Böving, 1957; Betteridge, 1989; Denker, 2000). У кролика прозрачная оболочка постепенно замещается на сложную структуру, состоящую из нескольких слоев: неозона, мукопротеидный слой и глоиолемма (Böving, 1957; Denker, 2000). Этот процесс происходит постепенно и начинается на стадии ранней бластоцисты при переходе эмбриона в матку. Сначала на внешней поверхности *zona pellucida* образуется мукопротеидный слой, компоненты которого (мукопротеиды) продуцируются слизистой оболочкой матки. Постепенно прозрачная оболочка истончается и вместо

нее формируется внутренний слой – неозона. Ее компоненты формируются клетками трофэктодермы. Глоиолемма – внешний слой бластоцисты, который образуется последним в результате наслаения выделений маточных желез на мукопротеидный слой; таким образом, завершается формирование многослойной оболочки зрелой бластоцисты кролика (Böving, 1957; Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008). Эмбрион лошади, как и эмбрион кролика, теряет *zona pellucida*, которая на определенном этапе своего развития заменяется так называемой “капсулой” (Betteridge et al. 1982; Betteridge 1989). Это достаточно уникальная структура характерная для лошадиного эмбриона, которая, как и прозрачная оболочка, состоит из гликопротеида, но в отличие от нее не имеет пор (Betteridge, 1989). Капсула образуется уже на шестой день развития эмбриона лошади, когда он все еще покрыт *zona pellucida*, однако, уже начиная с седьмого дня после овуляции ооцита, эмбрион лошади защищен лишь капсулой (Betteridge et al. 1982; Betteridge 1989).

Согласно наблюдениям Дэнкера (Denker, 2000), дополнительные оболочки образуются не только у эмбрионов кролика и лошади, но и у бабуинов, морских котиков, скунса и некоторых других видов млекопитающих, хотя лишь у кролика и лошади эти оболочки достаточно полно изучены и охарактеризованы (Denker, 2000). Ранние исследования показали, что если эмбрионы коровы перенести в воронку яйцевода кролика, то на поверхности *zona pellucida* коровьих эмбрионов образуется тонкий муциновый слой (Adams, 1982). Большинство экспертов сходятся на том, что по крайней мере некоторые из дополнительных оболочек эмбрионов кролика, такие как глоиолемма, формируются под действием маточных желез, а сам зародыш не принимает участия в их образовании (Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008). В то же время было показано, что клетки трофобласта эмбриона являются основным источником материала для формирования капсулы развивающегося зародыша лошади (Albihn et al., 2003).

Имплантация у большинства млекопитающих происходит на стадии вылупившейся бластоцисты (Wimsatt, 1975). Хэтчинг (от англ. hatching – вылупление из яйца) – это процесс освобождения эмбриона от прозрачной оболочки. Хэтчинг проходит в два этапа. На первом этапе в бластоцель поступает большое количество воды, что приводит к увеличению объема бластоцисты; эта стадия выражена в разной мере у разных видов млекопитающих и в эмбриотехнологической литературе получила название “экспандированная бластоциста”. В результате этого процесса возрастает давление на стенки *zona pellucida* изнутри. На втором этапе клетки трофэктодермы эмбриона выделяют протеолитический фермент, который разру-

шает белки гликопротеидов прозрачной оболоч- ки, и бластоциста выходит через образовавшийся разрыв (Perona, Wassarman, 1986).

ОБОЛОЧКИ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ И ООЦИТОВ В СВЯЗИ С СОВРЕМЕННЫМИ РЕПРОДУКТИВНЫМИ ТЕХНОЛОГИЯМИ

Роль оболочек преимплантационных эмбрионов и ооцитов в связи с их замораживанием и криоконсервацией

Первые позитивные результаты по замораживанию преимплантационных зародышей мышей были получены в начале 1970-х годов (Whittingham et al. 1972, Wilmut, 1972). Вскоре были успешно заморожены и ооциты (яйцеклетки) – женские половые клетки мышей (Parkening et al., 1976; Whittingham, 1977). В настоящее время показано, что эмбрионы более чем сорока видов млекопитающих успешно подвергаются замораживанию и криоконсервации (Saragusty and Arav, 2011). Что же касается ооцитов, то до сих пор по отношению к большинству видов млекопитающих не существует эффективного протокола их замораживания, поэтому отдельные успехи не дают пока оснований для того, чтобы считать замораживание и криоконсервацию яйцеклеток столь же рутинной технологией, какими являются замораживание и криоконсервация эмбрионов и семени (Landel, 2005). Однако были опубликованы положительные результаты замораживания ооцитов крыс (Kasai et al., 1979), золотистых хомячков (Crister et al., 1986; Costa-Borges et al., 2009), кроликов (Al-Hasani et al., 1986), а также человека (Chen, 1986; Cook and Edgar, 2007). Имеются данные по эффективному замораживанию ооцитов кошек (Jewgenow et al. 1998). Наиболее же убедительные результаты получены при замораживании яйцеклеток человека (Cook and Edgar, 2007; Nagy et al., 2009; Noyes et al., 2010).

Повреждение *zona pellucida* является достаточно частым осложнением процедур замораживания/оттаивания эмбрионов (Lehn-Jensen and Rall, 1983; Rall and Meyer, 1989). Частые случаи повреждения прозрачной оболочки свидетельствуют о субоптимальных условиях замораживания (Lehn-Jensen and Rall, 1983; Van Den Abbeel and Van Steirteghem, 2000). Более того, зародыши с поврежденными оболочками или вообще лишенные оболочек не рекомендованы для международного обмена по санитарным соображениям (Van Zoom et al., 2010). Поскольку проницаемость оболочек эмбриона для воды и криопротекторов является важной компонентой успеха при программном замораживании (Saragusty and Arav, 2011), было бы вполне логичным полагать, что зародыши, у которых такая проницаемость низка,

хуже переживают эти процедуры. Эта гипотеза получила подтверждение в экспериментах с лошадиными зародышами. Ранние эмбрионы лошади (вымываемые на 6-й день беременности), у которых прозрачная оболочка еще не замещена “капсулой” достаточно эффективно замораживаются (Slade et al., 1985). Однако эмбрионы более поздних стадий (вымываемые на 7–8-й дни беременности) гораздо хуже выдерживают процедуры замораживания (Slade et al., 1985; Varfield et al., 2009). Низкая выживаемость зародышей лошадей после того, как прозрачная оболочка заменяется менее проницаемой капсулой, возможно, по крайней мере отчасти, связана именно с плохой проницаемостью капсулы для воды и криопротекторов (Legrand et al., 2002; Hochi, 2003). Действительно, была обнаружена обратная зависимость между толщиной капсулы и выживаемостью лошадиных эмбрионов в ходе замораживания и криоконсервации (Legrand et al., 1999). Более того, в одной из работ было показано, что эмбрионы лошади, которые обрабатывали трипсином перед замораживанием и у которых толщина капсулы уменьшалась, лучше переживали эту процедуру (Legrand et al., 2000).

В еще большей мере проблемы, вызванные взаимодействием процедур криоконсервации с оболочками, в данном случае прежде всего *zona pellucida* имеют место по отношению к замораживанию ооцитов (Saragusty and Arav, 2011). Наряду с другими проблемами, связанными с замораживанием ооцитов и перечисленными в специальных обзорных статьях (Cook and Edgar, 2007; Tao and Del Valle, 2008; Noyes et al., 2010), существует проблема “затвердевания прозрачной оболочки” (*zona hardening*), что обусловлено прежде всего выделением содержимого кортикальных гранул во время процедур замораживания-оттаивания. Это затрудняет или делает невозможным последующее оплодотворение таких яйцеклеток (Cargroll et al., 1990; Matson et al., 1997). Тем не менее число детей, рожденных после замораживания и криоконсервации ооцитов человека уже превысило 500 (Nagy et al., 2009). Эти успехи последнего времени дали основание поставить вопрос о том, что замораживание и криоконсервация ооцитов уже не являются сугубо “экспериментальными” процедурами, но скорее всего в самом скором будущем будут такими же рутинными технологиями, как и замораживание/криоконсервация эмбрионов (Noyes et al., 2010).

Способы воздействия на оболочки ооцитов и эмбрионов с целью улучшения результатов экстракорпорального оплодотворения, криоконсервации и культивирования in vitro

При получении эмбрионов путем экстракорпорального оплодотворения и последующего

культивирования *in vitro* характеристики прозрачной оболочки существенно отличаются от таковых у эмбрионов, развивавшихся в условиях *in vivo* (Van Soom et al., 2010). В частности, у эмбрионов, полученных *in vitro*, может изменяться плотность или толщина оболочки, но прямой корреляции между толщиной и плотностью прозрачной оболочки не обнаружено (Cohen et al., 1990).

С целью облегчения избавления эмбриона от прозрачной оболочки был разработан метод “вспомогательного хэтчинга”. Его применяют с разными целями: для улучшения результатов ЭКО (Wiemer et al., 1996; Hwang et al., 2000; Turetsky et al., 2008), для повышения эффективности процедур замораживания и криоконсервации эмбрионов (Legrand et al., 2000; Hershlag and Feng, 2005; Sifer et al., 2006) и, особенно, ооцитов (Anzai et al., 2006). Осуществляют данную процедуру различными способами (механическим, химическим, лазерным и пьезоэлектрическим). При применении первого (механического) способа прозрачную оболочку прокалывают микроиглой, не задевая расположенные под ней клетки (Cohen et al., 1990). При применении химического способа для перфорирования оболочки применяют кислый раствор Тироде (Cohen et al., 1990; Neev et al., 1993; Wiemer et al., 1996). При лазерном хэтчинге вместо микроиглы и кислотного раствора используют луч лазера, при помощи которого выжигают отверстие в прозрачной оболочке, причем луч направляют под таким углом, чтобы не задеть клетки эмбриона (Neev et al., 1993; Montag et al., 2000; Anzai et al., 2006). Используют также модификацию этого метода, когда луч лазера направляют таким образом, что он не перфорирует прозрачную оболочку, но делает ее локально более тонкой (Rink et al., 1996). К наиболее современному способу проведения вспомогательного хэтчинга относится пьезо-методика (Nakayama et al., 1998; Kawase et al., 2009). Как и в предыдущих случаях, эмбрион фиксируют микропипеткой. К прозрачной оболочке подводят микроманипулятор с вибрацией высокой частоты. С его помощью делают 5–10 конических углублений на небольшом участке оболочки эмбриона, что делает ее более тонкой в этой области (Nakayama et al., 1998; Kawase et al., 2009).

Было показано, что при вспомогательном хэтчинге человеческих эмбрионов, полученных путем ЭКО и культивировавшихся *in vitro*, улучшаются результаты последующей трансплантации этих эмбрионов реципиентам, причем возможно получить беременность даже в тех случаях, когда традиционное ЭКО не приводило к положительным результатам (Wiemer et al., 1996; Turetsky et al., 2008). Аналогичная ситуация характерна и для мышей (Hwang et al., 2000).

Процедуры, аналогичные вспомогательному хэтчингу, применяют в некоторых специальных случаях и для повышения эффективности процедур замораживания и криоконсервации. Воздействие на оболочки различными средствами с целью их утончения и улучшения характеристик их проницаемости с успехом было применено на мышиных (Hershlag and Feng, 2005), лошадиных (Legrand et al., 2000) и человеческих (Sifer et al., 2006) зародышах; при этом имело место улучшение результатов процесса замораживания. При применении лазерного перфорирования прозрачной оболочки ооцитов мышей эффективность процедур замораживания/криоконсервации и последующего ЭКО с применением семени мышей субфертильных линий возросла почти в 6 раз (с 11% до 60%) (Anzai et al., 2006). Другой подход заключался в частичной диссекции прозрачной оболочки (Nakagata et al., 1997) или частичном надрезе ее при помощи пьезомикроманипулятора (Kawase et al., 2009).

Иммуноконтрацепция

Иммуноконтрацепция — это процесс предотвращения зачатия путем вызывания аутоиммунной реакции на то или иное звено нормального репродуктивного процесса, что в конечном счете должно блокировать нормальное течение беременности на той или иной стадии. Образование антител может, например, приводить к иммобилизации и/или агглютинации сперматозоидов, связыванию рецепторов оболочки ооцита; также образование специфических антител может воздействовать на развивающийся зародыш или блокировать механизмы распознавания беременности материнским организмом (Bradley et al., 1999; Naz et al., 2005). Таким образом, антитела действуют как “префертилизационный контрацептив”, блокируя тем или иным способом взаимодействие сперматозоидов и яйцеклеток, либо как “постфертилизационный контрацептив”, препятствуя имплантации образовавшегося зародыша; при этом иммуноконтрацепция может происходить как на уровне самих гамет или зародышей, так и на уровне половых гормонов, необходимых для их успешного развития (Herr, 1996; Delves et al., 2002a, b). Весьма привлекательным и хорошо зарекомендовавшим себя на практике способом иммуноконтрацепции является иммунизация самок против гликопротеидов прозрачной оболочки ооцита/эмбриона; практически это достигается, когда основой вакцины являются компоненты прозрачной оболочки (Gupta, 1997; Lloyd et al., 2003; Hardy et al., 2004; Eade et al., 2009).

Иммуноконтрацепция была успешно применена в многочисленных лабораторных и полевых исследованиях, причем положительный эффект

получен как на уровне отдельных особей, так и на уровне популяций — более чем на 85 различных видах диких животных (Ringleb et al., 2004; Mackenzie et al., 2006; Duckworth et al., 2007; Nation et al., 2008; Eade et al., 2009; Kirkpatrick et al., 2011).

Наиболее оптимальным и универсальным способом иммуноконтрацепции по отношению к диким видам млекопитающих на сегодня является иммунизация самок гликопротеидами прозрачной оболочки ооцита свиньи. Именно такой способ иммуноконтрацепции дал устойчивый эффект регулирования численности популяций таких диких животных, как дикие лошади, олени, зубры и африканские слоны (Kirkpatrick et al., 2011). Успех в экспериментах по иммуноконтрацепции приматов (бабуинов и макак) (Martinez, Harris, 2000) явился предпосылкой создания контрацептивных вакцин для человека с целью планирования семьи (Delves et al., 2002a).

Однако несмотря на то что гликопротеиды прозрачной оболочки свиньи являются успешным методом иммуноконтрацепции для многих видов млекопитающих (Kirkpatrick et al., 2011), в некоторых случаях приходится создавать более специфичные для данного вида млекопитающих вакцины. Так, при иммунизации кошек гликопротеидами прозрачной оболочки свиньи титр иммунного ответа был высок, но контрацепция не достигалась, при иммунизации же против гликопротеидов прозрачной оболочки кошачьих ооцитов эффект контрацепции достигался (Eade et al. 2009).

Метод иммуноконтрацепции путем иммунизации самок гликопротеидами прозрачной оболочки ооцита является эффективным и наиболее гуманным способом регулирования численности животных, представляющих реальную проблему для биотопов или могущих быть резервуаром для инфекций, таких как: одичавшие кошки (Ringleb et al., 2004; Eade et al., 2009), опоссумы (Duckworth et al., 2007; Nation et al., 2008), мыши (Hardy et al., 2003; Lloyd et al., 2003; Hardy et al., 2004), кролики (Mackenzie et al., 2006) и многие другие.

Иммунизация ZP-гликопротеинами в опыте на животных приводила к блокаде фертильности (Martinez, Harris, 2000; Hardy et al., 2003; Lloyd et al., 2003; Hardy et al., 2004). В качестве основного компонента противозачаточных вакцин часто используют полипептидные фрагменты гликопротеидов прозрачной оболочки свиньи, которые в организме животного выступают как антигены, к которым будут вырабатываться антитела (Bradley et al., 1999; Delves et al., 2002b; Eade et al., 2009; Kirkpatrick et al., 2011). Эффективная контрацепция при помощи синтеза антител к ZP3 исследована на мышах линии BALB/c (Hardy et al., 2003; Lloyd et al., 2003; Hardy et al., 2004). Однако в некоторых случаях наблюдалось транзитное или

необратимое нарушение цикличности синтеза гормонов и, следовательно, созревания фолликулов. Для преодоления этих явлений делаются попытки расшифровать эпитопы ZP-гликопротеинов для выявления тех из них, к которым вырабатываются антитела, обладающие антифертильным действием, но не приводящие к нарушению функции яичников. Рекомбинантная технология делает возможным синтез специфичных эпитопов ZP-гликопротеинов в больших количествах для использования в контрацептивных целях (Bradley et al., 1999; Martinez, Harris, 2000).

Редеривация

Задача редеривации заключается в получении здорового потомства от зараженных всевозможными патогенами животных. Редеривация может осуществляться различными способами (Брусенцев и др., 2011), но с 1980-х годов в качестве метода редеривации наиболее широко используют трансплантацию эмбрионов, которая является оптимальным способом очистки животных от подавляющего большинства патогенов (Carthew et al., 1983; Homberger, 1997; Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Ike et al., 2007; Besselsen et al., 2008; Fray et al., 2008; Janus et al., 2009). Именно этот способ признается современными экспертами как “золотой стандарт” редеривации (Mahabir et al., 2008).

Прозрачная оболочка является естественной преградой для попадания инфекций различной природы внутрь эмбриона (Gwatkin, 1967; Peters et al., 2006; Van Soom et al., 2010), но именно на ней могут адсорбироваться некоторые вирусные частицы, от которых необходимо избавиться в процессе редеривации (Van Soom et al., 2009). Прозрачная оболочка меняется по мере развития эмбриона (Van Soom, 2010). На ранних стадиях доимплантационного развития она максимально плотная и непроницаема практически для всех патогенов (Mertens, 2006). Для редеривации эмбрионы вымывают у инфицированных самок-доноров на стадии морулы/бластоцисты и после соответствующих процедур очистки вводят в матку реципиента, свободного от специфичных патогенов (Carthew et al., 1983; Suzuki et al., 1996; Okamoto, Matsumoto, 1999; Peters et al., 2006), либо эмбрионы извлекают на более ранней (двухклеточной) стадии развития и вводят в воронку яйцевода реципиента (Mahabir et al., 2007; Besselsen et al., 2008; Janus et al., 2009; Pluck, Klasen, 2009). Перед трансплантацией эмбрионы отмывают в стерильной питательной среде, очищая их тем самым от патогенов. В ходе этой процедуры зародыши по одному многократно переносят из одной капли в другую, добываясь при каждом переносе разбавления 1 : 100 (Mahabir et al., 2007).

Прозрачная оболочка обладает устойчивостью к воздействию протеолитических ферментов, таких как трипсин и хемотрипсин (Bedford, 2004). Благодаря этому свойству при работе с эмбрионами сельскохозяйственных животных наряду с 10-кратным отмыванием в стерильных средах рекомендуют осуществлять инкубацию зародышей в растворе трипсина в течение 1.5 минут (Stringfellow, 1998; Angelo, 2009). Этого времени достаточно, чтобы разрушить адсорбированные на оболочке вирусы и при этом не повредить саму оболочку (Van Soom et al., 2010). При воздействии трипсином на прозрачную оболочку происходит ее истончение, что практически не сказывается на последующем развитии зародышей (Van Soom et al., 2010). Вирус лейкоза коров (BLV) вызывает распространенное и опасное заболевание крупного рогатого скота (Храмцов и др., 2003), поражает клетки лимфоцитарной ткани, но не способен проникать через прозрачную оболочку в бластомеры эмбриона. Редеривация путем трансплантации эмбрионов позволяет избавиться от данного патогена (Nage, 1985). При работе с эмбрионами лабораторных грызунов через раствор трипсина их обычно не промывают, однако рекомендовано производить их отмывание путем переноса через 10 капель со свежей стерильной средой, что является достаточным условием для избавления от большинства патогенов (Peters et al., 2006).

Ряд мелких вирусов, имеющих простое строение, представляют наибольшую проблему при осуществлении редеривации путем трансплантации эмбрионов. Этот метод является не вполне эффективным при очистке таких мелких вирусов мышей, как mouse minute virus (MMV) и mouse hepatitis virus (Mahabir et al., 2007; Mahabir et al., 2009), поскольку эти мелкие вирусы могут попадать в поры прозрачной оболочки мышинового эмбриона, застревая в них, и переноситься при эмбриотрансплантации “чистому” реципиенту. Свиной парвовирус (PPV) может легко проникать в клетки эмбриона свиньи через прозрачную оболочку (Bane, 1990). Это обусловлено тем, что размер вирусной частицы очень маленький и составляет всего 18 нм (Bane, 1990). В поры прозрачной оболочки эмбрионов крупного рогатого скота может попадать и удерживаться там такой мелкий вирус, как бычий вирус диареи (BVDV), имеющий размер 40 нм (Vanroose, 2000). Также вирус бычьего герпеса типа 1 (BHV-1), имеющий размер 180 нм, может проникать через прозрачную оболочку и инфицировать клетки эмбриона (Макаревич, 2007).

У эмбрионов полученных *in vitro* поры прозрачной оболочки, как правило, более крупные, чем у полученных *in vivo*. Поэтому попадание вирусных частиц в поры и их адсорбция на поверхности прозрачной оболочки выше у первых. При

процедуре ЭКО шанс попадания вируса на прозрачную оболочку мыши очень низкий из-за окружающих ооцит фолликулярных клеток, которые могут предохранять ооцит (Mahabir et al., 2009).

При проведении редеривации путем трансплантации эмбрионов необходимо производить отбраковку зародышей со всевозможными разрывами прозрачной оболочки или полным ее отсутствием. Для обнаружения этих нарушений следует до начала отмывки рассмотреть зародыши при достаточно большом (80–100-кратном) увеличении и выбрать те из них, в которых отсутствуют повреждения прозрачной оболочки (Van Soom et al., 2010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Амстиславский С.Я., Максимовский Л.Ф., Воронников М.Т. Методы биотехнологии в практике разведения животных. Новосибирск: Изд-во ИЦиГ, 1991. 170 с.
- Брусенцев Е.Ю., Напимеров В.А., Амстиславский С.Я. Редеривация как способ очистки лабораторных животных // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Т. 15. № 1. С. 102–113.
- Корсак В.С. От опытов с искусственным оплодотворением кроликов до вспомогательных репродуктивных технологий // Журнал акушерства и женских болезней. 2004. № 1. С. 31–36.
- Лызикова Ю.А. Вспомогательные репродуктивные технологии в лечении бесплодия // Охрана материнства и детства. 2010. № 2. С. 80–83.
- Савельева Г.М., Курцер М.А., Краснопольская К.В., Ероян Л.Х. ЭКО в лечении бесплодия. Ведение беременности и родов // Журнал акушерства и женских болезней. 2003. № 3. С. 9–13.
- Храмцов В.В., Гулюкин М.И., Иванова Л.А. Разработка эффективных мероприятий против лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринария. 2003. № 5.
- Шахова М.А. Вспомогательные репродуктивные технологии в лечении тяжелых форм мужского бесплодия // НМЖ. 2005. № 4. С. 101–106.
- Adams C.E. Egg transfer in carnivores and rodents between species and to ectopic sites // Adams C.E. (ed). Mammalian egg transfer. Boca Raton: C. R. C. Press, 1982. P. 49–61.
- Albihn A., Waelchli R.O., Samper J., Oriol J.G., Croy B.A., Betteridge K.J. Production of capsular material by equine trophoblast transplanted into immunodeficient mice // Reproduction. 2003. V. 125. P. 855–863.
- Al-Hasani S., Tolkendorf A., Diedrich K. et al. Successful *in vitro* fertilization of frozen-thawed rabbit oocytes // Hum. Reprod. 1986. V. 1. № 5. P. 309–312.
- Amstislavsky S. Reproductive Biology and Embryo Technology in Mustelidae. PhD Thesis. University of Kuopio, Kuopio, Finland, 2009. 149 p.
- Angelo M., Visintin J.A., Richtzenhain L.J., Gonçalves R.F. Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 on *in vitro* produced pre-im-

- plantation embryos // *Reprod. Domest. Anim.* 2009. V. 44. № 3. P. 536–539.
- Anzai M., Nishiwaki M., Yanagi M. et al. Application of laser-assisted zona drilling to *in vitro* fertilization of cryopreserved mouse oocytes with spermatozoa from a subfertile transgenic mouse // *J. Reprod. Dev.* 2006. V. 52. № 5. P. 601–606.
- Bane D.P., James J.E., Gradil C.M., Molitor T.W. *In vitro* exposure of preimplantation porcine embryos to porcine parvovirus // *Theriogenology*. 1990. V. 33. P. 553–561.
- Barfield J.P., McCue P.M., Squires E.L., Seidel G.E. Jr. Effect of dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos // *Cryobiology*. 2009. V. 59. № 1. P. 36–41.
- Bedford J.M. Enigmas of mammalian gamete form and function // *Biol. Rev.* 2004. V. 79. P. 429–460.
- Besselsen D.G., Romero-Aleshire M.J., Munger S.J. et al. Embryo transfer rederivation of C. B-17/Icr-Prkdc(scid) mice experimentally infected with mouse parvovirus 1 // *Comp. Med.* 2008. V. 58. № 4. P. 353–359.
- Betteridge K.J., Eaglesome M.D., Mitchell D., Flood P.F., Bürriault R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. // *J. Anat.* 1982. V. 135. P. 191–209.
- Betteridge K.J. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer // *Equine. Vet. J.* 1989. Suppl. 8. P. 92–100.
- Böving B.G. Rabbit egg coverings // *Anat. Rec.* 1957. V. 127. P. 270.
- Bradley M.P., Eade J., Penhale J., Bird P. Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species // *J. Biotechnol.* 1999. V. 73. № 2. P. 91–101.
- Bronson R.A., McLaren A. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the *zona pellucida* // *J. Reprod. Fertil.* 1970. V. 22. № 1. P. 129–137.
- Buhi W.C., Alvarez I.M., Kouba A.J. Secreted proteins of the oviduct // *Cells Tissues Organs*. 2000. V. 166. № 2. P. 165–179.
- Carroll J., Depypere H., Matthews C.D. Freeze-thaw-induced changes of the *zona pellucida* explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes // *J. Reprod. Fertil.* 1990. V. 90. № 2. P. 547–553.
- Carthew P., Wood M.J., Kirby C. Elimination of Sendai (parainfluenza type 1) virus infection from mice by embryo transfer // *J. Reprod. Fertil.* 1983. V. 69. № 1. P. 253–257.
- Check J.H., Choe J.K., Nazari A. Hyperreactio luteinalis despite the absence of a corpus luteum and suppressed serum follicle stimulating concentrations in a triplet pregnancy // *Hum. Reprod.* 2000. V. 15. № 5. P. 1043–1045.
- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation // *Lancet*. 1986. № 1. P. 884–886.
- Cohen J., Elsner C., Kort H. et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation // *Hum. Reprod.* 1990. V. 5. № 1. P. 7–13.
- Cook D.A., Edgar D.H. Human oocyte cryopreservation // *Hum. Reprod.* 2007. № 6. P. 591–605.
- Costa-Borges N., González S., Ibáñez E., Santalo' J. Collection and cryopreservation of hamster oocytes and mouse embryos // *J. Vis. Exp.* 2009. V. 27. P. 25.
- Crister J.K. et al. Influences of cumulus cell association during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryo development // *Society for the Study of Reproduction*. 1986. V. 34. P. 192–198.
- Delves P.J., Lund T., Roitt I.M. Future prospects for vaccines to control fertility // *Trends in Immunology*. 2002. V. 23. № 4. P. 220–221.
- Delves P.J., Lund T., Roitt I.M. Antifertility vaccines // *Trends in Immunology*. 2002. V. 23. № 4. P. 213–219.
- Denker H.-W. Structural dynamics and function of early embryonic coats // *Cell Tiss. Organs*. 2000. V. 166. P. 180–207.
- Duckworth J.A., Wilson K., Cui X., Molinia F.C., Cowan P.E. Immunogenicity and contraceptive potential of three infertility-relevant *zona pellucida* 2 epitopes in the marsupial brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) // *Reproduction*. 2007. V. 133. № 1. P. 177–186.
- Dudkiewicz A., Williams W. Fine structural observations of the mammalian *zona pellucida* by scanning electron microscopy // *Scan. Electron. Microsc.* 1977. V. 2. P. 317–324.
- Eade J.A., Roberston I.D., James C.M. Contraceptive potential of porcine and feline *zona pellucida* A, B and C subunits in domestic cats // *Reproduction*. 2009. V. 137. № 6. P. 913–922.
- Fray M.D., Pickard A.R., Harrison M., Cheeseman M.T. Upgrading mouse health and welfare: direct benefits of a large-scale rederivation programme // *Lab. Anim.* 2008. V. 42. № 2. P. 127–139.
- Gwatkin R.B. Passage of mengovirus through the *zona pellucida* of the mouse morula // *J. Reprod. Fertil.* 1967. V. 13. № 3. P. 577–578.
- Gupta S.K. Prospects of *zona pellucida* glycoproteins as immunogens for contraceptive vaccine // *Hum. Reprod. Update*. 1997. V. 3. № 4. P. 311–324.
- Hardy C.M., Clydesdale G., Mobbs K.J. Development of mouse-specific contraceptive vaccines: infertility in mice immunized with peptide and polyepitope antigens // *Reproduction*. 2004. V. 128. № 4. P. 395–407.
- Hardy C.M., ten Have J.F., Pekin J. et al. Contraceptive responses of mice immunized with purified recombinant mouse *zona pellucida* subunit 3 (mZP3) proteins // *Reproduction*. 2003. V. 126. № 1. P. 49–59.
- Hare W.C., Mitchell D., Singh E.L. et al. Embryo transfer in relation to bovine leukemia virus control and eradication // *Can. Vet. J.* 1985. V. 26. № 8. P. 231–234.
- Herr J.C. Update on the Center for Recombinant Gamete Contraceptive Vaccinogens // *Am. J. Reprod. Immunol.* 1996. V. 35. № 3. P. 184–189.
- Hershlag A., Feng H.L. Effect of prefreeze assisted hatching on postthaw survival of mouse embryos // *Fertility and Sterility*. 2005. V. 84. P. 1752–1754.
- Hill J.L., Walker S.K., Brown G.H., Nancarrow C.D. The effects of an estrus-associated oviductal glycoprotein on the *in vitro* fertilization and development of ovine

- oocytes matured *in vitro* // Ther. 1996. V. 46. P. 1379–1388.
- Hinsch K.D., Hinsch E., Meinecke B. et al. Identification of mouse ZP3 protein in mammalian oocytes with antisera against synthetic ZP3 peptides // Biol. Reprod. 1994. V. 51. № 2. P. 193–204.
- Hochi S. Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses // J. Reprod. Dev. 2003. V. 49. № 1. P. 13–21.
- Homberger F.R. Enterotropic mouse hepatitis virus // Lab. Anim. 1997. V. 31. № 2. P. 97–115.
- Hwang S., Lee E., Chung Y. et al. Intactness of *zona pellucida* does not affect the secretion of a trypsin-like protease from mouse blastocyst // J. Korean. Med. Sci. 2000. V. 15. № 5. P. 529–532.
- Ike F., Bourgade F., Ohsawa K. et al. Lymphocytic choriomeningitis infection undetected by dirty-bedding sentinel monitoring and revealed after embryo transfer of an inbred strain derived from wild mice // Comp. Med. 2007. V. 57. № 3. P. 272–281.
- Janus L.M., Smoczek A., Hedrich H.J., Bleich A. Risk assessment of minute virus of mice transmission during rederivation: detection in reproductive organs, gametes, and embryos of mice after *in vivo* infection // Biol. Reprod. 2009. V. 81. № 5. P. 1010–1015.
- Jewgenow K., Penfold L.M., Meyer H.H., Wildt D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation // J. Reprod. Fertil. 1998. V. 112. № 1. P. 39–47.
- Kasai M., Iritani A., Chang M.C. Fertilization *in vitro* of rat ovarian oocytes after freezing and thawing // Biol. Reprod. 1979. V. 21. № 4. P. 839–844.
- Kawase Y., Tachibe T., Hani T. et al. Effect of zona incision by piezo-micromanipulator (ZIP) on *in vitro* fertilization in 21 transgenic mice lines // Exp. Anim. 2009. V. 58. № 4. P. 415–419.
- Kirkpatrick J.F., Lyda R.O., Frank K.M. Contraceptive Vaccines for Wildlife: A Review // Am. J. Reprod. Immunol. 2011. P. 1–11.
- Landel C. Archiving mouse strains by cryopreservation // Lab. Anim. 2005. V. 34. P. 50–57.
- Lehn-Jensen H., Rall W. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing // Theriogenology. 1983. V. 19. P. 263–277.
- Legge M. Oocyte and zygote *zona pellucida* permeability to macromolecules // J. Exp. Zool. 1995. V. 271. № 2. P. 145–150.
- Legrand E., Bencharif D., Barrier-Battut I. et al. Comparison of pregnancy rates for days 7–8 embryos frozen in glycerol with and without previous enzymatic treatment of their capsule // Theriogenology. 2002. V. 58. P. 721–723.
- Legrand E., Krawiecki J.M., Tainturier D. et al. Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? // Proceeding of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. Saari, Finland. 2000. Havemeyer Foundation Monograph Series 3. P. 62–65.
- Legrand E., Bencharif D., Battut I. et al. Horse embryo freezing: influence of thickness of the capsule // Proceedings of the 15th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association. 1999. P. 184–185.
- Liu C., Litscher E.S., Mortillo S. et al. Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a *zona pellucida* and infertility in female mice // PNAS 1996. V. 93. P. 5431–5436.
- Lloyd M.L., Shellam G.R., Papadimitriou J.M., Lawson M.A. Immunocontraception is induced in BALB/c mice inoculated with murine cytomegalovirus expressing mouse *zona pellucida* 3 // Biol. Reprod. 2003. V. 68. № 6. P. 2024–2032.
- Mackenzie S.M., McLaughlin E.A., Perkins H.D. et al. Immunocontraceptive effects on female rabbits infected with recombinant myxoma virus expressing rabbit ZP2 or ZP3 // Biol. Reprod. 2006. V. 74. № 3. P. 511–521.
- Mahabir E., Reindl K., Mysliwicz J. et al. Impairment of germline transmission after blastocyst injection with murine embryonic stem cells cultured with mouse hepatitis virus and mouse minute virus // Transgenic Res. 2009. V. 18. № 1. P. 45–57.
- Mahabir E., Bauer B., Schmidt J. Rodent and germplasm trafficking: risks of microbial contamination in a high-tech biomedical world // ILAR J. 2008. V. 49. № 3. P. 347–355.
- Mahabir E., Bulian D., Needham J. et al. Transmission of mouse minute virus (MMV) but not mouse hepatitis virus (MHV) following embryo transfer with experimentally exposed *in vivo*-derived embryos // Biol. Reprod. 2007. V. 76. № 2. P. 189–197.
- Makarevich A.V., Pivko J., Kubovicova E. et al. Development and viability of bovine preimplantation embryos after the *in vitro* infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultrastructural studies // Zygote. 2007. V. 15. P. 307–315.
- Martinez M.L., Harris J.D. Effectiveness of *zona pellucida* protein ZPB as an immunocontraceptive antigen // J. Reprod. Fertil. 2000. V. 120. № 1. P. 19–32.
- Matson P.L., Graefling J., Junk S.M. et al. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an *in vitro* fertilization programme // Hum. Reprod. 1997. V. 12. № 7. P. 1550–1553.
- Menkhorst E., Selwood L. Vertebrate extracellular preovulatory and postovulatory egg coats // Biol. Reprod. 2008. V. 79. P. 790–797.
- Mertens E.M. Der Einfluss der *in vitro* Kultur boviner Embryonen auf die Struktur der extraembryonalen Matrix (*Zona pellucida*): eine rasterelektronen- und lichtmikroskopische Studie // Ph. D. Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany. 2006.
- Moller C.C., Bleil J.D., Kinloch R.A., Wassarman P.M. Structural and functional relationships between mouse and hamster *zona pellucida* glycoproteins // Dev. Biol. 1990. V. 137. № 2. P. 276–286.
- Montag M., Koll B., van der Ven H. Use of a laser to evaluate *zona pellucida* hardness at different stages of mouse embryonic development *in vitro* and *in vivo* // J. Assist. Reprod. Genet. 2000. V. 17. № 3. P. 178–181.
- Morrell J.M. Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice // Lab. Anim. 1999. V. 33. № 3. P. 201–206.
- Murray M., Messinger S.M. Early embryonic development in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) is ac-

- accompanied by alterations in the distribution and intensity of an estrogen (E2)-dependent oviduct glycoprotein in the blastomere membrane and *zona pellucida* and in its association with F-actin // *Biol. Reprod.* 1994. V. 51. № 6. P. 1126–1139.
- Nagdas S.K., Araki Y., Chayko C.A. et al. O-linked trisaccharide and N-linked poly-N-acetyllactosaminyl glycans are present on mouse ZP2 and ZP3 // *Biol. Reprod.* 1994. V. 51. № 2. P. 262–272.
- Nagy Z.P., Chang C.C., Shapiro D.B. et al. The efficacy and safety of human oocyte vitrification // *Semin. Reprod. Med.* 2009. V. 27. № 6. P. 450–455.
- Nakagata N., Okamoto M., Ueda O., Suzuki H. Positive effect of partial zona-pellucida dissection on the *in vitro* fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6J transgenic mouse spermatozoa of low motility // *Biol. Reprod.* 1997. V. 57. № 5. P. 1050–1055.
- Nakayama T., Fujiwara H., Tastumi K. et al. A new assisted hatching technique using a piezo-micromanipulator // *Fertil. Steril.* 1998. V. 69. № 4. P. 784–788.
- Nation A., Cui S., Selwood L. Vesicle-associated protein 1: a novel ovarian immunocontraceptive target in the common brushtail possum, *Trichosurus vulpecula* // *Reproduction.* 2008. V. 136. № 5. P. 657–665.
- Naz R.K., Gupta S.K., Gupta J.C. et al. Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review // *Hum. Reprod.* 2005. V. 20. № 12. P. 3271–3283.
- Neev J., Gonzalez A., Licciardi F. et al. Opening of the mouse *zona pellucida* by laser without a micromanipulator // *Hum. Reprod.* 1993. № 6. P. 939–944.
- Nikolettos N., Al-Hasani S., Baukloh V. et al. The outcome of intracytoplasmic sperm injection in patients with retrograde ejaculation // *Hum. Reprod.* 1999. V. 14. № 9. P. 2293–2296.
- Noyes N., Boldt J., Nagy Z.P. Oocyte cryopreservation: is it time to remove its experimental label? // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010. V. 27. P. 69–74.
- Okamoto M., Matsumoto T. Production of germfree mice by embryo transfer // *Exp. Anim.* 1999. V. 48. № 1. P. 59–62.
- Palermo G.D., Alikani M., Bertoli M. et al. Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection // *Hum. Reprod.* 1996. V. 11. № 1. P. 172–176.
- Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte // *Lancet.* 1992. V. 340. P. 17–18.
- Papanikolaou E.G., Kolibianakis E.M., Tournaye H. et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis // *Hum. Reprod.* 2008. V. 23. № 1. P. 91–99.
- Parkening T.A., Tsunoda Y., Chang M.C. Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs // *J. Exp. Zool.* 1976. V. 197. P. 369–374.
- Perona R.M., Wassarman P.M. Mouse blastocysts hatch *in vitro* by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophoctoderm // *Dev. Biol.* 1986. V. 114. № 1. P. 42–52.
- Peters D.D., Marschall S., Mahabir E. et al. Risk assessment of mouse hepatitis virus infection via *in vitro* fertilization and embryo transfer by the use of zona-intact and laser-microdissected oocytes // *Biol. Reprod.* 2006. V. 74. № 2. P. 246–252.
- Pluck A., Klasen C. Surgical techniques for the generation of mutant mice // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 561. P. 231–243.
- Rall W., Meyer T. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos // *Theriogenology.* 1989. V. 31. P. 683–692.
- Rankin T., Soyol S., Dean J. The mouse *zona pellucida*: folliculogenesis, fertility and preimplantation development // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000. V. 163. P. 21–25.
- Ringleb J., Rohleder M., Jewgenow K. Impact of feline *zona pellucida* glycoprotein B-derived synthetic peptides on *in vitro* fertilization of cat oocytes // *Reproduction.* 2004. V. 127. № 2. P. 179–186.
- Rink K., Delacrétaz G., Salathé R.P. et al. Non-contact microdrilling of mouse *zona pellucida* with an objective-delivered 1.48-microns diode laser // *Lasers Surg. Med.* 1996. V. 18. № 1. P. 52–62.
- Saragusty J., Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification // *Reproduction.* 2011. V. 141. P. 1–19.
- Schwartz P., Magerkurth C., Michelmann H. W. Scanning electron microscopy of the *zona pellucida* of human oocytes during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) // *Hum. Reprod.* 1996. V. 11. P. 2693–2696.
- Senger P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition. 2nd revised edition. Current Conceptions, Inc. Washington State University Research & Technology Park, Pullman, Washington, 2003.
- Shulman A., Feldman B., Madgar I. et al. In-vitro fertilization treatment for severe male factor: the fertilization potential of immotile spermatozoa obtained by testicular extraction // *Hum. Reprod.* 1999. V. 14. № 3. P. 749–752.
- Sifer C., Sellami A., Poncelet C. et al. A prospective randomized study to assess the benefit of partial *zona pellucida* digestion before frozen-thawed embryo transfers // *Hum. Reprod.* 2006. V. 21. № 9. P. 2384–2389.
- Sills E.S., Palermo G.D. Human blastocyst culture in IVF: current laboratory applications in reproductive medicine practice // *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2010. V. 51. № 3. P. 441–445.
- Slade N.P., Takeda T., Squires E.L. et al. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos // *Theriogenology.* 1985. V. 24. № 1. P. 45–58.
- Soupart P., Strong P.A. Ultrastructural observations on polyspermic penetration of *zona pellucida*-free human oocytes inseminated *in vitro* // *Fertil. Steril.* 1975. V. 26. № 6. P. 523–537.
- Stringfellow D.A. Recommendation for the sanitary handling of *in vivo*-derived embryos // *Manual of the International Embryo Transfer Society.* 1998. P. 79–84.
- Suzuki H., Yorozu K., Watanabe T. et al. Rederivation of mice by means of *in vitro* fertilization and embryo transfer // *Exp. Anim.* 1996. V. 45. № 1. P. 33–38.
- Tao T., Valle A.D. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2008. V. 25. P. 287–296.

- Turetsky T., Aizenman E., Gil Y. et al. Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis // *Hum. Reprod.* 2008. V. 23. № 1. P. 46–53.
- Turner K., Horobin R.W. Permeability of the mouse *zona pellucida*: a structure-staining-correlation model using coloured probes // *J. Reprod. Fertil.* 1997. V. 111. № 2. P. 259–265.
- Van Den Abbeel E., Van Steirteghem A. *Zona pellucida* damage to human embryos after cryopreservation and the consequences for their blastomere survival and in-vitro viability // *Hum. Reprod.* 2000. V. 15. № 2. P. 373–378.
- Van Keuren M.L., Saunders T.L. Rederivation of transgenic and gene-targeted mice by embryo transfer // *Transgenic Res.* 2004. V. 13. № 4. P. 363–371.
- Van Soom A., Wrathall A.E., Herrler A., Nauwynck H.J. Is the *zona pellucida* an efficient barrier to viral infection? // *Reprod. Fertil. Dev.* 2010. V. 22. P. 21–31.
- Van Soom A., Nauwynck H.J., Wrathall A.E. Scientific foundations of the epidemiological safety of embryo transfer // *Manual of the International Embryo Transfer Society: a Procedural Guide* <http://www.publish.csiro.au/journals/rfd> and General Information for the Use of Embryo Transfer Technology, Emphasizing Sanitary Procedures. 2009. 4th edn. P. 13–40.
- Vanroose G., Nauwynck H., Van Soom A. et al. Structural aspects of the *zona pellucida* of *in vitro*-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study // *Biol. Reprod.* 2000. V. 62. P. 463–469.
- Vazquez M.H., Phillips D.M., Wassarman P.M. Interaction of mouse sperm with purified sperm receptors covalently linked to silica beads // *J. Cell. Sci.* 1989. V. 92. № 4. P. 713–722.
- Verheyen G., Tournaye H., Staessen C. et al. Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia // *Hum. Reprod.* 1999. V. 14. № 9. P. 2313–2319.
- Wassarman P.M. *Zona pellucida* glycoproteins // *Annu. Rev. Biochem.* 1988. V. 57. P. 415–442.
- Whittingham D.G. Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at 196 degrees C // *J. Reprod. Fertil.* 1977. V. 49. № 1. P. 89–94.
- Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to K196 8C and K269 8C // *Science.* 1972. V. 178. P. 411–414.
- Wiemer K.E., Garrisi J., Steuerwald N. et al. Beneficial aspects of co-culture with assisted hatching when applied to multiple-failure in-vitro fertilization patients // *Hum. Reprod.* 1996. V. 11. № 11. P. 2429–2433.
- Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing // *Life Sciences.* 1972. V. 11. P. 1071–1079.
- Wimsatt W.A. Some comparative aspects of implantation // *Biol. Reprod.* 1975. V. 12. P. 1–40.

Coats of Preimplantation Mammalian Embryos as a Target of Reproductive Technologies

I. N. Rozhkova^a, E. Y. Brusensev^a, and S. Ya. Amstislavskii^{a,b}

^a Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Abstract—The structure and function of the mammalian oocyte and preimplantation embryo coverings are described in this review. The integrity of embryonic coverings is the main prerequisite for the success of such technology as preimplantation embryo freezing and, especially, for successful rederyivation. On the other hand, results of *in vitro* fertilization and, sometimes, the results of embryo freezing are improved after perforation of the oocyte/embryonic coverings. Modern reproductive technologies focusing on oocyte/embryonic coverings, such as preimplantation embryo freezing/cryopreservation, *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injection, assisted hatching, immunocontraception, and rederyivation, are reviewed. Application of these technologies to different mammalian species is discussed with a special emphasis on the oocytes/preimplantation embryos coverings.

Keywords: embryonic coats, cryopreservation, IVF, assisted hatching, immunocontraception, rederyivation

УДК 581.151

СТАБИЛЬНОСТЬ РАЗВИТИЯ ЛИСТА *PISUM SATIVUM* L. ПРИ ДЕЙСТВИИ ФОРМАЛЬДЕГИДА В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ ДОЗ

© 2012 г. Е. А. Ерофеева

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23

E-mail: ele77785674@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.03.11 г.

Окончательный вариант получен 04.05.11 г.

Изучено влияние формальдегида в широком диапазоне доз на стабильность развития третьего листа гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Стабильность развития листа оценивали по изменению величины направленной асимметрии правого и левого листочков, обусловленному флуктуирующей асимметрией данных морфологических структур. При действии токсиканта на исследованный показатель был выявлен парадоксальный эффект. В минимальных из исследованных концентраций формальдегид нарушал стабильность развития листа, что выражалось в возрастании асимметрии правого и левого листочков. В области средних концентраций токсиканта асимметрия была меньше контрольного уровня, что свидетельствовало об увеличении стабильности развития листа гороха. Максимальные исследованные концентрации формальдегида, близкие к сублетальным, вновь снижали стабильность развития листа гороха и приводили к возрастанию асимметрии его листочков по сравнению с контролем.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., лист, асимметрия, формальдегид, парадоксальный эффект.

Стабильность развития характеризует способность организма поддерживать траекторию развития в определенных границах (Захаров, 1987). В качестве меры стабильности развития билатеральных морфологических структур растений широко используется флуктуирующая асимметрия, под которой понимают случайные незначительные отклонения от симметричного состояния (Захаров и др., 2001) вследствие стохастичности молекулярных процессов, обеспечивающих экспрессию генов (онтогенетического шума) (Leamy, Klingenberg, 2005). Флуктуирующая асимметрия, имеющая ненаследственный характер, наблюдается и на фоне наследственных типов асимметрии, таких как антисимметрия и направленная асимметрия (Захаров, 1987). Известно, что величина флуктуирующей асимметрии возрастает при действии любых средовых стресс-факторов (Захаров и др., 2001; Hoffman, Woods, 2003). В связи с этим флуктуирующая асимметрия листа различных видов растений широко используется для оценки уровня загрязнения окружающей среды (Гелашвили и др., 2004). В то же время в последние годы в области токсикологии накапливается все больше свидетельств о том, что кроме классических монотонных зависимостей “доза–эффект” (S-образных; экспоненциальных), достаточно часто встречаются немонотонные ответы, к которым, в частности, относятся гормезис (Kefford et al., 2008; Calabrese, Blain, 2009) и пара-

доксальные эффекты (Батян и др., 2009). Вопрос о том, могут ли подобные явления наблюдаться при действии различных приоритетных загрязняющих веществ на флуктуирующую асимметрию листа растения, до сих пор остается открытым. В настоящее время одним из приоритетных загрязнителей атмосферного воздуха и почвы в крупных городах является формальдегид, что обусловлено быстрым ростом автотранспортного парка (Белкина, 2008). В условиях экосистем урбанизированных территорий на растение действует целый комплекс поллютантов, что затрудняет анализ характера влияния отдельных веществ. Для изучения данного вопроса по сравнению с условиями урбоэкосистем более адекватными являются экспериментальные модели.

В связи с этим целью исследования было изучение стабильности развития листа гороха посевного (*Pisum sativum* L.) по изменению величины направленной асимметрии его листочков, обусловленному флуктуирующей асимметрией данных морфологических структур, при действии формальдегида в широком диапазоне доз в условиях эксперимента.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Семена гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта Альбумен в течение 5 суток проращивали на дистиллированной воде. После появления корешка проростки контрольной группы поме-

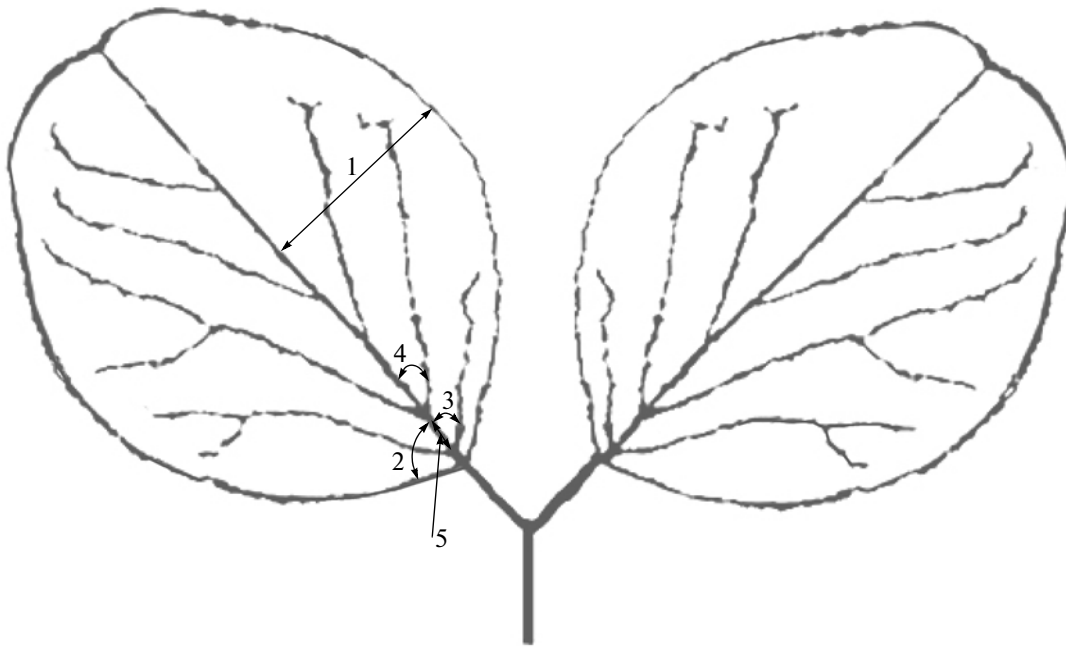


Рис. 1. Промеры правого и левого листочков третьего листа *P. sativum*:

1. 1/2 ширины листочка в районе 1/2 длины центральной жилки; 2. угол между центральной жилкой и нижним краем листа; 3. угол между центральной жилкой и первой снизу жилкой второго порядка; 4. угол между центральной жилкой и второй снизу жилкой второго порядка; 5. расстояние между основаниями первой и второй снизу жилок второго порядка.

щали в сосуды с питательным раствором Кнопа (1 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,25 мМ K_2HPO_4 ; 0,125 мМ MgSO_4 ; 0,25 мМ KNO_3) с добавлением микроэлементов по Хогланду. В 9 опытных группах питательный раствор кроме выше указанных компонентов содержал формальдегид в концентрации от $0,063 \times 10^{-2}$ до 0,16 г/л. Соседние концентрации различались в 2 раза. Диапазон концентраций был подобран в предварительных экспериментах таким образом, чтобы максимальные из использованных концентраций формальдегида были близкими к сублетальным — оказывали значительное токсическое действие на процесс роста побега, но не вызывали гибели растений.

В каждой группе *P. sativum* выращивали в 4 сосудах объемом 250 мл (по 6 растений в 1 сосуде; $n = 24$). Для предотвращения улетучивания формальдегида сосуды были закрыты крышками с небольшими отверстиями, через которые корешок проростков погружали в раствор. Растения контрольной и опытных групп выращивали на выше описанных растворах в течение 16 суток при температуре 20–22°C и семнадцатичасовом световом дне. Через каждые 4 суток растворы заменяли на свежие.

На семнадцатые сутки определяли асимметрию листочков полностью сформировавшегося третьего листа гороха. Лист *P. sativum* является сложным и у сорта Альбумен состоит из двух ли-

сточков. Листья *P. sativum* сразу после сбора сканировали и определяли асимметрию правого и левого листочков. В предварительных экспериментах было установлено, что для листочков *P. sativum* характерна направленная асимметрия — внутренняя (по отношению к плоскости симметрии листа) сторона каждого листочка всегда меньше наружной. Известно, что изменение величины наследственных типов асимметрии (направленной асимметрии, антисимметрии) билатеральных морфологических структур в популяциях одного вида обусловлены флуктуирующей асимметрией (Захаров, 1987). Кроме того, в предварительных экспериментах были подобраны 5 относительно независимых признаков листочка *P. sativum*. Корреляция между признаками отсутствовала, либо была слабой (коэффициент корреляции по Спирмену не превышал 0,20 при $p < 0,05$). Данные признаки использовали для оценки величины асимметрии листочков *P. sativum* при действии формальдегида (рис. 1).

Измерение признаков электронных изображений листочков гороха проводили с помощью программы Adobe Photoshore CS3. Интегральный показатель асимметрии листочка рассчитывали с помощью алгоритма нормированной разности:

$$\bar{A} = \frac{1}{mn} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \frac{|L_{ij} - R_{ij}|}{(L_{ij} + R_{ij})}$$

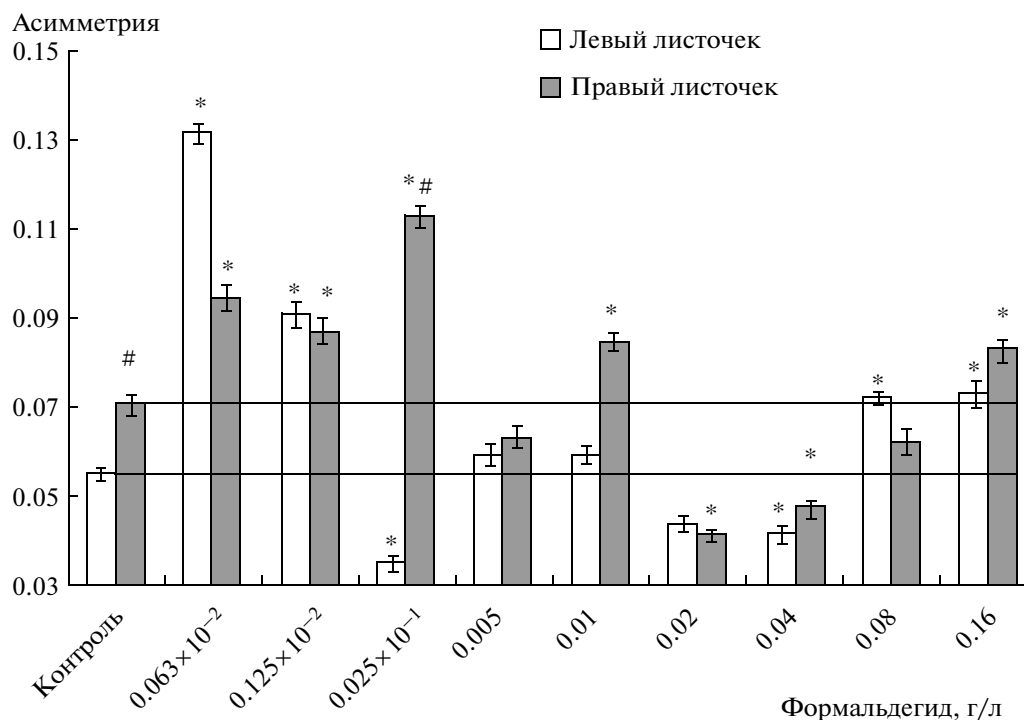


Рис. 2. Влияние формальдегида в широком диапазоне доз на асимметрию правого и левого листочков третьего листа *P. sativum* ($Me \pm S_{Me}$).

Примечание: * – различия статистически значимы по отношению к асимметрии данного листочка в контрольной группе при $p < 0.05$; # – различия статистически значимы по отношению к асимметрии левого листочка этой же группы при $p < 0.05$.

где: L_{ij} и R_{ij} значение j -го признака у i -го листочка, соответственно, слева и справа от плоскости симметрии (Захаров и др., 2000).

При этом величину флуктуирующей асимметрии листочков, наблюдающуюся на фоне направленной асимметрии, не выделяли. В связи с этим, в дальнейшем в статье используется термин “асимметрия листочка”. При этом подразумевается, что различия уровня направленной асимметрии между правыми (или левыми) листочками третьего листа растений разных групп обусловлены величиной их флуктуирующей асимметрии.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программ БИОСТАТИСТИКА 4.03 и STATISTICA 6.0. Для статистического анализа использовали непараметрические тесты Крускала-Уоллиса, Ньюмена-Кейлса и Уилкоксона, поскольку с помощью критерия Шапиро-Уилка было установлено, что выборочное распределение в ряде групп отличалось от нормального. На графиках представлены медианы и их ошибки. При проведении корреляционного анализа рассчитывали непараметрический коэффициент корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В наиболее низких из исследованных концентраций (0.063×10^{-2} – 0.125×10^{-2} г/л) формальдегид вызывал увеличение асимметрии правого и левого листочков *P. sativum* по сравнению с контрольным уровнем (рис. 2). Однако при дальнейшем возрастании концентрации токсиканта до 0.02–0.04 г/л вместо ожидаемого усугубления нарушения стабильности развития листа *P. sativum*, напротив, отмечалось уменьшение асимметрии правого и левого листочков на 30–40% по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы (рис. 2). И, наконец, в области наиболее высоких из исследованных концентраций (0.08–0.016 г/л) формальдегид вновь вызывал увеличение асимметрии сначала у левого листочка, затем – у правого (рис. 2).

С помощью корреляционного анализа по Спирмену было установлено, что между асимметрией правого и левого листочков существует сильная положительная корреляция ($r = 0.81$; $p = 0.010$). В то же время в контрольной и одной из опытных групп (0.005 г/л) величины асимметрии правых и левых листочков *P. sativum* статистически значимо различались.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследования показали, что при увеличении концентрации формальдегида в растворе величина асимметрии правого и левого листочков третьего листа *P. sativum* изменялась не монотонно. Наблюдалось развитие так называемого парадоксального эффекта. Известно, что проявление парадоксальных эффектов сводится к следующему: по мере уменьшения дозы или концентрации воздействующего яда токсичность его увеличивается, и наоборот: при увеличении дозы – эффект уменьшается (Батян и др., 2009). Парадоксальные эффекты выглядят провалами на кривых “доза-эффект” (Булатов и др., 2002). В нашем случае формальдегид в небольших дозах оказывал токсическое действие и приводил к увеличению асимметрии листочков *P. sativum*, в диапазоне средних доз токсичность не проявлялась и стабильность развития морфологических структур листа *P. sativum* в опытных группах даже превышала контрольный уровень. При действии наиболее высоких из исследованных доз формальдегида вновь отмечалось токсическое действие, выражавшее в возрастании асимметрии правого и левого листочков *P. sativum*. Таким образом, в зависимости от дозы формальдегид мог приводить как к снижению стабильности развития морфологических структур листа, так и к увеличению этого показателя, либо не вызывать никакого эффекта.

Полученные нами данные согласуются с результатами некоторых авторов, свидетельствующих о том, что не всегда загрязнение окружающей среды приводит к нарушению стабильности развития различных организмов. Отсутствие увеличения флуктуирующей асимметрии или даже сниженное данного показателя было продемонстрировано при действии химического загрязнения на растения (Ambro-Rappe et al., 2007; Ерофеева и др., 2009), на млекопитающих (Гилева, Косарева, 1994) и насекомых (Leamy et al., 1999), антропогенной нагрузки на амфибий (Вершинин и др., 2007). Возможно, что одной из причин выше перечисленных фактов может служить немонотонный характер зависимостей доза–эффект, одним из проявлений которого являются парадоксальные эффекты.

Для объяснения отсутствия нарушения стабильности развития при действии антропогенной нагрузки высказывались предположения о влиянии стабилизирующего отбора, отсекающего маргинальные варианты индивидуального развития при значительном техногенном загрязнении, в результате чего могло наблюдаться уменьшение дисперсии признаков и снижение среднего значения флуктуирующей асимметрии в популяции (Гилева, Косарева, 1994). При действии формальдегида на стабильность развития листа *P. sativum* в

условиях эксперимента влияние отбора исключено, поскольку выживали все растения опытных и контрольной групп. Поэтому логично предположить, что уменьшение асимметрии обусловлено процессами фенотипической адаптации у *P. sativum*.

В настоящее время механизмы, лежащие в основе немонотонных зависимостей “доза-эффект” при действии различных токсикантов, неизвестны (Батян и др., 2009). Возможно, уменьшение асимметрии листа *P. sativum* в области средних из исследованных концентраций формальдегида обусловлено повышением активности защитных систем растения до уровня, не только компенсирующего токсическое действие поллютанта, но и увеличивающего стабильность морфогенеза листа. Минимальные исследованные концентрации токсиканта еще не способны вызвать такую активацию, а в области максимальных исследованных концентраций, близких к сублетальным, уже начинается “срыв” адаптационных возможностей растения и нарушение стабильности развития листа.

Известно, что развитие формы листа растений, в том числе и его симметрии, контролируется рядом генов, которые изучены преимущественно у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. К ним относятся такие гены как *AS1*, *AS2*, *CP3*, *AN1* и др. (Semiarti et al., 2001; Кирпичева, Соколов, 2009). Повышение стабильности развития листа у *P. sativum* при действии формальдегида может быть обусловлено снижением флуктуаций молекулярных процессов, лежащих в основе экспрессии подобных генов. Возможными механизмами данного эффекта может быть увеличение активности ферментов детоксикации формальдегида, например глутатионзависимой формальдегиддегидрогеназы, обеспечивающей связывание токсиканта с глутатионом (Díaz et al., 2003), а также антиоксидантной системы, препятствующей повреждению белков активными формами кислорода (Полесская, 2007).

Таким образом, на основании выше сказанного можно заключить, что формальдегид в широком диапазоне доз вызывал немонотонное изменение стабильности развития третьего листа *P. sativum*, оцененную по изменению величины направленной асимметрии правого и левого листочков, обусловленному флуктуирующей асимметрией данных морфологических структур. При действии токсиканта на исследованный показатель был выявлен парадоксальный эффект. В минимальных из исследованных концентраций формальдегид нарушал стабильность развития листа, что выражалось в возрастании асимметрии правого и левого листочков. В области средних концентраций токсиканта асимметрия была меньше контрольного уровня, что свидетельствовало об увеличении стабильности развития листа гороха. Максимальные исследованные концен-

трации формальдегида, близкие к сублетальным, вновь снижали стабильность развития листа гороха и приводили к возрастанию асимметрии его листочков по сравнению с контролем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батян А.Н., Фрумин Г.Т., Базылев В.Н. Основы общей и экологической токсикологии. СПб.: СпецЛит., 2009. 352 с.
- Белкина Т.Д. Состояние городов России 2008. М.: "Город-Регион-Семья", 2008. 146 с.
- Булатов В.В., Хахаев Т.Х., Дикий В.В. и др. Проблема малых и сверхмалых доз в токсикологии. Фундаментальные и прикладные аспекты // Российский химический журнал. 2002. Т. XLVI. № 6. С. 58–62.
- Вершинин В.Л., Гилева Э.А., Готов Н.В. Флуктуирующая асимметрия мерных признаков у остромордой лягушки: методические аспекты // Экология. 2007. № 1. С. 75–77.
- Гелашвили Д.Б., Чупрунов Е.В., Иудин Д.И. Структурные и биоиндикационные аспекты флуктуирующей асимметрии билатерально-симметричных организмов // Журнал общей биологии. 2004. Т. 65. № 5. С. 433–441.
- Гилева Э.А., Косарева Н.Л. Уменьшение флуктуирующей асимметрии у домашних мышей на территориях, загрязненных химическими и радиоактивными мутагенами // Экология. 1994. № 3. С. 94–97.
- Ерофеева Е.А., Сухов В.С., Наумова М.М. Двухфазная зависимость некоторых эколого-морфологических и биохимических параметров листовой пластинки березы повислой от уровня автотранспортного загрязнения // Поволжский экологический журнал. 2009. № 4. С. 50–57.
- Захаров В.М., Чубинишвили А.Т., Дмитриев С.Г. и др. Здоровье среды: Практика оценки. М.: Центр экологической политики России, 2000. 318 с.
- Захаров В.М. Асимметрия животных. М.: Наука, 1987. 216 с.
- Захаров В.М., Жданова Н.П., Кирик Е.Ф. и др. Онтогенез и популяция: оценка стабильности развития в природных популяциях // Онтогенез. 2001. Т. 32. № 6. С. 40–421.
- Курпичева И.В., Соколов И.Д. Экспрессия генов AN1, AN3, ASI, CP3 в листьях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Науковий вісник ЛНАУ. 2009. № 8. С. 26–32.
- Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: КДУ, 2007. 140 с.
- Ambo-Rappe R., Lajus D.L., Schreider M.J. Translational Fluctuating Asymmetry and Leaf Dimension in Seagrass, *Zostera capricorni* Aschers in a Gradient of Heavy Metals // Environmental Bioindicators. 2007. V. 2. I. 2. P. 99–116.
- Calabrese E.J., Blain R.B. Hormesis and plant biology // Environmental Pollution. 2009. V. 157. P. 42–48.
- Díaz M., Achkor H., Titarenko E., Martinez M.C. The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid // FEBS Letters. 2003. V. 543. № 1–3. P. 136–139.
- Hoffmann A.A., Woods R.E. Associating environmental stress with developmental stability: problems and patterns // See Polak. 2003. P. 387–401.
- Kefford B.J., Zaluzniak L., Warne M.St.J., Nuggegod D. Is the integration of hormesis and essentiality into ecotoxicology now opening Pandora's Box? // Environmental Pollution. 2008. V. 151. № 3. P. 516–523.
- Larry J., Leamy I., Klingenberg C.P. The genetics and evolution of fluctuation asymmetry // Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2005. V. 36. P. 1–21.
- Leamy L.J., Doster M.J., Huet-Hudson Y.M. Effects of methoxychlor on directional and fluctuating asymmetry of mandible characters in mice // Ecotoxicology. 1999. V. 8. P. 63–71.
- Semiarti E., Ueno Y., Tsukaya H., Iwakawa H., Machida C., Machida Y. The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves // Development. 2001. V. 128. P. 1771–1783.

Developmental Stability of a Leaf of *Pisum Sativum* L. under the Influence of Formaldehyde in a Wide Range of Doses

E. A. Erofeeva

Nizhni Novgorod State University, Nizhni Novgorod, 603950 Russia
e-mail: ele77785674@yandex.ru

Abstract—The influence of formaldehyde in a wide range of doses on the stability of development of the third leaf of pea (*Pisum sativum* L.) was studied. The developmental stability of the leaf was assessed by the change in the value of the directional asymmetry of the right and left leaflets caused by the fluctuating asymmetry of these morphological structures. When subjected to a toxic agent, the studied parameter exhibited a paradoxical effect. In minimum studied concentrations, formaldehyde disturbed stability of leaf development, which was manifested in an increase in the asymmetry of the right and left leaflets. At medium concentrations of the toxicant, the asymmetry was less than the control level, which indicated an increase in the developmental stability of the pea leaf. Maximum studied concentrations of formaldehyde, close to sublethal, again reduced the stability of development of the pea leaf and led to an increase in the asymmetry of its leaflets compared with the controls.

Keywords: *Pisum sativum* L., leaf, asymmetry, formaldehyde, paradoxical effect

УДК 591

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ КОМПЛЕКСА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ БЕЛКОВЫХ ИНГИБИТОРОВ В ГРЕНЕ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

© 2012 г. Д. В. Ярыгин*, Н. О. Минькова*, Ю. Б. Филиппович**

*ФГБОУ ВПО Московский государственный гуманитарный университет имени М.А. Шолохова
109240 Москва, ул. Верхняя Радищевская, д. 16–18

** ФГБОУ ВПО Московский педагогический государственный университет
129278 Москва, ул. Кибальчича, д. 6
E-mail: den282@mail.ru

Поступила в редакцию 02.07.09 г.
Окончательный вариант получен 17.02.12 г.

Исследована внутриклеточная локализация сериновых, цистеиновых и аспартильных протеиназ и их белковых ингибиторов в грена тутового шелкопряда в постдиапаузный период ее эмбрионального развития. Протеолитическая активность аспартильных и цистеиновых протеиназ обнаружена в лизосомальной, митохондриальной и ядерной фракциях грены. Активность сериновых протеаз обнаружена в субклеточных фракциях грены 4 дня постдиапаузного развития. Показано, что активность белковых ингибиторов и конкретных пептидогидролаз в субклеточных фракциях обеспечивает согласованность и тонкую регуляцию функционирования протеолитического комплекса ферментов.

Ключевые слова: субклеточные фракции, пептидогидролазы, белковые ингибиторы, грена, тутовый шелкопряд.

Внутриклеточная локализация протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов в тканях и органах животных изучена в той или иной степени (Коновалов, 1986; Немова, 1996; Ohshita, Kido, 1995; Zhivotovsky et al., 1995; Chapman et al., 1997). Однако, эти работы, в основном, сосредоточены на исследовании субклеточных фракций тканей позвоночных животных. Установлено, что белковые ингибиторы позвоночных локализованы в клетке в зависимости от выполняемых функций в ядерной, митохондриальной и лизосомальной фракциях, в эндоплазматическом ретикулуме, цитозоле, плазматической мембране и в других субклеточных структурах (Куцый и др., 1999; Vasilev et al., 1991; Spiess et al., 1994; Gburek et al., 1995; Wakayama, Iseki, 1997; Fabra, Cerdà, 2004).

Данные о субклеточном распределении протеолитических ферментов и белковых ингибиторов в тканях и органах насекомых крайне ограничены (Cho et al., 1999; Gan et al., 2001; Yamahama et al., 2003; Zhao et al., 2005; Yang et al., 2006, Yang et al., 2007). Исследование динамики активности пептидогидролаз и их белковых ингибиторов у насекомых в процессе их развития демонстрирует определяющую роль белковых ингибиторов протеиназ в регуляции протеолиза в онтогенезе насе-

комых (Ярыгин и др., 2001). Существенную информацию о функциональной роли белковых ингибиторов предоставляет изучение субклеточной локализации пептидогидролаз и их белковых ингибиторов.

В настоящей работе предпринято исследование субклеточной локализации пептидогидролаз и их белковых ингибиторов в грена тутового шелкопряда.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для выделения субклеточных фракций служила грена гибрида М7 × М6, представленная Миргородским гренажным заводом (Украина, Полтавская обл.), находящаяся на 4 дне постдиапаузного развития (бластокинез). Грена в этот период развития характеризуется наличием двух типов клеток – клеток развивающегося зародыша и желточных клеток. Однако основную массу клеток на данной стадии развития грены представляют желточные или питающие клетки, запасные вещества которых интенсивно используются в процессе роста и дифференцировки зародыша.

Субклеточное фракционирование грены тутового шелкопряда осуществляли методом диффе-

ренициального центрифугирования (Банников, 1983). Все операции по выделению из грены субклеточных фракций проводили при 0–2°C.

Для получения субклеточных фракций навеску грены (25 г) гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса в 100 мл 0.01 М трис-НСl буфера (рН 7.3), содержащего 0.32 М сахарозы, 5 мМ СаСl₂, 3 мМ МgСl₂ и 5 мМ КСl. Гомогенат фильтровали через капроновую ткань для отделения хориона, после чего фильтрат центрифугировали при 200 g в течение 10 мин на центрифуге К-23 (“Janetzki”, Германия). Полученный осадок (клеточные обломки) отбрасывали, а из надосадочной жидкости осаждали ядра, центрифугированием при 900 g в течение 10 мин. Осадок (грубая ядерная фракция) трижды промывали 0.01 М Трис-НСl (рН 7.3) буфером, содержащем 0.127 М NaСl, 5 мМ СаСl₂, 3 мМ МgСl₂ и 5 мМ КСl (буфер В), каждый раз центрифугируя полученную суспензию при 900 g в течение 15 мин. Промывные воды отбрасывали, а осадок представлял собою очищенную ядерную фракцию.

Остальные субклеточные фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования объединенного супернатанта, полученного после отделения грубой ядерной фракции. Осадок митохондриальной фракции собирали после центрифугирования супернатанта при 4500 g в течение 10 мин, а лизосомальной фракции — при 20000 g в течение 60 мин. Каждую субклеточную фракцию трижды отмывали от сахарозы буфером В.

Для освобождения от сахарозы постлизосомальной фракции (супернатант, полученный после выделения лизосомальной фракции), ее аликвоту подвергали диализу в течение 12 часов против 0.01 М трис-НСl буфера, рН 7.3.

Разрушение субклеточных фракций проводили путем двукратного замораживания и оттаивания. Полученные суспензии центрифугировали при 15000 g в течение 30 мин, используя в дальнейшем супернатанты в качестве исходных препаратов для выявления в них активности протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов.

Чистоту полученных субклеточных фракций контролировали измерением в них активности маркерных ферментов: в митохондриальной фракции — цитохром-с-оксидазы, в лизосомальной — кислой фосфатазы (Кривченкова, 1977, Морозова, Безбородова, 1972).

Содержание белка в экстрактах субклеточных фракций определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Общую протеолитическую активность растворимых белков грены тутового шелкопряда определяли по методу Ансона (Anson, 1939), модифицированному для выявления активности пептидогидролаз в тканях и органах тутового

шелкопряда (Клунова и др., 1987). С этой целью к 0.15 мл 1%-ного раствора гемоглобина в фосфатно-цитратном буфере (рН 2.2–7.2), либо 0.5%-ного раствора казеина в 0.2 М боратном буфере (рН 7.2–8.0) и в 0.05М боратном буфере (рН 9.0–10.2) добавляли 0.2 мл ферментного экстракта, содержащего до 300 мкг белка. Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 16 ч, а затем реакцию останавливали добавлением к реакционной смеси 0.24 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). В контрольных вариантах ТХУ добавляли к смеси одновременно с ферментным экстрактом. Полученные смеси помещали на 10 мин в холодильную камеру для формирования осадка, который отделяли центрифугированием при 8000 g. К 0.3 мл полученного супернатанта добавляли 0.6 мл 0.5М NaOH и 0.18 мл реактива Фолина (0.7 н.). Через 5 мин определяли оптическую плотность реакционной смеси при 750 нм. Измерение активности трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ проводили спектрофотометрическим методом, описанным в руководстве “Preparations for biochemistry” фирмы “Merck” (Германия), используя в качестве субстратов растворы N-бензоил-D,L-аргинил-п-нитроанилида (BAPNA) и сукцинил-D,L-фенилаланин-п-нитроанилида (SUPHERA) в диметилформамиде из расчета 5 мг/мл. За единицу протеолитической активности грены тутового шелкопряда принимали такое количество ферментного препарата, которое вызывало увеличение оптической плотности на 0.01 при длине волны 750 нм в случае применения природных субстратов и при длине волны 405 нм в случае использования синтетических субстратов.

Для определения подклассовой принадлежности протеолитических ферментов, выявленных в субклеточных фракциях в грене тутового шелкопряда, использовали ингибиторный анализ с применением специфических ингибиторов протеиназ соответствующих подклассов: в качестве ингибитора сериновых протеиназ — фенилметилсульфонилфторида, цистеиновых протеиназ — п-хлормеркурибензоата, аспартильных протеиназ — пепстатина и металлопротеиназ — этилендиаминтетраацетата. Концентрация всех вышеперечисленных ингибиторов составляла 1×10^{-3} М. Оценивая влияние тех или иных ингибиторов, вычисляли долю (% от контроля) остаточной активности фермента в присутствии соответствующего эффектора.

О наличии эндогенных ингибиторов пептидогидролаз в субклеточных фракциях грены тутового шелкопряда судили по торможению активности соответствующих коммерческих препаратов протеиназ (папаина, пепсина, трипсина и химотрипсина) в присутствии ферментных экстрактов грены. Эндогенную ингибиторную активность по отношению к протеолитическим ферментам

(трипсину и химотрипсину) определяли спектрофотометрически по расщеплению синтетических субстратов BAPNA и SUPHERA. Эксперимент проводили с использованием трех серий проб. Все серии и пробы были унифицированы по объемам и количеству одноименных компонентов, времени и условиям инкубации. Первая серия представляла собою контроль, в котором активность коммерческого препарата фермента проявлялась в исходном варианте. Пробы содержали 0.3 мл буфера с соответствующим значением pH, 0.15 мл раствора модельного субстрата (500 мкг) и 0.05 мл раствора фермента (15 мкг). Опытные пробы второй серии, кроме перечисленных компонентов, содержали 0.2 мл исходного экстракта (0.1 мг белка). На образование комплекса фермент-ингибитор отводилось 20 мин, по истечении указанного времени в инкубационную среду вносили раствор субстрата и пробы выдерживали 40 мин при комнатной температуре. Третья серия проб представляла собой контроль, позволяющий тестировать возможную активность эндогенных протеаз по отношению к вносимым субстратам и маскирующим действие ингибитора. Пробы третьей серии содержали буфер, субстрат и исходный белковый экстракт. Варианты каждой серии имели собственные контроли на реагенты. Реакцию останавливали добавлением к инкубационной среде 1.5 М раствора уксусной кислоты и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 405 нм. Активность эндогенных ингибиторов выражали либо в процентах от исходной активности коммерческого препарата, либо в условных единицах. За условную единицу принимали такое количество препарата ингибитора гренны, которое вызывало уменьшение оптической плотности инкубационной среды на 0.01. По этой же схеме определяли описанным выше методом Ансона активность белковых ингибиторов пепсина и папаина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение активности исследованных протеиназ и их белковых ингибиторов с оптимумом pH 3.0, 3.6, 6.2, 7.2, 8.6 и 9.0 по субклеточным фракциям гренны (рис. 1, 2), показывает существенные различия в уровне активности протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов между отдельными субклеточными фракциями яиц тутового шелкопряда, что свидетельствует о разнообразии функций, выполняемых ферментами и их ингибиторами в каждой из субклеточных структур.

Максимальный уровень протеолитической активности исследованных аспартильных, кислых и слабокислых цистеиновых протеиназ (оптимум pH 3.0, 3.6 и 6.2), основной функцией которых является деградация запасных белков, главным об-

разом присущ лизосомальной фракции гренны. Существенно меньший уровень активности характерен для ядерной и митохондриальной фракций гренны (рис. 1). В литературе имеются сведения о наличии лизосомальных цистеиновых и аспартильных протеиназ в яйцах насекомых (Иванов, 1986; Takahashi et al., 1993; Dittmer, Raikhel, 1997), а также об обнаружении цистеиновых протеиназ в ядерной и митохондриальной фракциях животных клеток (Назаров, 1993; Кущий и др., 1999), что полностью совпадает с результатами нашей работы. Присутствие пептидогидролаз в ядрах насекомых является достаточно хорошо установленным фактом. Так, охарактеризован протеолитический комплекс хроматина гренны, в составе которого обнаружены протеиназы с оптимумами pH 3.4 и 6.2. Установлено, что выявленные в хроматине ядра гренны пептидогидролазы, участвующие в регуляции активности генома, являются кислыми цистеиновыми протеиназами (Назаров, 1993).

Согласно литературным данным (Dittmer, Raikhel, 1997; Cho et al., 1999), лизосомальные цистеиновые и аспартильные протеиназы (катепсина-В-подобные, катепсина-Л-подобные и катепсина-Д-подобные протеиназы) участвуют в расщеплении запасных белков (вителлин) в эмбриогенезе насекомых. Так, катепсина-В-подобная протеиназа из *Aedes aegypti*, которая в виде предшественника синтезируется в жировом теле самок, в зрелых яйцах принимает участие в эмбриональной деградации вителлина (Cho et al., 1999), а катепсина-Л-подобная протеиназа, выделенная из яиц *Blattella germanica*, участвует в процессе эмбриогенеза в деградации вителлина и протеолитической активации своей проформы, локализованной в желточных гранулах питающих клеток яиц (Liu et al., 1996).

Наличие высокой активности аспартильных и цистеиновых протеиназ в митохондриальной фракции не является неожиданным фактом (рис. 1). Активность цистеиновых протеиназ была обнаружена в митохондриях желточных клеток артемии (Lu, Warner, 1991) и в митохондриях ооцитов сиговых рыб (Коновалов, 1986). Полученные нами результаты нельзя объяснить наличием возможной примеси лизосом в митохондриальной фракции, так как высокая активность кислой фосфатазы, которая обнаружена в лизосомальной фракции, не выявлена в митохондриях.

В последнее время появились сообщения о том, что митохондрии играют ключевую роль в апоптозе. Так, белок с молекулярной массой 50 кДа, являясь цистеиновой протеиназой, локализованной в митохондриях, в бесклеточной системе изолированных ядер вызывает конденсацию хроматина и межнуклеосомную фрагмента-

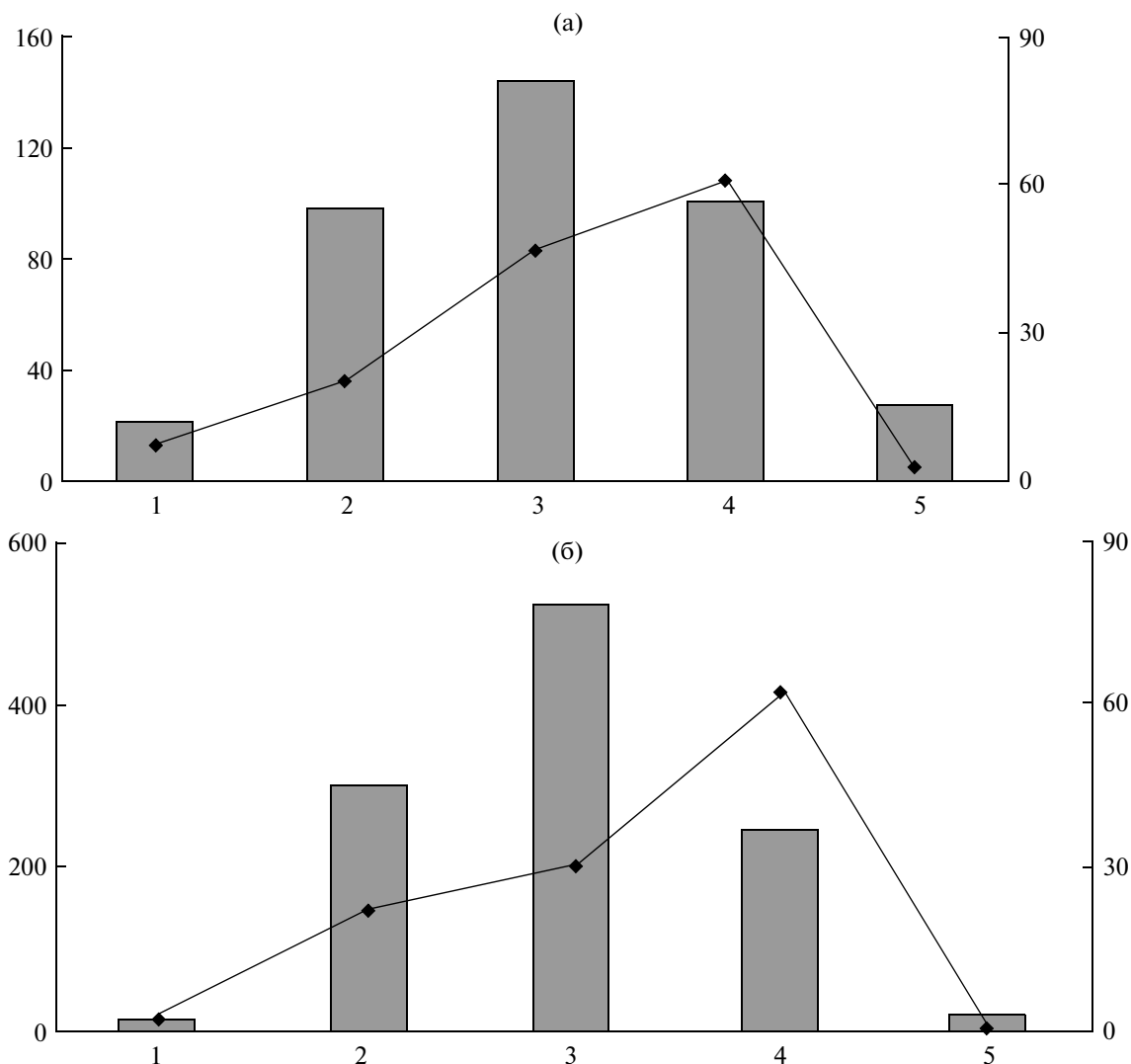


Рис. 1. Распределение активности пепсинободобных (оптимум рН 3.0) (а), тиоловых протеиназ (оптимум: б – рН 3.0, в – рН 3.6, г – рН 6.2, д – рН 8.6) и их белковых ингибиторов по субклеточным фракциям грены тутового шелкопряда. Здесь и на рис. 2: Линия – протеолитическая активность; столбики – активность ингибиторов. По оси ординат: слева – активность ингибиторов, справа – протеолитическая активность (усл. ед/мг белка); по оси абсцисс – субклеточные фракции: 1 – исходный гомогенат, 2 – ядерная фракция, 3 – митохондриальная фракция, 4 – лизосомальная фракция, 5 – постлизосомальная фракция.

цию ДНК, то есть индуцирует апоптоз (Куцый и др., 1999).

В отличие от аспартильных и цистеиновых протеиназ, активность сериновых протеаз не обнаружена в субклеточных фракциях грены 4 дня постдиапаузного развития (рис. 2, б, в), так как их основная активность проходит на конец эмбрионального развития насекомого. Исключение составляют лишь химотрипсиноподобные протеиназы (оптимум рН 7.2), активность которых обнаружена в постлизосомальной фракции (рис. 2, а).

Существенно, что белковые ингибиторы кислых пептидогидролаз локализованы в тех же компартаментах клетки, что и протеолитические фер-

менты. При этом активность белковых ингибиторов по отношению к активности соответствующего энзима имеет обратную корреляцию в каждой субклеточной фракции (рис. 1), что косвенно указывает на наличие функциональной связи между ними.

Известно, что в ядрах насекомых и млекопитающих обнаружены комплексы протеаза-ингибитор. Такие комплексы описаны для цистеиновых протеиназ (каспаз). Цистеиновая протеиназа связывается ковалентно с ингибитором через дисульфидную связь (Куцый и др., 1999). Высокая активность белковых ингибиторов аспартильных, цистеиновых и сериновых протеиназ в ядерной фракции грены (рис. 1, 2) свидетельствует на наш

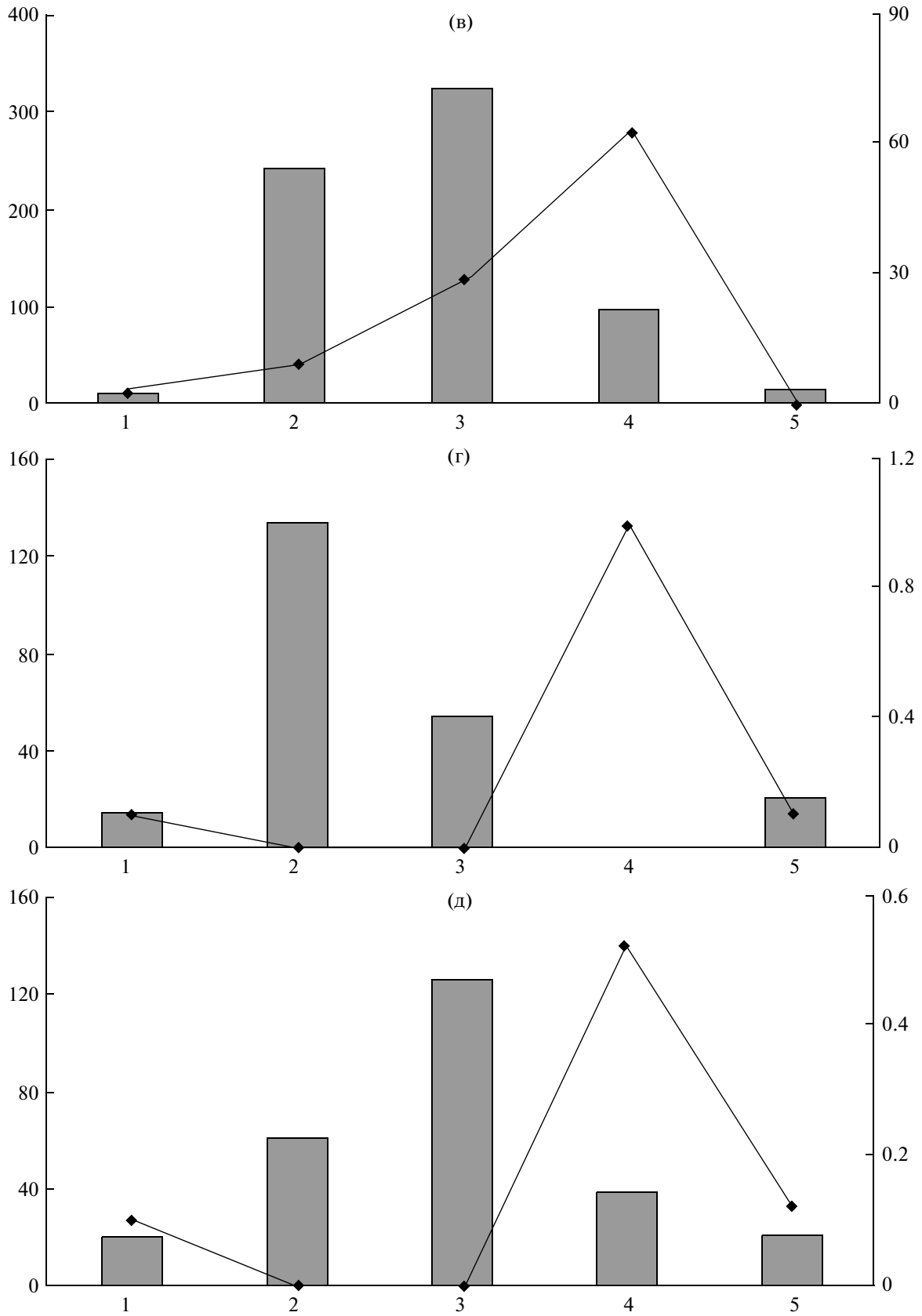


Рис. 1. Окончание.

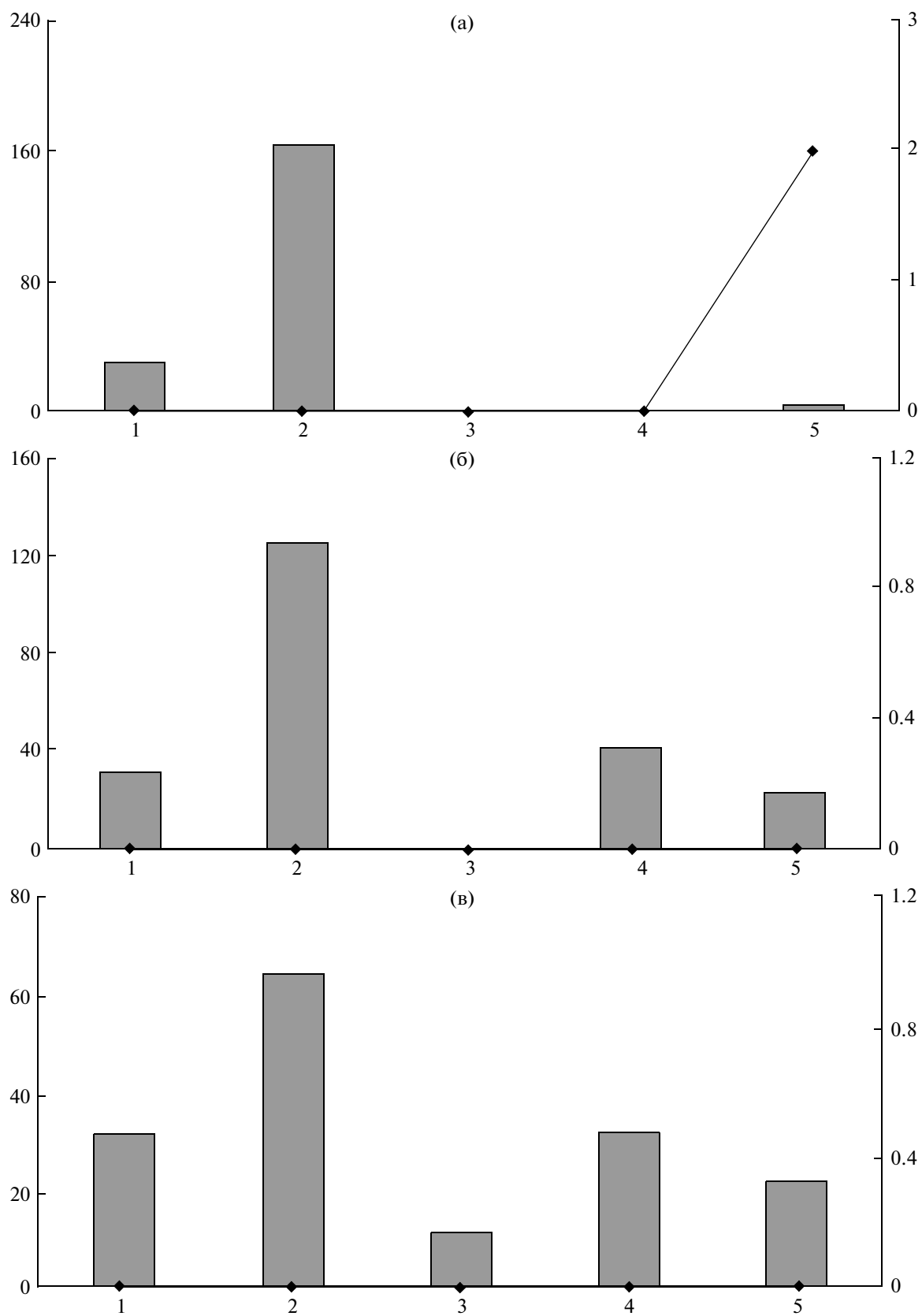


Рис. 2. Распределение активности химотрипсиноподобных (оптимум pH 7.2) (а), трипсиноподобных протеиназ (оптимум: δ – pH 6.2, σ – pH 9.0) и их белковых ингибиторов по субклеточным фракциям гены тутового шелкопряда.

взгляд, о возможном участии ингибиторов пептидогидролаз в поддержании структуры и целостности ядер, т.к. протеолитическое расщепление их структурных и функциональных белков приводит к нарушению структурной организации органелл, к разбалансировке упорядоченных биохимических реакций в них и в итоге к фрагментации ДНК и гибели клеток.

Таким образом, ядерные белковые ингибиторы протеаз грены тутового шелкопряда, возможно, принимают участие в регуляции механизмов процесса клеточной гибели (апоптоза).

Наличие высокой активности белковых ингибиторов цистеиновых и аспартильных протеиназ в митохондриальной фракции (рис. 1), по-видимому, связано с присутствием в этом компартменте соответствующих протеиназ и с защитой структурных и функциональных белков от протеолитического действия этих энзимов.

Локализация белковых ингибиторов протеиназ в лизосомальной фракции свидетельствует об участии этих белков в процессах регуляции гидролиза запасных белков желтка в ходе эмбрионального развития тутового шелкопряда. Так, высокий уровень активности пептидогидролаз в лизосомах, участвующих в деградации запасных белков, объясняется незначительной активностью белковых ингибиторов протеиназ в этих субклеточных структурах.

Таким образом, приведенные выше экспериментальные данные о субклеточной локализации цистеиновых, аспартильных и сериновых протеиназ и их белковых ингибиторов в грене тутового шелкопряда позволяют заключить, что основная функция белковых ингибиторов пептидогидролаз, состоящая в регуляции активности эндогенных протеиназ, реализуется в грене при осуществлении различных процессов, и, в том числе при защите внутриклеточных структурных и функциональных белков ядер и митохондрий от повреждающего действия протеиназ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банников В.М. Ферменты аминокислотного обмена и некоторые метаболически связанные с ними энзимы в эмбриогенезе тутового шелкопряда *Bombyx mori* L.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МПГИ, 1983. 16 с.
- Иванов В.Г. Белковый комплекс и протеолитические ферменты желточного содержимого грены тутового шелкопряда *Bombyx mori* L.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МПГИ, 1985. 14 с.
- Клунова С.М., Тарасенко Н.В., Киреева З.В. Изучение протеолитического комплекса ферментов в гемолимфе и шелкоотделительной железе тутового шелкопряда на заключительном этапе его личиночного развития // Биохимия насекомых. М.: МПГИ, 1987. С. 112–120.
- Коновалов Ю.Д. Свойства, локализация, роль и возможные пути регуляции активности протеиназ и аминотрансфераз в раннем онтогенезе рыб // Успехи соврем. биологии. 1986. Т. 101. № 3. С. 359–373.
- Кривченкова Р.С. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий // В кн. "Современные методы в биохимии" под ред. Ореховича В.Н. М.: Медицина, 1977. С. 47–49.
- Куцкий Н.П., Кузнецова Е.А., Газиев А.И. Участие протеаз в апоптозе // Биохимия. 1999. Т. 64. № 2. С. 149–163.
- Морозова В.П., Безбородова С.И. Кислая внеклеточная фосфомоноэстераза *Aspergillus clavatus* // Микробиология. 1972. Т. 12. № 3. С. 404–412.
- Назаров А.Ю. Характеристика протеолитического комплекса ферментов хроматина тутового шелкопряда *Bombyx mori* L.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МПГУ, 1993. 14 с.
- Немова Н.Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: КНЦ РАН, 1996. 104 с.
- Филиппович Ю.Б., Лантвега Т.Н., Никитина И.Л. Основы биохимии тутового шелкопряда. М.: Прометей, 1992. 306 с.
- Ярыгин Д.В., Клунова С.М., Филиппович Ю.Б. Исследование комплекса протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов в эмбриогенезе тутового шелкопряда // Онтогенез. 2001. Т. 32. № 4. С. 269–276.
- Anson M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gen. Physiol. 1939. V. 22. № 1. P. 79–82.
- Chapman H.A., Riese R.I., Shi G.P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology // Ann. Rev. Physiol. 1997. V. 59. P. 63–88.
- Cho W.L., Tsao S.M., Hays A.R., Walter R., Chen J.S., Shigirevskaya E.S., Raikhel A.S. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 19. P. 13311–13321.
- Dittmer N.T., Raikhel A.S. Analysis of the Mosquito lysosomal aspartic protease gene – an insect reousekeeping gene with fat body-enhanced expression // Insect Biochem. Molec. Biol. 1997. V. 27. № 4. P. 323–335.
- Fabra M., Cerdà J. Ovarian cysteine proteinases in the teleost *Fundulus heteroclitus*: Molecular cloning and gene expression during vitellogenesis and oocyte maturation // Mol. Reprod. Dev. 2004. V. 67. P. 282–294.
- Gan H., Wang Y., Jang H.B., Mita K., Kanost M.R. A bacteria-induced, intracellular serpin in granular hemocytes of *Manduca sexta* // Insect Biochem. and Molec. Biol. 2001. V. 31. № 9. P. 887–898.
- Gburek J., Osada J., Siekierka M., Warwas M. Clearance of chicken cystatin from the rat circulation // Compar. Biochem. Physiol. B. 1995. V. 112. № 4. P. 697–701.
- Liu X.D., Mccarron R.C., Nordin J.H. A cysteine protease that processes insect vitellin-purification and partial characterization of the enzyme and the proenzyme // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 52. P. 33344–33351.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Rangall R.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 2. P. 265–275.

- Lu J., Warner A.H. Immunodetection of thiol proteinase levels in various populations of *Artemia cysts* and during development // *Biochem. Cell. Biol.* 1991. V. 69. № 2–3. P. 96–101.
- Ohshita T., Kido H. Simple preparation of rat-brain lysosomes and their proteolytic properties // *Anal. Biochem.* 1995. V. 230. № 1. P. 41–47.
- Spiess E., Bruning A., Gack S., Ulbricht B., Spring H., Trefz G., Ebert T. Cathepsin B activity in Human lung-tumor cell-lines-ultrastructural – localization, pH sensitivity, and inhibitor status at the cellular – level // *J. Histochem. Cytochem.* 1994. V. 42. № 7. P. 917–929.
- Takahashi S.Y., Yamamoto Y., Shionoya Y., Kageyama T. Cysteine proteinase from the eggs of the Silkworm, *Bombyx mori* – identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing *in vivo* and *in vitro* // *J. Biochem.* 1993. V. 114. № 2. P. 267–272.
- Vasilev A.V., Gutkin D.V., Dankova T.G., Vorobeichik T.A., Tutelyan V.A. Content of endogenous inhibitors of thiol – dependent proteinases in subcellular – fractions of rat hepatocytes // *Voprosy meditsinskoi khimii.* 1991. V. 37. № 6. P. 89–91.
- Wakayama T., Iseki Sh. Expression and localization of urinary trypsin inhibitor in the rat embryo // *Acta Histochem. Cytochem.* 1997. V. 30. № 5–6. P. 557–565.
- Yamahama Y., Uto N., Tamotsu S., Miyata T., Yamamoto Y., Watabe S., Takahashi S.Y. In vivo activation of pro-form *Bombyx cysteine* protease (BCP) in silkworm eggs: localization of yolk proteins and BCP, and acidification of yolk granules // *J. Insect Physiol.* 2003. V. 49. № 2. P. 131–140.
- Yang X.M., Hou L.J., Dong D.J., Shao H.L., Wang J.H., Zhao X.F. Cathepsin B-like proteinase is involved in the decomposition of the adult fat body of *Helicoverpa armigera* // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2006. V. 62. № 1. P. 1–10.
- Yang X.M., Hou L.J., Dong D.J., Wang J.H., Zhao X.F. Expression and function of cathepsin B-like proteinase in larval hemocytes of *Helicoverpa armigera* during metamorphosis // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2007. V. 64. P. 164–174.
- Zhao X.F., An X.M., Wang J.H., Dong D.J., Du X.J., Sueda S., Kondo H. Expression of the *Helicoverpa* cathepsin B-like proteinase during embryonic development // *Arch. Insect biochem. Physiol.* 2005. V. 58. № 1. P. 39–46.
- Zhivotovsky B., Nicotera P., Orrenius S. Mechanisms of the multistage cleavage of chromatin in apoptosis // *Cell. Proliferat.* 1995. V. 28. № 4. P. 172.

Study of Intracellular Localization of the Proteolytic Enzyme Complex and Its Protein Inhibitors in Bombyx Grain

D. V. Yarygin^a, N. O. Minkova^a, and Yu. B. Filippovich^{†b}

^a Sholokhov Moscow State Humanitarian University, 109240, Moscow, Russia

^b Moscow State Pedagogical University, 129278, Moscow, Russia

e-mail: den282@mail.ru

Abstract—Intracellular localization of serine, cysteine and aspartate proteases, as well as their protein inhibitors, in bombyx grain in the postdiapause period of embryogenesis has been studied. Proteolytic activity of aspartate and cysteine proteases was found in lysosomal, mitochondrial, and nuclear fractions of grains. Serine protease activity was not observed in subcellular fractions of grains of the fourth day of postdiapause development. It has been shown that activities of protein inhibitors and certain peptide hydrolases in subcellular fractions provide consistent functioning and fine regulation of the proteolytic enzyme complex.

Keywords: subcellular fractions, peptide hydrolases, protein inhibitors, grain, bombyx

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ, МЕТАМОРФОЗ

УДК 593.73

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ И МЕТАМОРФОЗА *AURELIA AURITA* (CNIDARIA, SCYPHOZOA)

© 2012 г. Т. Д. Майорова, И. А. Косевич, О. П. Мелехова

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова

119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

E-mail: ikosevich@gmail.com

Поступила в редакцию 27.05.11 г.

Окончательный вариант получен 12.01.12 г.

Aurelia aurita – космополитичный вид сцифомедузы, основные закономерности строения и жизненного цикла которого хорошо известны. В настоящей работе проведено подробное исследование развития и строения планулы *A. aurita* до завершения ее метаморфоза. Прижизненные наблюдения и изучение гистологического строения планул в процессе оседания и метаморфоза показали, что внутренняя выстилка манубриума первичного полипа (соответствующая гастродерме) происходит из эктодермального слоя заднего конца планулы. Впервые проведено изучение пространственной и временной динамики распределения серотонин-эргических клеток с начальных стадий развития зародыша до формирования первичного полипа. Также прослежено распределение тирозинированного тубулина и нейрпептида RF-амида на разных стадиях развития *A. aurita*.

Ключевые слова: онтогенез, метаморфоз, морфогенез, нервная система, сцифоидные, *Aurelia aurita*.

ВВЕДЕНИЕ

Стрекающие (Cnidaria) рассматриваются как двухслойные, радиально симметричные животные, занимающие в соответствии со своим базовым планом строения положение, близкое к предковым формам многоклеточных животных (Догель, 1981; Brusca et al., 2003). Данные молекулярно-филогенетических исследований подтверждают эту точку зрения, подчеркивая, что стрекающие представляют собой сестринскую группу по отношению к билатерально-симметричным животным внутри всех многоклеточных (Medina et al., 2001). Следовательно, понимание эволюции развития внутри стрекающих представляет собой огромный интерес для установления анцестрального варианта развития, послужившего основой для эволюции разнообразных типов развития билатеральных животных.

Благодаря такому интересу, в последние десятилетия были отработаны новые модельные системы, включающие одиночных и колониальных гидроидных (напр., *Hydra* (Bosch, 2003), *Hydractinia echinata* (Frank et al., 2001), *Podocoryne carnea* (Gröger and Schmid, 2001; Seipel and Schmid, 2005), *Clytia* (Carre et al., 2000) и др.), кубомедузу *Tripedalia cystophora* (Kozmik et al., 2008), актинию *Nematostella vectensis* (Fritzenwanker et al., 2002; Burton et al., 2004), кораллового полипа *Acropora millepora* (Miller et al., 1995; Miller and Ball, 2000a). Основное внимание при изучении раннего развития стрекающих направлено на выяснение механиз-

мов генетической регуляции установления полярности и первичной оси у многоклеточных. Однако, из-за большого разнообразия экспрессии гомологичных генов (Hobmayer et al., 2000; Miller et al., 2000b; Ball et al., 2004; Hayward et al., 2004; Chourrout et al., 2006), предковое состояние механизма установления первичной оси для всех стрекающих и билатерий до сих пор остается спорным. Следовательно, необходимы дополнительные молекулярно-филогенетические и сравнительно-анатомические данные по отдельным группам стрекающих, которые позволили бы увеличить информативность имеющихся филогенетических построений.

На данный момент к таким мало охваченным филогенетическими и сравнительно-анатомическими исследованиями группам стрекающих относятся сцифоидные (Scyphozoa). Даже для *Aurelia aurita*, одного из самых распространенных и хорошо известных представителей сцифоидных, раннее эмбриональное развитие и метаморфоз изучены достаточно поверхностно. Имеются лишь общие сведения о раннем эмбриональном развитии. Известно, что зародыши претерпевают полное равномерное дробление, в результате которого формируется целобластула. Стенки бластулы представлены высокими узкими клетками, бластоцель небольшого объема (Yuan et al., 2008). Гастрюляция осуществляется разнообразными способами: мультиполярной иммиграцией, инвагинацией или обоими способами одновременно

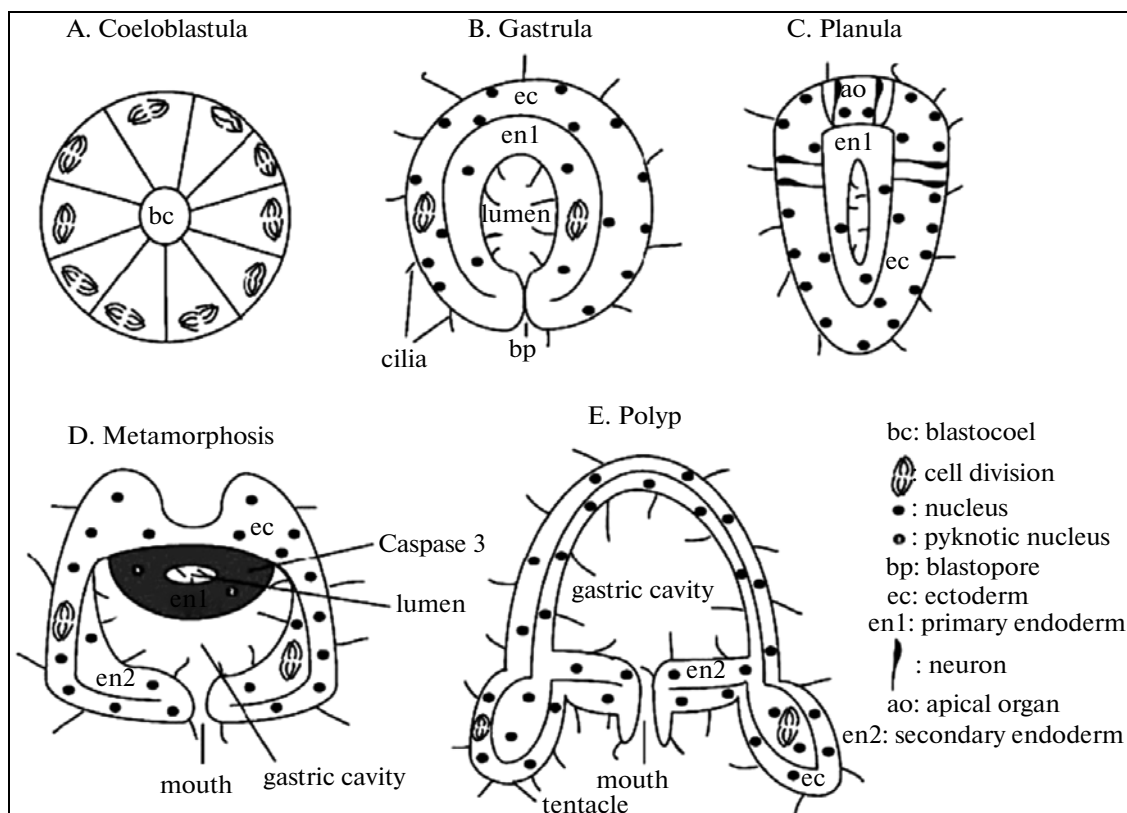


Рис. 1. Схематичное изображение раннего развития *A. aurita* (из Yuan et al., 2008). Аборальный полюс сверху. А – эмбрион на стадии дробления, формирующий целобластулу. В–Е – продольные срезы через центр соответствующей стадии развития. В – появляется область инвагинации, формируется гастрюла с ресничным покровом, закладываются эктодерма и первичная энтодерма. С – планула с развивающейся нервной системой. Д – начало метаморфоза; первичная энтодерма оказывается сдавленной в районе аборального полюса, одновременно с этим в клетках первичной энтодермы выявляется каспаза-3. С оральной стороны формируется вторичная энтодерма, которая вскоре начинает распространяться в аборальном направлении. Е – закладка и рост щупалец полипа, завершение метаморфоза.

(Lesh-Laurie and Suchy, 1991). Лишь недавно на основе иммуно-цитохимических методов были частично описаны апикальный орган и нервная система при развитии и метаморфозе планулы *A. aurita* (Nakanishi et al., 2008).

В недавней работе (Yuan et al., 2008), использование конфокальной лазерной и электронной микроскопии позволило авторам обнаружить интересное явление: в процессе метаморфоза планулы в первичный полип ее энтодерма (“первичная” по терминологии авторов) замещается на “вторичную”, происходящую из эктодермального пласта. При этом “первичная” энтодерма подвергается дегенерации и апоптозу (рис. 1).

Наряду с изучением морфологических процессов, происходящих в раннем онтогенезе стрекающих, необходимо понимание регуляции этих процессов, в первую очередь, процессов метаморфоза. Предположительно, регуляторную функцию при метаморфозе выполняют различные нейроактивные вещества, секретлируемые нервной системой. Эти вещества также могут

принимать участие в регуляции онтогенеза на до-нервных стадиях развития (Bosch and Fujisawa, 2001; Buznikov et al., 2003; Katsukura et al., 2004). Каждая стадия развития характеризуется своим специфическим пространственным паттерном клеток с нейроактивными веществами. При переходе к последующей стадии нервная система предыдущей стадии часто полностью или частично утрачивается (Martin, 2000; Nakanishi et al., 2008; Seipp et al., 2010).

Нейрональная организация личинок стрекающих изучена достаточно подробно. У планул гидроидных клетки с нейроактивными веществами концентрируются на переднем полюсе тела, отдельные клетки встречаются в слое эктодермы на протяжении всего тела личинки (Martin, 1988, 1992b; Gröger and Schmid, 2001; Nakanishi et al., 2008). Эти нервные клетки, а также их отростки могут содержать такие нейроактивные вещества, как GLW-, LW-, RF- и FMRF-амиды, серотонин, таурин, дофамин, γ -аминомасляную кислоту, тирозинированный тубулин и пр. (Gröger and

Schmid, 2001; Katsukura et al., 2004; Boero et al., 2007; Kass-Simon et al., 2007; Nakanishi et al., 2008). Планулы *Aurelia aurita*, как и большинство планул других стрекающих, имеют эктодермальную нервную систему, состоящую из нескольких типов FMRF-амид-положительных нейронов. Это “апикальные нейроны” – клетки апикального органа, расположенного на переднем полюсе личинки; “латеральные нейроны” – клетки в боковой эктодерме. Аксоны нейронов апикального органа образуют сплетение в основании апикального органа и тянутся вдоль мезоглеи к заднему концу планулы (Nakanishi et al., 2008).

В процессе превращения в полип экспрессия FMRF-амида в эктодерме планулы понижается, переходит в эндодерму и там исчезает, что, скорее всего, связано с апоптозом FMRF-амид-содержащих клеток. Скопление эктодермальных нейронов на переднем конце планулы полностью дегенерирует, и “вторичная” нервная система, в которой нейроны располагается преимущественно на оральном конце полипа (соответствующем заднему концу планулы), развивается *de novo* (Nakanishi et al., 2008).

В настоящей работе проведено исследование развития и строения планулы *Aurelia aurita* в момент ее оседания и метаморфоза. На основании цейтраферной микро-видеосъемки и исследования гистологического строения личинки на разных стадиях метаморфоза показано, что лишь часть “первичной” эндодермы планулы, возможно, подвергается дегенерации. Вместе с тем полученные данные свидетельствуют о том, что внутренняя выстилка манубриума первичного полипа (соответствующая гастродерме) происходит из эктодермального слоя заднего конца планулы. Впервые на *A. aurita* проведено изучение пространственной и временной динамики распределения серотонин-эргических клеток с начальных стадий развития зародыша до формирования первичного полипа. Также было прослежено распределение тирозинированного тубулина и нейропептида RF-амида на разных стадиях развития *A. aurita*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – сцифомедуза *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758). Материал собирали на Беломорской биостанции им. Н.А. Перцова МГУ (Кандалакшский залив Белого моря). Из ротовых лопастей половозрелых медуз извлекали зародышей на различных стадиях развития от зиготы до полностью сформированных планул. Полученных зародышей помещали в чашки Петри с фильтрованной морской водой, где продолжалось их развитие вплоть до оседания и метаморфоза планулы в первичный полип. Необходимые стадии фиксировали для дальнейшего исследования.

Цейтраферную видеосъемку оседания и метаморфоза планул проводили под микроскопом МБИ-1 с помощью цифровой камеры Score Tek DCM130E, подключенной к компьютеру, и программы Score Photo (V 3.0.12.146). Видеомонтаж цифровых фотографий производили с помощью Sony Vegas V 8.0.

Фиксацию для световой и электронной микроскопии осуществляли 2.5% раствором глутаральдегида на фосфатном буфере (PBS, pH 7.4), изотоничном морской воде (Millonig, 1964) (1 час при 4°C) с пост-фиксацией 1% раствором OsO₄ на том же буфере в течение 1 часа. До последующей обработки фиксированный материал хранили в 70° этаноле при 4°C. Для микроскопического исследования материал заливали в смесь эпона и аралдита (Electron Microscopy Sciences). Серийные полутонкие срезы получали на ультратоме Leica. Срезы окрашивали смесью толуидинового синего и метиленового синего (Миронов и др., 1994). Исследование и фотографирование срезов проводили на микроскопе Leica DM2500.

Для сканирующей микроскопии фиксированный материал обезвоживали в серии спиртов и ацетоне и высушивали в критической точке CO₂. Высушенные образцы монтировали на столики, напыляли сплавом золота с палладием и исследовали на микроскопах CAM SCAN и SCAN JSM (Japan).

Иммуно-цитохимическое окрашивание осуществляли по следующему протоколу. Материал фиксировали 4% параформальдегидом на PBS (pH 7.4, Sigma) на холоду (4°C) в течение суток, затем фиксатор заменяли на свежий и далее хранили при 4°C до окрашивания (в течение 1–2 месяцев). Перед окрашиванием образцы отмывали от фиксатора в четырех сменах бычьего сывороточного альбумина (3% BSA, Sigma, USA) на PBS (pH 7.4) с детергентом (0.3% Triton-X100, Ferak Berlin, Germany). После отмывания наносили первичные антитела, инкубация в которых длилась 12 часов при 4°C. В работе были использованы следующие первичные антитела:

– polyclonal rabbit Anti-Serotonin (1 : 1000) (AB938, Chemicon, USA);

– rabbit Anti-RF-amide (1 : 3000) (amidation-sensitive anti-RFamide antibody 1773 IIIp) (получены от проф. Г. Пликерта);

– monoclonal mouse Anti-Tyrosine Tubulin (1 : 1600) (T 9028, Sigma, Germany).

От первичных антител материал отмывали в четырех сменах BSA на PBS и наносили вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромами TRITC или FITC. Инкубация во вторичных антителах длилась 12 часов при 4°C, после чего производили отмывку образцов так же, как и от первичных антител. Вслед за этим в течение 5 минут проводили окрашивание ядер при помощи

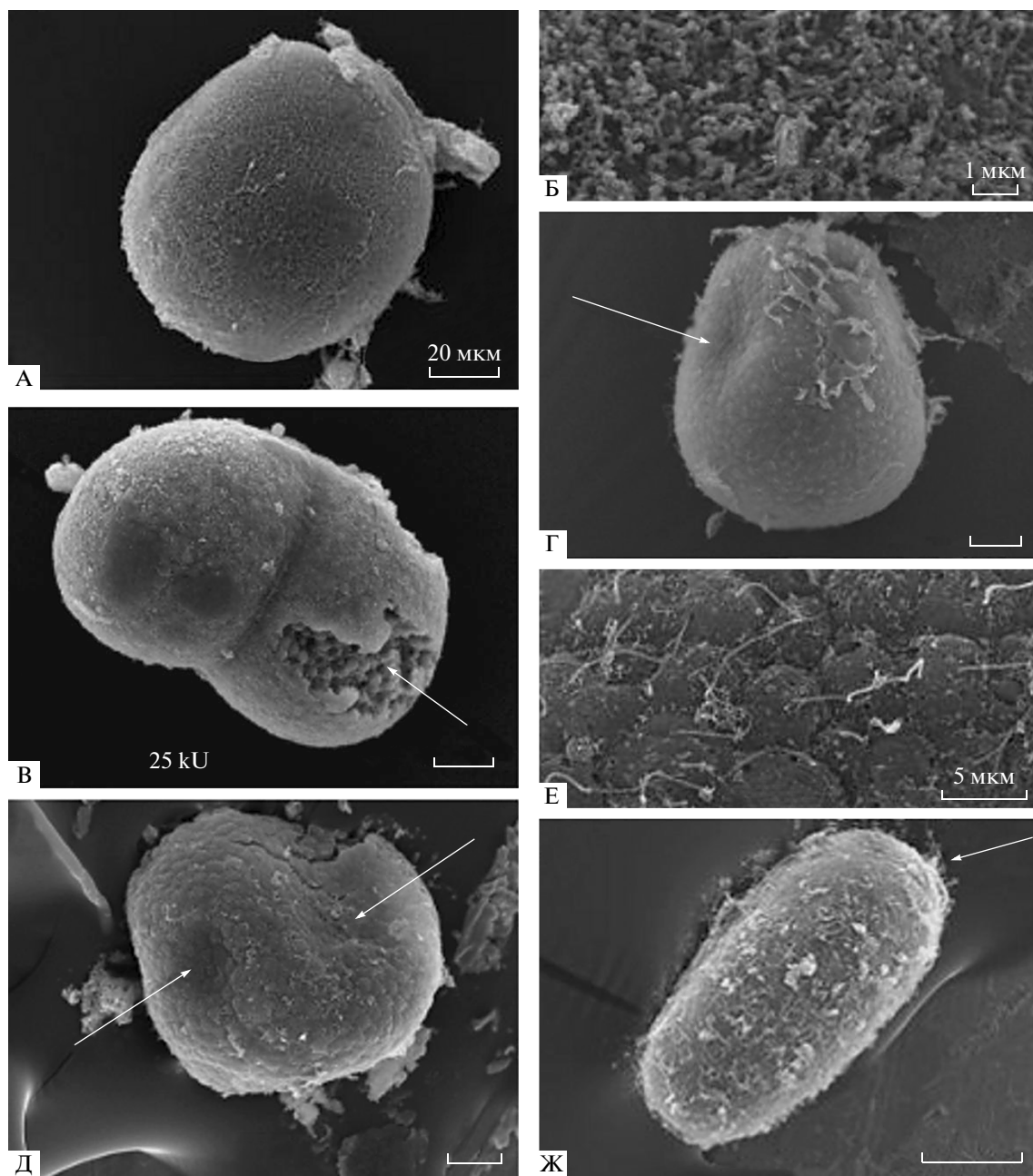


Рис. 2. Раннее развитие *A. aurita*. А – ооцит. Б – поверхность ооцита, микроворсинки. В – двухклеточный эмбрион, стрелкой указаны желточные гранулы, видимые на сколе препарата. Г, Д – начало гастрюляции, стрелками указаны впячивания, связанные с инвагинацией или иммиграцией клеток. Е – поверхность эмбриона на стадии гастрюляции, на клетках видны реснички. Ж – планула, вид сбоку, стрелкой указан передний конец, имеющий более тупую форму, чем задний конец. Масштабная линейка: А, В, Г, Д – 20 мкм, Б – 1 мкм, Е – 5 мкм, Ж – 50 мкм.

DAPI (100 ng/ml; Sigma). Избыток DAPI отмывали в трех сменах дистиллированной воды. Материал заключали в 2.5% DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, Aldrich-Chemie) в 90% глицерине на PBS. Визуализацию результатов проводили при помощи лазерных конфокальных микроскопов Leica TCS SPE и Olympus fluoview FV10i. В качестве отрицательного контроля иммуноцитохимическое окрашивание проводили без первичных

антител; флуоресценция на таких препаратах отсутствовала.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфология

Ооциты *Aurelia aurita* имеют округлую форму, их диаметр составляет около 90 мкм (рис. 2А).

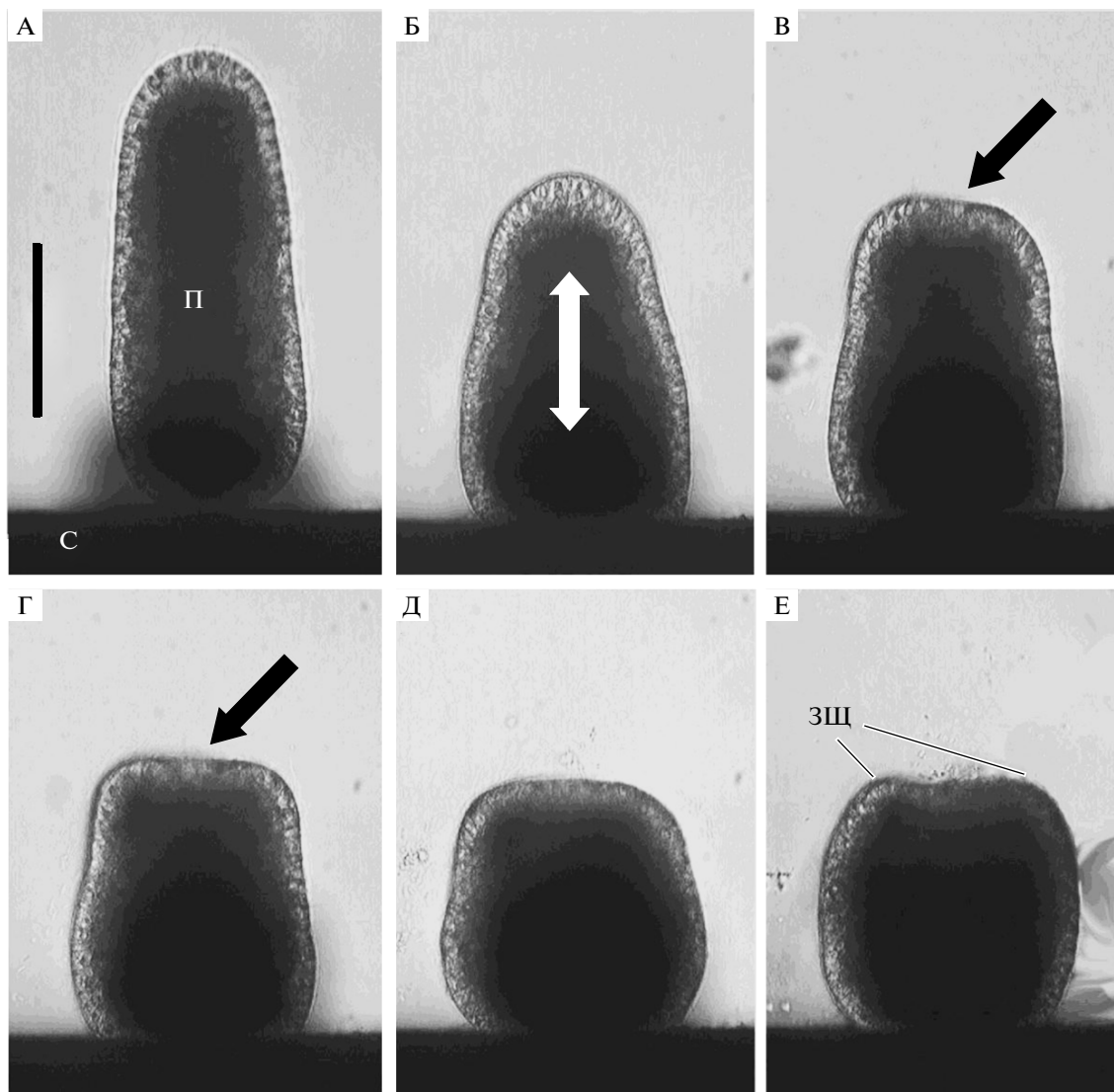


Рис. 3. Последовательность прикрепления и начала метаморфоза планулы *A. aurita* (последовательные кадры из центрифужной видеосъемки). А – Начало прикрепления планулы к субстрату. Б – Образование контакта с субстратом за счет расширения переднего конца планулы. Стрелки показывают направления периодических сжатий-удлинений планулы. В–Д – “Проваливание” заднего конца планулы. Стрелки указывают на отверстие воронки. Е – Завершение оседания, начало формирования щупалец. ЗЩ – зачатки щупалец; П – планула; С – субстрат. Масштабная линейка – 100 мкм.

Поверхность ооцита покрыта многочисленными микроворсинками (рис. 2Б). После первого деления дробления образуется двухклеточный зародыш; на сколе препарата видно, что бластомеры содержат большое количество желточных гранул (рис. 2В), накопленных ооцитом в течение оогенеза. В ходе дробления бластомеры сохраняют достаточно прочные контакты друг с другом, и к моменту начала гаструляции эктодерма представляет собой эпителий. О начале гаструляции можно судить по впячиваниям стенки эмбриона (рис. 2Г). Иногда у эмбриона можно обнаружить несколько впячиваний одновременно (рис. 2Д). Во время гаструляции на поверхности эмбриона появляются рес-

нички (рис. 2Е), которые вначале присутствуют не на всех клетках. После завершения гаструляции зародыш начинает вытягиваться и принимает форму типичной планулы (рис. 2Ж).

Оседание, прикрепление и метаморфоз планул *A. aurita* проходит по типичному для большинства стрекающих сценарию. Анализ проведенной центрифужной видеосъемки выявил интересный момент на заключительных стадиях прикрепления планулы к субстрату. Планула *A. aurita* прикрепляется к субстрату передним, несколько расширенным концом, располагаясь вертикально (продольная ось планулы перпендикулярна поверхности субстрата) (рис. 3А). После прикрепления

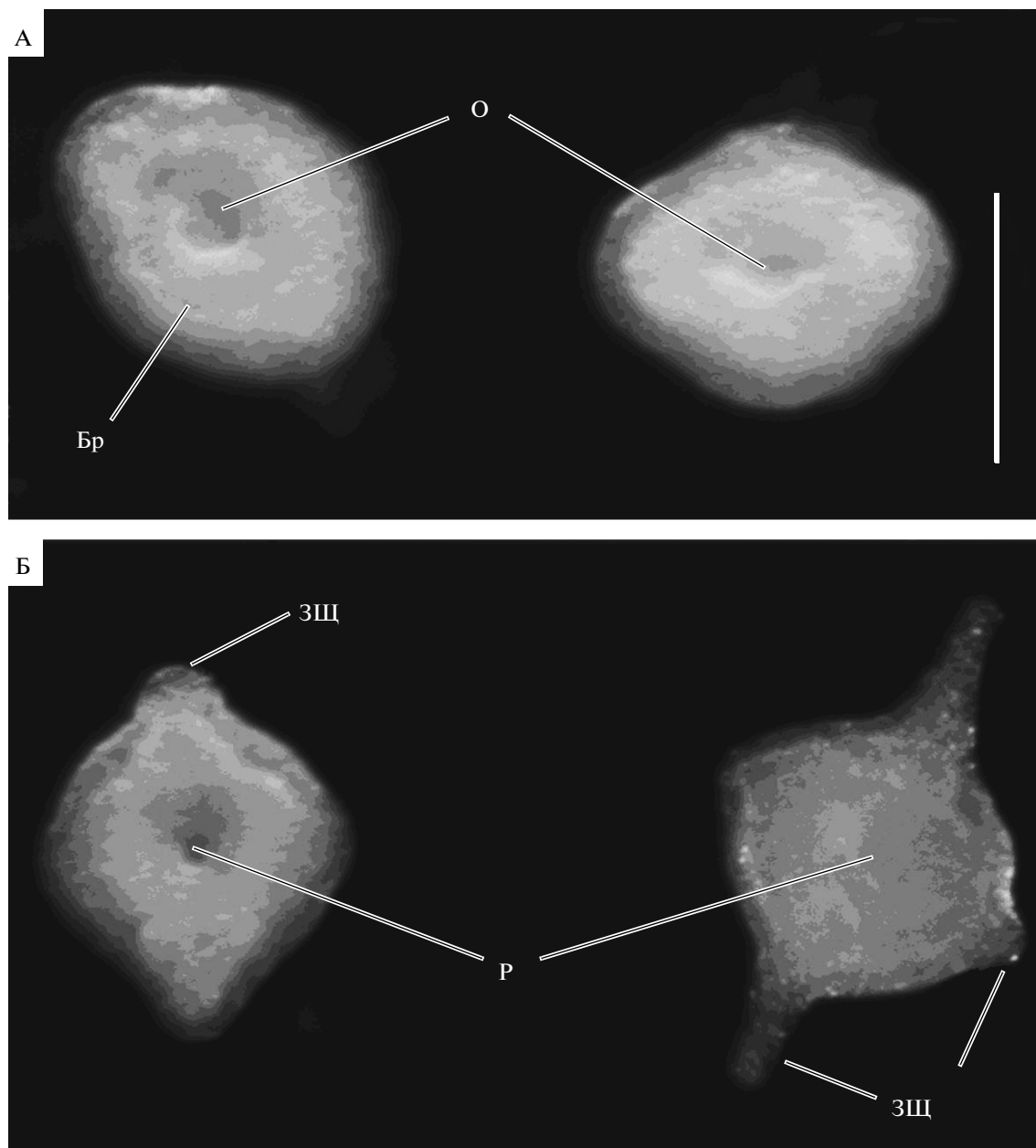


Рис. 4. Метаморфоз планулы *A. aurita*, вид с оральной стороны. Микроскопия при боковом освещении. А – “Проваливание” заднего конца планулы, формирование ротового отверстия. Б – Закладка щупалец первичного полипа. Бр – борозда, ограничивающая наружный край воронковидного углубления; ЗЩ – зачатки щупалец; О – место расположения отверстия, соединяющего полость воронки с гастральной полостью первичного полипа; Р – ротовое отверстие. Масштабная линейка – 100 мкм.

начинаются периодические продольные пульсации тела планулы, в результате которых передний конец планулы несколько расширяется, обеспечивая больший контакт с субстратом, а само тело планулы несколько укорачивается (рис. 3Б). В определенный момент задний конец планулы как бы “проваливается” (втягивается) внутрь тела планулы (рис. 3В–Д). Этот процесс происходит относительно медленно – при температуре 16–18 градусов на это требуется около 3-х часов. По

окончании втягивания заднего конца планула принимает почти шаровидную или кубовидную форму (при рассмотрении сбоку), и далее ее размеры не изменяются.

После втягивания заднего конца планулы, на будущей оральной поверхности полипа можно обнаружить кольцевую борозду (рис. 4А). В центре поверхности, ограниченной бороздой, видно место будущего ротового отверстия, обозначенное небольшим углублением. В дальнейшем на

некотором расстоянии от центра оральной стороны осевшей планулы, снаружки от борозды, закладываются зачатки щупалец (рис. 3Е). Чаще всего сначала происходит закладка двух противоположных щупалец, а затем, с очень коротким интервалом, — еще двух противоположных, в плоскости, перпендикулярной плоскости первой пары щупалец (рис. 4Б). На основании анализа цейтраферной видеосъемки можно предположить, что удлинение щупалец происходит преимущественно за счет миграции клеток. Гастродермальные клетки, формирующие внутренний стержень щупалец, при перемещении в ось щупальца увеличиваются в размерах за счет вакуолизации, а эпидермальные клетки с боковых сторон первичного полипа перемещаются к основаниям щупалец, а затем и по мере их удлинения — в направлении их дистальных концов.

Исследование **гистологического строения** планулы на последовательных стадиях ее развития, оседания и метаморфоза в первичный полип выявило следующие закономерности.

Плавающая и компетентная к метаморфозу планула *A. aurita* имеет типичное для планул стрекающих строение. Форма планулы широкоовальная, с чуть более широким передним концом. В поперечном сечении планулы часто имеют уплощенную овальную (иногда треугольную), а не цилиндрическую форму (рис. 4А). Эктодермальный ресничный слой имеет четкую эпителиальную структуру, с несколько более высокими клетками на переднем конце планулы. Эктодермальный слой планулы содержит разнообразные типы клеток — опорные (эпителиально-мускульные), несколько типов железистых клеток, нервные и стрекательные клетки. Стрекательные клетки более многочисленны на заднем конце планулы, но имеются и на самом переднем конце.

Эндодерма также структурирована и эпителизирована, и в передней половине планулы заметна полость. В клетках много гранул запасных питательных веществ, которые в **эктодерме** в основном сконцентрированы в базальных частях клеток (рис. 5А, Б). Мезоглея тонкая и рыхлая, в результате чего пласты достаточно легко смещаются друг относительно друга (как и у сцифополипов).

При контакте с субстратом передний конец планулы несколько расширяется, и ее общая форма становится грушевидной. Эктодермальный слой в месте контакта с субстратом утончается (рис. 5Б). Организация эндодермы не претерпевает значительных изменений.

С началом процесса “погружения” (втягивания) заднего конца в тело оседающей планулы на гистологических срезах становится заметным утолщение эктодермального слоя на будущем оральном полюсе. На срезе это утолщение выгля-

дит как “пробка”: ее периметр отмечен бороздой на внешней поверхности (рис. 5В).

По мере дальнейшего метаморфоза в центре утолщения эктодермы на заднем конце планулы становится заметным небольшое углубление (рис. 4А). Это углубление увеличивается, и “пробка” трансформируется в воронковидное впячивание эктодермы. При этом эндодерма планулы частично сжимается формирующейся “воронкой”, а частично отодвигается на периферию (рис. 5Г).

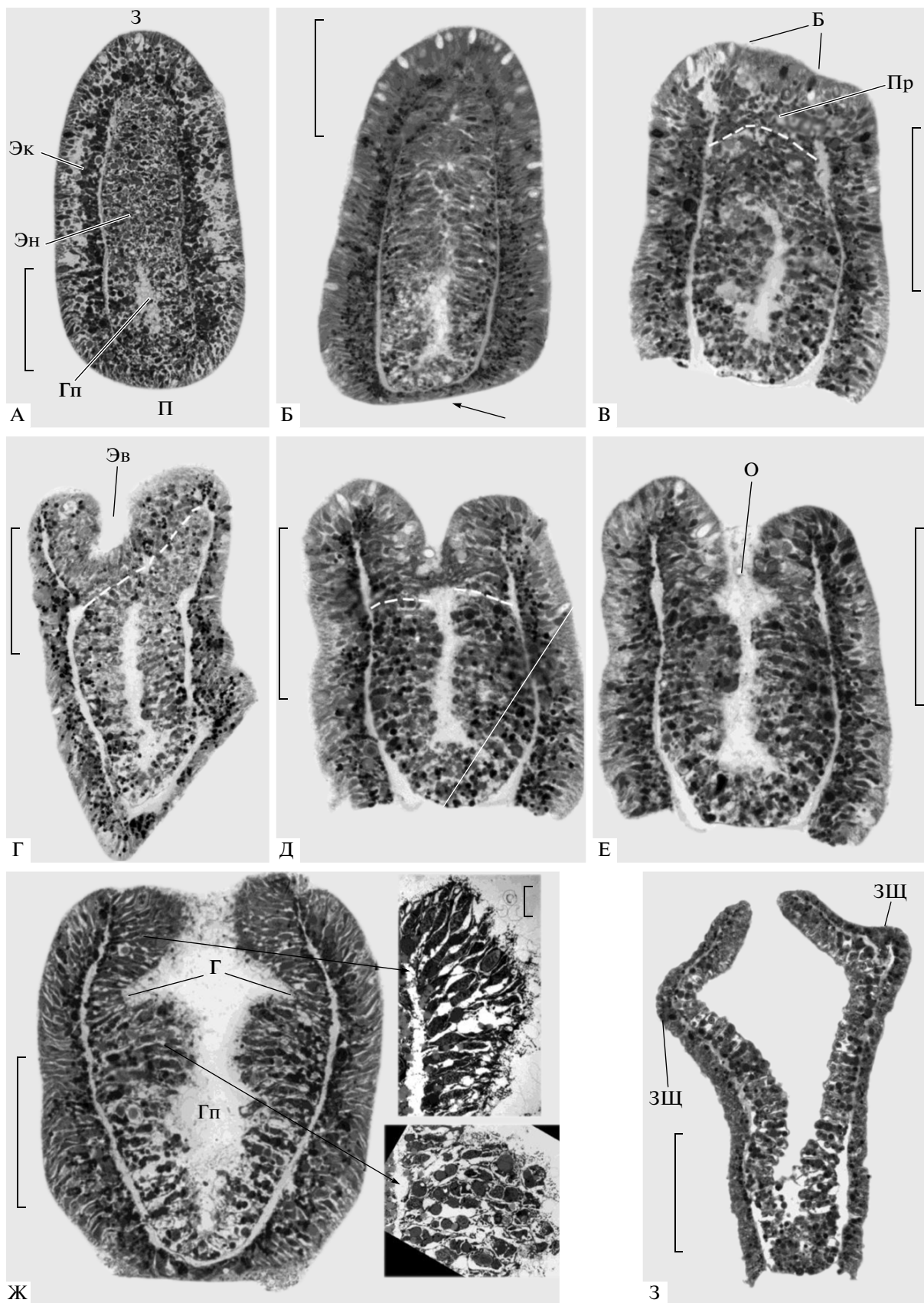
Процесс погружения и разрастания эктодермальной “воронки” завершается образованием отверстия в эндодермальном слое, прилежащем ко дну “воронки”, а затем и соответствующего отверстия в самой эктодермальной “воронке”. При этом по периметру отверстия происходит слияние эктодермальной выстилки “воронки” и эндодермы (рис. 5Д–Ж). С этого момента у первичного полипа появляется мешковидная гастральная система. Стенки эктодермальной “воронки” прижимаются изнутри к внешней эктодерме, в результате чего формируется двуслойная стенка тела переднего отдела первичного полипа. Место слияния эктодермальной и эндодермальной выстилки маркирует границу между манубриумом (ротовым конусом) и желудочным отделом гастральной системы полипа. Граница между внутренней эктодермальной выстилкой ротового конуса (манубриума) и нижележащей эндодермальной выстилкой желудочного отдела хорошо различима: во-первых, выстилка ротового конуса несколько тоньше выстилки желудочного отдела, а, во-вторых, выстилки этих отделов отличаются по составу и структуре слагающих их клеток (рис. 5Ж).

Часть эндодермы планулы, которая была “отжата” вворачивающейся и развивающейся эктодермальной “воронкой” “исчезает”. Анализ нескольких серий гистологических срезов последовательных стадий метаморфоза личинки не позволяет однозначно судить о том, что происходит с этой эндодермой — она дегенерирует или же входит в состав эндодермы желудочного отдела полипа.

Затем у первичного полипа начинается формирование щупалец (рис. 5Е), почки которых закладываются на границе ротового конуса и желудочного отдела первичного полипа (рис. 5Е).

Нервная система

Основное внимание в исследовании характера и динамики распределения нейроактивных веществ было уделено моменту оседания и метаморфоза планулы в первичный полип. Кроме этого, было проведено выявление нейроактивных



веществ на ранних эмбриональных стадиях развития *A. aurita*.

Серотонин обнаруживается уже на стадии дробления почти во всех бластомерах на предгастрюляционной стадии развития зародыша (рис. 6А). Внутри клеток серотонин заключен в крупные гранулы, которые равномерно распределены по цитоплазме клеток. Другие нейральные маркеры до стадии гастрюляции включительно выявлены не были.

По мере дальнейшего развития зародыша паттерн распределения серотонина меняется. На стадии препланулы серотонин-содержащие клетки остаются только в эктодермальном слое, при этом основное их количество обнаруживается на переднем полюсе планулы. Препланулы, не готовые к метаморфозу, содержат небольшое число удлинённых серотонин-содержащих клеток на переднем конце (рис. 6Б). Ядра в этих клетках смещены базальнее по сравнению с другими эктодермальными клетками, при этом серотонин локализован лишь в апикальной части цитоплазмы этих клеток (рис. 6Б, В). У зрелых же, компетентных к метаморфозу планул, серотонин выявлен в большинстве клеток на переднем полюсе. К этому времени серотонин занимает как апикальную, так и базальную цитоплазму клеток (рис. 6Г).

Помимо клеток апикального органа, серотонин выявляется в отдельных клетках в латеральных областях эктодермы планулы (рис. 6Д). По форме эти клетки напоминают иммуноположительные клетки переднего полюса: они имеют столбчатую форму и слегка сужаются в базальном направлении. Их базальная поверхность граничит с мезоглеей, апикальная поверхность выходит во внешнюю среду. Вместе с тем каких-либо клеточных отростков, отходящих от базальной части клеток и содержащих серотонин, не выявлено.

Изучение распределения **RF-амида** позволило получить наиболее интересные данные о строении нейронов у планул *A. aurita*. При помощи антител к RF-амиду удалось выявить не только тела нервных клеток, но и их отростки (рис. 6Е). Тела RF-амид-положительных клеток расположены в латеральной эктодерме планулы, клетки столбчатой формы, апикальной мембраной выходят на

поверхность планулы. На самом переднем полюсе RF-амид-положительных клеток не выявлено. Отростки RF-амид-содержащих клеток отходят от их базальных частей и направляются в сторону переднего полюса планулы. Сами отростки при этом проходят под слоем эктодермы, вдоль длинной оси животного, в области мезоглеи. RF-амид-содержащие клетки у планул *A. aurita* единичны.

При помощи антител к **тирозинированному тубулину** удалось выявить тонкие отростки толщиной около 2 мкм, проходящие вдоль всего тела планулы в области мезоглеи (рис. 7А). При этом тела нейронов, содержащие какие-либо нейрональные вещества или тубулин, не обнаружены, поэтому место отхождения иммуноположительных отростков до сих пор остается не выявленным.

С началом метаморфоза нейроны при помощи использованных антител перестают выявляться. У прикрепившейся к субстрату планулы не обнаружены серотонин и нейропептиды, также на этой стадии становятся неразличимы волокна, содержащие тирозинированный тубулин. В начале закладки гипостома и почек щупалец реакция на антитела также отрицательная.

Позже, когда первичный полип уже достаточно развит и способен добывать пищу, в его щупальцах можно различить волокна, содержащие тирозинированный тубулин (рис. 7Б). Особенно хорошо эти волокна различимы в основании щупальца и в его проксимальной половине. На некоторых препаратах можно обнаружить клетки, которые предположительно несут подобный отросток: они дают интенсивную реакцию на антитела к тирозинированному тубулину. Тела таких клеток, по-видимому, расположены в основании эктодермального слоя.

ОБСУЖДЕНИЕ

Детальное изучение начальных стадий развития представителей практически любых групп многоклеточных животных, даже хорошо известных по монографиям и учебникам, зачастую позволяет выявить ряд новых интересных фактов.

Рис. 5. Изменение внутренней организации планулы *A. aurita* в процессе оседания и метаморфоза в первичный полип. Продольные срезы. А – Организация планулы, компетентной к оседанию. Б – Прикрепление планулы к субстрату, истончение эктодермального слоя в месте контакта (стрелка). В – Начало “погружения” заднего конца планулы. Г – образование эктодермальной “воронки” и отсечение ею части эндодермы. Д – слияние эндодермы с эктодермальной “воронкой”. Е – образование отверстия в дне эктодермальной “воронки”. Ж – завершение формирования гастральной системы первичного полипа; на вставках показаны соответствующие участки (стрелки) внутренней выстилки первичного полипа при большем увеличении (масштабная линейка – 5 мкм). З – начало закладки щупалец первичного полипа. Б – борозда, ограничивающая эктодермальную “робку”; Г – граница между эктодермальной выстилкой манубриума и эндодермальной выстилкой желудочного отдела полипа; Пп – гастральная полость; З – задний конец планулы; О – отверстие между эктодермой и эндодермой; П – передний конец планулы; Пр – эктодермальная “пробка” на заднем конце планулы; Эв – эктодермальная “воронка”; Эк – эктодерма; Эн – эндодерма; пунктирная линия – граница между эктодермой и эндодермой. Масштабная линейка – 50 мкм.

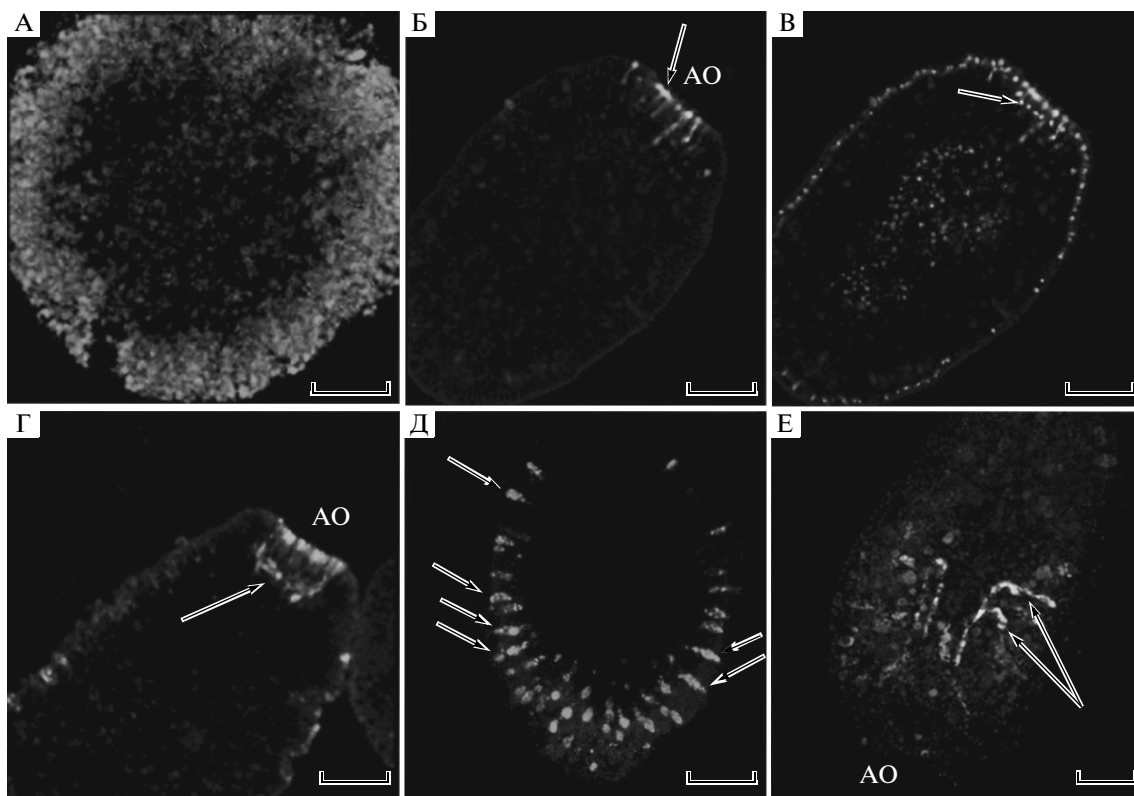


Рис. 6. Распределение серотонина и RF-амида на предгастрляционной стадии и в процессе созревания планулы *A. aurita*. А – оптический срез эмбриона на предгастрляционной стадии, реакция против серотонина. Б – сагиттальный оптический срез препланулы, стрелкой указаны серотонин-положительные клетки на переднем конце. В – препланула, наложение двух каналов: серотонин (снимок, идентичный 6Б) и ядра. Стрелка указывает на ядра серотонин-содержащих клеток передней эктодермы. Г – сагиттальный оптический срез планулы, стрелка указывает на серотонин-положительные клетки на переднем конце. Д – максимальная проекция стопки из 12 оптических срезов, выполненных в парасагиттальной области планулы с шагом 2 мкм, реакция против серотонина, стрелки указывают на иммуноположительные клетки в латеральной эктодерме. Е – максимальная проекция 33 сагиттальных оптических срезов (шаг 2 мкм) планулы, реакция против RF-амида, стрелками отмечены иммуноположительные клетки в латеральной эктодерме. АО – апикальный орган. Масштабная линейка – 50 мкм.

Развитие личинки и ее метаморфоз.

Развитие планулы *Aurelia aurita* принципиально не отличается от такового, многократно описанного для представителей разных групп стрекающих. Дробление начинается в виде врезающейся борозды, которая появляется, как принято считать, с анимального полюса (Freeman et al., 1980, 1990; Fautin, 2002), и заканчивается формированием бластулы с небольшой полостью. Гастрюляция осуществляется или путем мультиполярной иммиграции, или путем инвагинации с анимального (что еще не было доказано однозначно) полюса, или, что более вероятно, обоими способами одновременно (Серавин, 1988, 1989; Lesh-Laurie and Suchy, 1991; Ю. Краус – личные сообщения). В пользу участия в гастрюляции мультиполярной иммиграции свидетельствуют несколько впячиваний на поверхности бластулы, которые могут соответствовать не только месту инвагинации пласта, но и месту выселения из него клеток (Yuan et al., 2008; Kumburegama et al. 2011).

В результате формируется типичная двухслойная планула. Для *A. aurita* характерно формирование планулы с обоими эпителизованными слоями – эктодермой и энтодермой, и небольшой полостью внутри. Эпителизация энтодермы заметно менее правильная, по сравнению с таковой эктодермы, особенно в области заднего конца планулы. Однако энтодерма зрелой планулы *A. aurita* отличается от таковой у ряда представителей атекатных гидроидных, у которых энтодерма остается неэпителизованной и представляет собой рыхлое скопление крупных, часто вакуолизированных клеток (Weis et al., 1985; Kroiher et al., 1990; Walther et al., 1996). Строение зрелой планулы *A. aurita* представляет собой промежуточное состояние между планулами ряда текатных гидроидных и личинками кораллов (Burton et al., 2004; Kraus et al., 2007).

Процесс оседания и метаморфоза планулы *A. aurita* проходит по классической для стрекающих с прикрепленной полипоидной стадией схе-

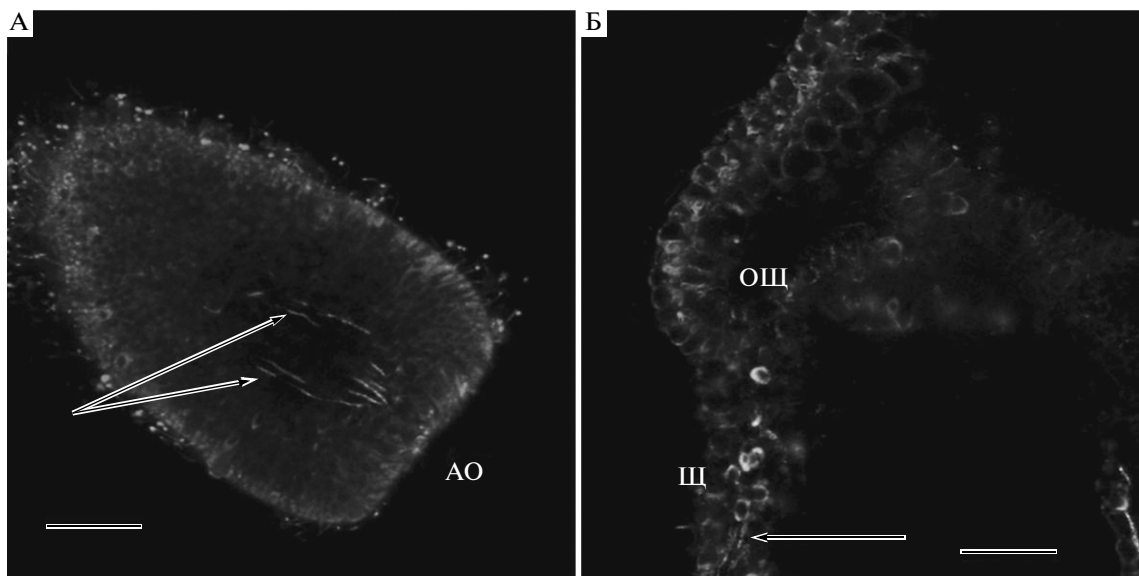


Рис. 7. Распределение тирозинированного тубулина у планулы и сцифистомы *A. aurita*. А – максимальная проекция 4 продольных оптических срезов, выполненных с шагом 2 мкм в парасагиттальной области планулы, стрелки указывают на тонкие иммуноположительные отростки в области мезоглеи. Б – продольный оптический срез сцифистомы, область отхождения щупальца, стрелки указывают на тонкие иммуноположительные отростки в щупальце. АО – апикальный орган; ОЩ – основание щупальца; Щ – щупальце. Масштабная линейка – 50 мкм.

ме: личинка своим передним концом прикрепляется к субстрату, прижимается к нему и претерпевает метаморфоз (Марфенин и Косевич, 1984; Plickert et al., 1988; Kroihner et al., 1990; Sommer, 1990; Walther et al., 1996). В результате формируется первичный полип (сцифистома). Сам метаморфоз в большей степени напоминает метаморфоз атекатных гидроидных, у которых личинка не расплывается полностью по субстрату, и ее внутренняя организация претерпевает меньшие изменения, чем таковая у текатных гидроидных (Sommer, 1990). Планула *A. aurita* лишь незначительно расширяется и сокращается в длину в процессе прикрепления к субстрату и запуска метаморфоза. Ее тканевая организация также в значительной степени сохраняется в организации первичного полипа. За исключением процесса формирования манубриума.

Выявленный в настоящей работе процесс формирования манубриума и его внутренней выстилки, рассматривавшейся ранее как энтодермальная по природе, позволяет нам говорить о некоторой связи этих процессов с формированием глотки у кораллов.

У кораллов глотка формируется в конце процесса гастрюляции в результате погружение ротового отверстия внутрь гастральной полости с выворачиванием части двухслойной стенки. Между глоткой и боковыми стенками тела первичного полипа кораллов остается просвет гастральной полости, выстланный гастродермой. В дальнейшем от краев глотки начинается формирование

первичных септ, которые “фиксируют” пространственное положение глотки, не давая ей возможности выворачиваться наружу (Fautin and Mariscal, 1991; Miller and Ball, 2000a; Burton et al., 2004).

У *A. aurita* наблюдается сходный процесс. С началом метаморфоза планулы на ее заднем (будущем оральном полюсе) конце происходит погружение эктодермального слоя. В отличие от соответствующей стадии у кораллов, на будущем оральном полюсе планулы *A. aurita* энтодерма еще не окончательно эпителизована, и поэтому не имеет однослойного строения. Как результат, на заднем конце планулы не может сформироваться правильное двуслойное впячивание. Вместо этого клетки эктодермального пласта в центре заднего полюса планулы становятся более высокими, а сам пласт – более толстым (рис. 5В). Далее в центре этого утолщенного пласта начинает формироваться воронковидное впячивание, которое, погружаясь внутрь планулы, оттесняет энтодерму. По мере погружения эктодермального пласта внутрь планулы и формирования воронковидной структуры часть клеток энтодермы на заднем конце планулы оказывается заключенной между эктодермальным пластом наружной стенки и воронки (Рис. 5Г). В дальнейшем эти клетки, по всей видимости, резорбируются, обеспечивая дополнительное питание личинки в процессе метаморфоза и уменьшая объем личиночной энтодермы. Именно эти клетки и были, по всей видимости, выявлены в работе Яна с коллегами (Yuan et al., 2008) как клет-

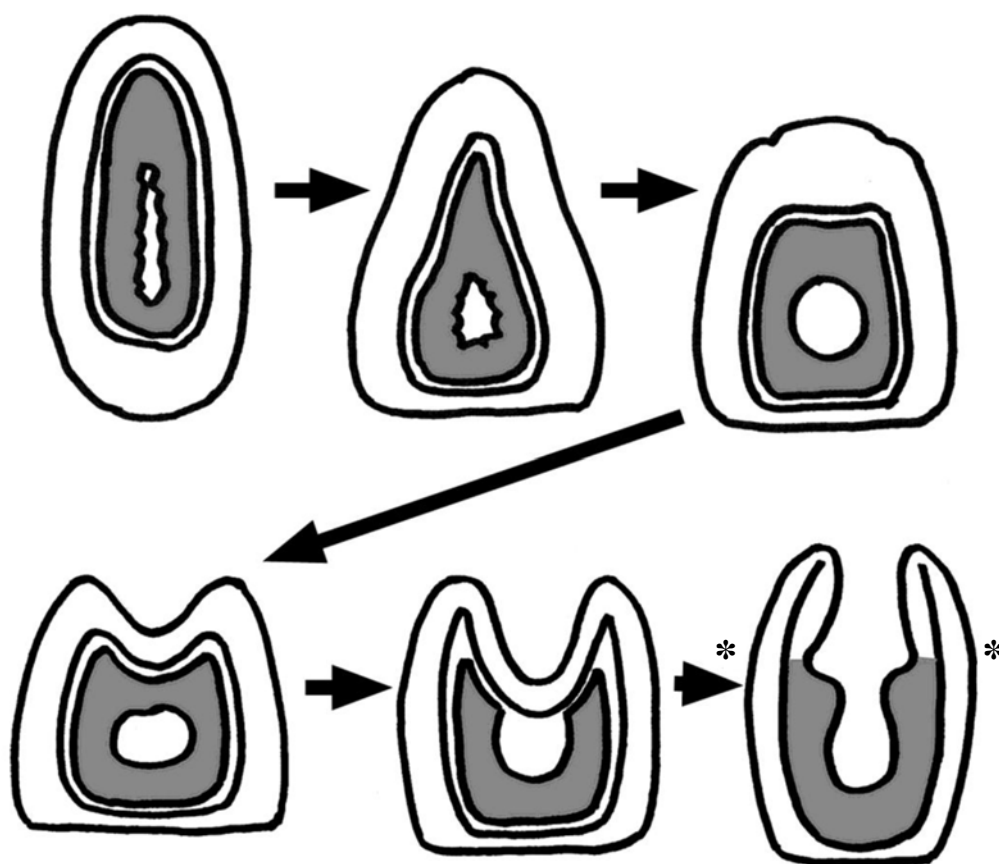


Рис. 8. Схема метаморфоза планулы *A. aurita* и формирования выстилки гастральной полости первичного полипа. На схеме изображены продольные срезы различных стадий метаморфоза, ориентированных оральным полюсом вверх. Серым цветом выделена эндодерма, белым – эктодерма. Звездочками отмечены места закладки щупалец.

ки “первичной” эндодермы, подвергающиеся апоптозу.

Однако, в отличие от указанной этими авторами полной резорбции всей эндодермы планулы, в нашем исследовании четко прослеживается преемственность между эндодермой личинки и гастродермой первичного полипа. Лишь часть эндодермы, по-видимому, подвергается резорбции, как это обычно наблюдается при метаморфозе планулоподобных личинок стрекающих (Seipp et al., 2001). Более того, нами не было отмечено и вворачивания переднего конца планулы внутрь при прикреплении планулы к субстрату. Напротив, происходит расширение и “распластывание” переднего конца планулы по субстрату.

После установления контактов между краями эндодермальной выстилки с эктодермальной воронкой происходит формирование отверстия в центре воронки, соединяющее внешнюю среду с полостью полипа. На этой стадии место перехода эндодермальной выстилки гастральной полости полипа в эктодермальную (по происхождению)

выстилку будущего манубриума четко обозначено кольцевой бороздой (рис. 5Е, Ж).

Различия в толщине внутренней выстилки гастральной полости первичного полипа постепенно сглаживаются (рис. 5З). Тем не менее, клеточная организация этой выстилки на уровне манубриума и желудочного отдела различается. На это обратил внимание еще Чапман (Chapman, 1978) при описании микроанатомии кубуполипа (тогда Cubozoa еще рассматривали входящими в кл. Scyphozoa). Однако никаких последующих исследований проведено не было, и объяснения этому факту дано не было. Полученные в настоящей работе данные позволяют объяснить очевидную разницу в организации внутреннего эпителия гастральной полости первичного полипа *A. aurita* (рис. 8). Кроме того, описанный характер формирования манубриума у сцифополипа в значительной степени напоминает процесс формирования глотки у кораллов. Кораллы в настоящее время рассматривают как группу стрекающих, наиболее близкую по строению и развитию к предковому состоянию (Schuchert, 1993; Kobayashi et al., 1996;

Collins et al., 2005). Если это так, то можно предположить, что формирование манубриума у сцифополипа при метаморфозе непитающейся личинки является некоторым упрощением процесса формирования глотки у кораллов при “прямом” развитии последних. И связано это, скорее всего, с миниатюризацией и общим упрощением полипоидной стадии в жизненном цикле сцифоидных.

Представляет интерес и порядок закладки щупалец у первичного полипа *A. aurita*. Преобладающей симметрией у сцифоидных на полипоидной и медузоидной стадиях является 4-х лучевая симметрия (Lesh-Laurie and Suchy, 1991). Однако в форме зрелой планулы и при ее метаморфозе явно проявляется билатеральная или двулучевая симметрия. На поперечном срезе зрелые плавающие планулы и прикрепившиеся планулы имеют уплощенную форму с преобладанием билатеральной симметрии (рис. 4А). Закладка первых щупалец первичного полипа происходит по схеме 2 + 2, что также подчеркивает двулучевую симметрию. Такие особенности развития сцифоидных также можно рассматривать как “остатки” билатеральности, свойственной предкам стрекающих (Gröger and Schmid, 2001; Martindale et al., 2002; Finnerty et al., 2004), и прослеживающейся в развитии кораллов.

Роль нейроактивных веществ в развитии

Проведенное исследование пространственно- и временного распределения нейроактивных веществ было направлено, в первую очередь, на выявление их потенциальной роли в процессах развития личинки и инициации ее метаморфоза. Полученные нами данные по строению нервной системы и наличию нейроактивных веществ в нейронах *A. aurita* во многом сходятся с результатами предыдущих работ на Cnidaria. Большинство работ по выявлению нейроактивных веществ было проведено на личиночной стадии развития стрекающих (Martin and Chia, 1982; Martin, 1988, 1992a; McCauley, 1997; Gröger and Schmid, 2001; Zega et al., 2007; Nakanishi et al., 2008). В нашей работе эти исследования также проведены и на эмбриональных стадиях развития. Исследование локализации серотонина у *A. aurita* было проведено впервые.

Серотонин выявлен у *A. aurita* уже на стадии ранней гастрюлы в большинстве клеток. К настоящему времени информации о наличии нейроактивных веществ на эмбриональных стадиях стрекающих накоплено мало, однако, считается, что холинэргические, адренэргические и серотонэргические системы представлены на ранних эмбриональных стадиях всех позвоночных и беспозвоночных животных (Buznikov et al., 2003). Поскольку именно на стадии гастрюляции начинается дифференцировка клеток (Yuan et al., 2008;

Marlow et al., 2009), можно предположить, что окрашивание наблюдается в предшественниках опорных клеток как в самом распространенном типе клеток. Следовательно, на этой стадии серотонин не является нейральным маркером, а служит донервным трансмиттером и участвует в передаче межклеточных сигналов, как это было доказано для других беспозвоночных (Buznikov et al., 2001, 2003). Нейротрансмиттеры обеспечивают различные межклеточные взаимодействия, необходимые, в том числе, для контроля митоза и макромолекулярного синтеза (Buznikov and Shmakler, 1981). Поскольку наблюдаемое нами внутриклеточное распределение серотонина имеет гранулярный характер, можно предположить, что серотонин заключен в желточных гранулах. Возможно, в этих местах и происходит его синтез, как это было показано на дробящихся эмбрионах многощетинкового червя *Ophryotrocha labronica* (Emanuelsson, 1974).

Отсутствие RF-амида на эмбриональной стадии развития исключает его роль в передаче сигналов между бластомерами и гастрюляции.

У препланулы серотонин выявляется на переднем полюсе, в апикальных частях эктодермальных клеток. Это связано, скорее всего, с началом формирования апикального органа, сенсорной структуры Scyphozoa (Martin and Chia, 1982; Yuan et al., 2008) и других стрекающих (Chia et al., 1979; Weis et al., 1985; Marlow et al., 2009).

У зрелой планулы везикулы с серотонином выявляются и в базальной, и в апикальной частях клеток апикального органа. Ранее серотонин был обнаружен в клетках переднего полюса планулы *Eudendrium racemosum* (Hydrozoa). Эти клетки имеют колбовидную форму и сужаются в базальном направлении (Zega et al., 2007), как и серотонин-содержащие клетки *A. aurita*. Такая форма может быть связана с наличием нервного отростка: узкая базальная область такой клетки непосредственно переходит в отросток, который, однако, не содержит серотонина ни у *A. aurita*, ни у *E. racemosum*.

Установлено, что планулы *A. aurita* могут воспринимать сигналы от сцифистом своего вида. В ответ на такие сигналы планулы оседают и вступают в метаморфоз в уже сформированной колонии полипов, поскольку скопление предшественников указывает на место с благоприятными условиями для их развития (Gröndahl, 1989). Центральную роль в этом процессе может играть апикальный орган как секреторно-сенсорный аппарат, клетки которого, по-видимому, способны выделять серотонин во внешнюю среду и/или внутриклеточное пространство. Следовательно, роль апикального органа состоит и в восприятии внешних химических сигналов, и в передаче этих сигналов другим клеткам планулы (Nakanishi

et al., 2008). На примере гидроидного *Phialidium gregarium* была предложена модель передачи сигналов об инициации метаморфоза личинки (McCauley, 1997). Согласно этой схеме, серотонин выделяется во внешнюю среду в ответ на сигналы, стимулирующие метаморфоз (в данном случае – бактериальная индукция). Далее серотонин из внешней среды взаимодействует с рецепторами соседних клеток и вызывает каскад химических реакций, приводящий к перестройкам клеток согласно программе метаморфоза.

Клетки с отростками, содержащие RF-амид, скорее всего, являются у *A. aurita* сенсорными клетками. Об этом можно судить по их форме. Так, согласно работе Мартин с соавторами (Martin et al., 1983), посвященной метаморфозу планулы *Mitrocomella polydiademata*, нервная система личинки состоит из ганглиозных и сенсорных клеток. Оба типа характеризуются наличием нервного отростка, а отличие заключается в том, что тела ганглиозных клеток расположены на уровне базальной части эктодермы, в то время как сенсорные клетки тянутся от мезоглеи до поверхности личинки, располагаясь, таким образом, по всей толщине эктодермы. Выявленные нами при помощи антител к RF-амиду клетки *A. aurita* похожи по описанию на сенсорные.

Ранее RF-амид-содержащие клетки были обнаружены в латеральной эктодерме планулы *Podocoryne carnea* (Hydrozoa). Эти клетки несут отростки, ориентированные вдоль длинной оси планулы (Gröger and Schmid, 2001). Планулы *Pennaria tiarella* также характеризуются би- и мультиполярными RF-амид-положительными нейронами, контактирующими при помощи отростков с другими нейронами, сенсорными и эпителиально-мышечными клетками (Martin, 1992b; Kass-Simon et al., 2007). Таким образом, RF-амид, присутствующий в нервных клетках и их отростках, может принимать участие в передаче различных сигналов. Кроме этого, есть доказательства отношения этого нейропептида к регуляции метаморфоза планулы: при внесении экзогенного RF-амида в среду с живыми личинками *H. echinata*, у них снижается двигательная активность, и они позже вступают в метаморфоз, чем личинки контрольной группы (Katsukura et al., 2004). Следовательно, RF-амид-содержащие клетки планулы *A. aurita* могут принимать участие в процессе метаморфоза, а также улавливать и передавать другим клеткам различные сигналы из внешней среды.

Выявление нейронов при помощи антител к тирозинированному тубулину возможно благодаря тому, что тела и базальные отростки нервных клеток содержат многочисленные пучки микротрубочек (Martin, 1988; Gröger et al., 2000). Благодаря этому методу были выявлены отростки нервных клеток у планулы *P. carnea* и *E. racemosum*. У

P. carnea нервные отростки образуют четкую сеть, состоящую из продольных и поперечных волокон (Gröger and Schmid, 2001). Нервная сеть *E. racemosum* менее структурирована, чем у *P. carnea*, и представляет совокупность тонких волокон, большая часть которых направлена поперек продольной оси планулы. Волокна, выявленные у планулы *A. aurita*, направлены вдоль длинной оси личинки; поперечные волокна не выявлены, возможно, для их обнаружения необходимы иные методы идентификации нервной ткани. Кроме этого, различие в расположении нервных отростков может свидетельствовать о различных планах строения нервной системы у отдельных видов стрекающих.

Наибольшее число нейронов можно обнаружить у планулы, готовой к оседанию и вступлению в метаморфоз. Однако, после оседания планулы *A. aurita*, в процессе метаморфоза в сцифистому, серотонин и RF-амид исчезают из эпидермы. Во время метаморфоза клетки не включают метки к этим веществам что, скорее всего, связано с апоптозом сенсорных нервных клеток *A. aurita* (Nakanishi et al., 2008). Согласно недавним исследованиям раннего развития и метаморфоза *A. aurita*, после оседания планулы нервные клетки из эктодермы перемещаются в эндодерму будущего абсорбального полюса полипа. В этой же области отмечают образование апоптотических телец и иммуноцитохимически выявлена каспаза-3, что может свидетельствовать о гибели в том числе и нервных клеток через апоптоз (Nakanishi et al., 2008; Yuan et al., 2008). Апоптоз нервных клеток в ходе метаморфоза также свойственен и планулам гидроидных (Gröger et al., 2000; Seipp et al., 2010).

Однако, даже у только что сформированных первичных полипов *A. aurita* нейрональные клетки выявлены не были. Эти результаты расходятся с полученными ранее данными на различных полипах Cnidaria. Так, серотонин находится во внутринейронных везикулах, нейромышечных и нервосинаптических синапсах у морского анемона *Aiptasia pallida*. У *Renilla coelikeri* серотонин выявлен в телах и отростках нейронообразных клеток, которые контактируют с нематоцитам щупалец (Kass-Simon et al., 2007). Нейропептиды семейства RF-амидов выявлены на полипоидных стадиях *Metridium senile*, *Hydra magnipapillata*, *Anthopleura elegantissima*, *Eirene viridula*, *Alcyonium digitatum* и *H. echinata* (Grimmelikhuijzen, 1983, 1985; Grimmelikhuijzen et al., 1991; Kass-Simon et al., 2007). В большинстве описанных случаев нейроны локализованы в области гипостома и в основании щупалец. У сцифистом *A. aurita* волокна, содержащие тирозинированный тубулин, выявлены в основании и в проксимальной половине щупалец. Возможно, в функционировании нервной системы сцифистом *A. aurita* принимают уча-

стие иные нейроактивные вещества, отличные от исследованных в рамках нашей работы. Кроме этого, есть вероятность, что у разных видов стрекочущих деградация нервных клеток планул в ходе метаморфоза имеет разную степень выраженности, а также могут несколько различаться механизмы самого метаморфоза. Все это может влиять на организацию нервной системы полипа.

Проведенные исследования позволили детально описать и проанализировать процесс метаморфоза планул *A. aurita*. Получены новые данные о формировании частей первичного полипа (сцифистомы) и высказаны предположения о возможных филогенетических связях процесса метаморфоза у сцифоидных и других групп стрекочущих. Впервые подробно исследована пространственная и временная динамика нейроактивных веществ в раннем развитии сцифоидных, что дает возможность не только обрисовать строение нервной системы, но и предположить роль нейроактивных веществ в развитии организма в целом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность за техническую помощь в выполнении работы проф. Г. Пликерту (Университет г. Кельна, ФРГ) (антитела к RF-амиду) и проф. Н. Дулину (Университет г. Чикаго, США); группе оптических методов исследования ИБР РАН за возможность использования конфокальной микроскопии; межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, контракт № П1291.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Догель В.А.* Зоология беспозвоночных: Учебник для ун-тов. Москва: Высшая школа, 1981. 603 с.
- Марфенин Н.Н., Косевич И.А.* Биология гидроида *Obelia loveni* (Allm.) (Сампанулярииды): образование колонии, поведение и жизненный цикл гидрантов, размножение // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16, Биология. 1984. № 3. С. 16–24.
- Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А.* Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. Санкт-Петербург: Наука, 1994. 400 с.
- Серавин Л.Н.* Альтернативные пути развития на ранних этапах эмбриогенеза у некоторых кишечнополостных // Ред.: Колтун В.М., Степаньянц С.Д. Губки и книдарии. Современное состояние и перспективы исследований. Л.: Зоол. ин-т АН СССР, 1988. С. 123–126.
- Серавин Л.Н.* Типы гастрюляции у Scyphozoa // Ред. Колтун В.М., Марфенин Н.Н., Степаньянц С.Д. 1989 4–8 сентября 1989 г. Беломорская биостанция МГУ. Зоологический институт АН СССР. С. 104–106.
- Ball E.E., Hayward D.C., Saint R. and others.* A simple plan – Cnidarians and the origins of developmental mechanisms // Nat. Rev. 2004. V. 5. P. 537–577.
- Boero F., Schierwater B., Piraino S.* Cnidarian milestones in metazoan evolution // ICB. 2007. V. 47. P. 693–700.
- Bosch T.C.* Ancient signals: peptides and the interpretation of positional information in ancestral metazoans // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2003. V. 136. № 2. P. 185–196.
- Bosch T.C.G., Fujisawa T.* Polyps, peptides and patterning // BioEssays. 2001. V. 23. № 5. P. 420–427.
- Brusca R.C., Brusca G.J.* Invertebrates. Sunderland: Sinauer, 2003. 936 p.
- Burton P.M., Pang K., Krone C. and others.* *Nematostella*: a model outgroup for Bilaterian evolution // Developmental Biology. 2004. V. 271. № 2. P. 554–554.
- Buznikov G.A., Lambert H.W., Lauder J.M.* Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis // Cell Tiss. Res. 2001. V. 305. P. 177–186.
- Buznikov G.A., Nikitina L.A., Voronezhskaya E.E. and others.* Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia) // Cell Tiss. Res. 2003. V. 311. P. 259–266.
- Buznikov G.A., Shmukler Y.B.* Possible role of “pre nervous” neurotransmitters in cellular interactions of early embryogenesis: a hypothesis // Neurochem. Res. 1981. V. 6. P. 55–68.
- Carre D., Carre C.* Origin of germ cells, sex determination, and sex inversion in medusae of the genus *Clytia* (Hydrozoa, Leptomedusae): The influence of temperature // J. Exp. Zool. 2000. V. 287. № 3. P. 233–242.
- Chapman D.M.* Microanatomy of the cubopolyp, *Tripedalia cystophora* (Class Cubozoa) // Helgol. Mar. Res. 1978. V. 31. № 1. P. 128–168.
- Chia F.-S., Koss R.* Fine structural studies of the nervous system and the apical organ in the planula larva of the sea anemone *Anthopleura elegantissima* // J. Morphology. 1979. V. 160. № 3. P. 275–297.
- Chourrout D., Delsuc F., Chourrout P. and others.* Minimal ProtoHox cluster inferred from bilaterian and cnidarian Hox complements // Nature. 2006. V. 442. № 7103. P. 684–687.
- Collins A.G., Cartwright P., McFadden C.S. and others.* Phylogenetic context and basal Metazoan model systems // Integr. Comp. Biol. 2005. V. 45. P. 585–594.
- Emanuelsson H.* Localization of serotonin in cleavage embryos of *Ophryotrocha labronica* La Greca and Bacci // Wilhelm Roux' Archiv. 1974. V. 175. P. 253–271.
- Fautin D.G.* Reproduction of Cnidaria // Can. J. Zool. 2002. V. 80. P. 1735–1754.
- Fautin D.G., Mariscal R.N.* Cnidaria: Anthozoa // Harrison F.W., Westfall J.A., editors. Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. New York: Wiley-Liss, Inc. 1991. P. 267–358.
- Finnerty J.R., Pang K., Burton P. and others.* Origins of bilateral symmetry: Hox and dpp expression in a sea anemone // Science. 2004. V. 304. P. 1335–1337.
- Frank U., Leitz T., Muller W.A.* The hydroid *Hydractinia*: a versatile, informative cnidarian representative // Bioessays. 2001. V. 23. № 10. P. 963–971.

- Freeman G., Stocum D.L., Karr T.L. The establishment and role of polarity during embryogenesis in Hydrozoans // The cellular and molecular biology of pattern formation. New York, Oxford: Oxford University Press, 1990. P. 3–30.
- Freeman G., Tardent P., Tardent R. The role of cleavage in the establishment of the anterior-posterior axis of the hydrozoan embryo // Dev. Cell. Biol. Coelenterates. Amsterdam: Elsevier/Horth-Holland Biomedical Press. 1980. P. 97–108.
- Fritzenwanker J.H., Technau U. Induction of gametogenesis in the basal cnidarian *Nematostella vectensis* (Anthozoa) // Dev. Genes Evol. 2002. V. 212. P. 99–103.
- Grimmelikhuijzen C.J. FMRamide immunoreactivity is generally occurring in the nervous systems of coelenterates // Histochemistry. 1983. V. 78. P. 361–381.
- Grimmelikhuijzen C.J.P. Antisera to the sequence Arg-Pheamide visualize neuronal centralization in hydroid polyps // Cell Tiss. Res. 1985. V. 241. P. 171–182.
- Grimmelikhuijzen C.J.P., Graff D., Koizumi O. and others. Neuropeptides in coelenterates: A review // Coelenterate Biology: Recent Research on Cnidaria and Ctenophora, 1991. P. 555–564.
- Gröger H., Schmid V. Larval development in Cnidaria: a connection to Bilateria? // Genesis. 2001. V. 29. № 3. P. 110–114.
- Gröger H., Schmid V. Nerve net differentiation in medusa development of *Podocoryne carnea* // Sci. Mar. 2000. V. 64. P. 107–116.
- Gröndahl F. Evidence of gregarious settlement of planula larvae of the scyphozoan *Aurelia aurita*: an experimental study // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1989. V. 56. P. 119–125.
- Hayward D.C., Miller D.J., Ball E.E. Snail expression during embryonic development of the coral *Acropora*: blurring the diploblast/triploblast divide? // Dev. Genes Evol. 2004. V. 214. № 5. P. 257–260.
- Hobmayer B., Rentzsch F., Kuhn K. and others. WNT signaling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra* // Nature. 2000. V. 407. № 6801. P. 186–189.
- Kass-Simon G., Pierobon P. Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview // Comp. Biochem. Physiol. A. 2007. V. 146. P. 9–25.
- Katsukura Y., Ando H., David C.N. and others. Control of planula migration by LWamide and RFamide neuropeptides in *Hydractinia echinata* // J. Exp. Zool. 2004. V. 207. P. 1803–1810.
- Kobayashi M., Wada H., Satoh N. Early evolution of the Metazoa and phylogenetic status of diploblasts as inferred from amino acid sequence of elongation factor-1 alpha // Mol. Phylogenet. Evol. 1996. V. 5. № 2. P. 414–422.
- Kozmik Z., Swamynathan S.K., Ruzickova J. and others. Cubozoan crystallins: evidence for convergent evolution of pax regulatory sequences // Evol. Dev. 2008. V. 10. № 1. P. 52–61.
- Kraus Y., Fritzenwanker J.H., Genikhovich G. and others. The blastoporal organiser of a sea anemone // Curr. Biol. 2007. V. 17. № 20. P. 874–876.
- Kroiher M., Plieckert G., Muller W.A. Pattern of cell proliferation in embryogenesis and planula development of *Hydractinia echinata* predicts postmetamorphic body pattern // Roux's Arch. Dev. Biol. 1990. V. 199. P. 156–163.
- Kumburegama S., Wijesena N., Xu R. et al., Strabismus-mediated primary archenteron invagination is uncoupled from Wnt/beta-catenin-dependent endoderm cell fate specification in *Nematostella vectensis* (Anthozoa, Cnidaria): Implications for the evolution of gastrulation // EvoDevo. 2011. V. 2. № 1. P. 2.
- Lesh-Laurie G.E., Suchy P.E. Cnidaria: Scyphozoa and Cubozoa // Harrison F.W., Westfall J.A., editors. Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. New York: Wiley-Liss, Inc., 1991. P. 185–266.
- Marlow H.Q., Srivastava M., Matus D.Q. and others. Anatomy and development of the nervous system of *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian // Dev. Neurobiol. 2009. V. 69. № 4. P. 235–254.
- Martin V.J., Chia F.S., Koss R. A fine structural study of metamorphosis of the hydrozoan *Mitrocomella polydiademata* // J. Morphol. 1983. V. 176. P. 261–287.
- Martin V.J. Development of nerve cells in hydrozoan planulae: II. Examination of sensory cell differentiation using electron microscopy and immunocytochemistry // Biol. Bull. 1988. V. 175. P. 65–78.
- Martin V.J. Characterization of a RFamide-positive subset of ganglionic cells in the hydrozoan planular nerve net // Cell Tissue Res. 1992a. V. 269. № 3. P. 431–438.
- Martin V.J. Characterization of a RFamide-positive subset of ganglionic cells in the hydrozoan planular nerve net // Cell Tissue Res. 1992b. V. 269. P. 431–438.
- Martin V.J. Reorganization of the nervous system during metamorphosis of a hydrozoan planula // Invert. Biol. 2000. V. 119. № 3. P. 243–253.
- Martin V.J., Chia F. Fine structure of a scyphozoan planula, *Cassiopeia xamachana* // Biol. Bull. 1982. V. 163. P. 320–328.
- Martindale M.Q., Finnerty J.R., Henry J.Q. The Radiata and the evolutionary origins of the bilaterian body plan // Mol. Phylogenet. Evol. 2002. V. 24. P. 358–365.
- McCauley D.W. Serotonin plays an early role in the metamorphosis of the hydrozoan *Phialidium gregarium* // Dev. Biol. 1997. V. 190. № 2. P. 229–240.
- Medina M., Collins A.G., Silberman J.D. and others. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA // PNAS. 2001. V. 98. № 17. P. 9707–9712.
- Miller D.J., Ball E.E. The coral *Acropora*: what it can contribute to our knowledge of metazoan evolution and the evolution of developmental processes // Bioessays. 2000a. V. 22. № 3. P. 291–296.
- Miller D.J., Dodd H., Berghammer H. and others. What molecular data tell us about the evolution of the “Coelenterata” // Proceedings of the 6th International Conference on Coelenterate Biology, 1995. 1997. P. 345–351.
- Miller D.J., Hayward D.C., Reece-Hoyes J.S. and others. Pax gene diversity in the basal cnidarian *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa): implications for the evolution of the Pax gene family // PNAS. 2000b. V. 97. № 9. P. 4475–4480.
- Millonig G. Study on the factors which influence preservation of fine structure // Buffa P., editor. Symposium on

- electron microscopy, 1964. Rome, Italy. Consiglio Nazionale delle Ricerche. 1964. P. 347.
- Nakanishi N., Yuan D., Jacobs D.K. and others. Early development, pattern, and reorganisation of the planula nervous system in *Aurelia* (Cnidaria, Scyphozoa) // Dev. Genes Evol. 2008. V. 218. P. 511–524.
- Plickert G., Kroehler M., Munck A. Cell proliferation and early differentiation during embryonic development and metamorphosis of *Hydractinia echinata* // Development. 1988. V. 103. № 4. P. 795–803.
- Schuchert P. Phylogenetic analysis of the Cnidaria // Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch. 1993. V. 31. № 3. P. 161–173.
- Seipel K., Schmid V. Evolution of striated muscle: Jellyfish and the origin of triploblasty // Dev. Biol. 2005. V. 282. № 1. P. 14–26.
- Seipp S., Schmich J., Kehrwald T. and others Metamorphosis of *Hydractinia echinata* – natural versus artificial induction and developmental plasticity // Dev. Genes Evol. 2007. V. 217. № 5. P. 385–394.
- Seipp S., Schmich J., Leitz T. Apoptosis – a death-inducing mechanism tightly linked with morphogenesis in *Hydractinia echinata* (Cnidaria, Hydrozoa) // Development. 2001. V. 128. № 23. P. 4891–4898.
- Seipp S., Schmich J., Will B. and others. Neuronal cell death during metamorphosis of *Hydractinia echinata* (Cnidaria, Hydrozoa) // Invert. Neurosc. 2010. V. 10. № 2. P. 77–91.
- Sommer C. Post-embryonic larval development and metamorphosis of the hydroid *Eudendrium racemosum* (Cavolini) (Hydrozoa, Cnidaria) // Helgol. Meeresunters. 1990. V. 44. № 3–4. P. 425–444.
- Spencer A.N. Peptides in the Hydrozoa: are they transmitters? // Hydrobiologia. 1991. V. 216/217. P. 565–571.
- Walther M., Ulrich R., Kroehler M. and others. Metamorphosis and pattern formation in *Hydractinia echinata*, a colonial hydroid // Int. J. Dev. Biol. 1996. V. 40. № 1. P. 313–322.
- Weis V.M., Keene D.R., Buss L.W. Biology of the hydractiniid hydroids. 4. Ultrastructure of the planula of *Hydractinia echinata* // Biol. Bull. 1985. V. 168. P. 403–418.
- Yuan D., Nakanishi N., Jacobs D.K. and others. Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan *Aurelia* // Dev. Genes Evol. 2008. V. 218. P. 525–539.
- Zega G., Pennati R., Fanzago A. and others. Serotonin involvement in the metamorphosis of the hydroid *Eudendrium racemosum* // Int. J. Dev. Biol. 2007. V. 51. № 4. P. 307–313.

On Some Features of Embryonic Development and Metamorphosis of *Aurelia Aurita* (Cnidaria, Scyphozoa)

T. D. Maiorova, I. A. Kosevich, and O.P. Melekhova

Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: ikosevich@gmail.com

Abstract—*Aurelia aurita* is a cosmopolite species of scyphomedusae. Its major structural patterns and life cycle are well investigated. This work provides a detailed study on development and structure of the planula in *A. aurita* until it completes its metamorphosis. Lifetime observations and histological study performed during the settlement and metamorphosis of the planulae demonstrated that the inner manubrium lumen of primary polyp (gastroderm) develops from the ectoderm of the planula posterior end. The spatial and temporal dynamics of serotonergic cells from the early embryonic stages until the formation of the primary polyp were studied for the first time. In addition, the distribution of tyrosinated tubulin and neuropeptide RFamide at different stages of *A. aurita* development were studied.

Keywords: ontogenesis, metamorphosis, nervous system, Scyphozoa, *Aurelia aurita*

УДК 591.3:612.617.1:611.631.3:577.175.624:599.323.41

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И РАЗВИТИЯ СЕМЕННИКОВ В ПОСТПУБЕРТАТНОМ ПЕРИОДЕ У МЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ РТ И СВА/Lac

© 2012 г. Н. В. Гуторова, М. А. Клещёв, Л. В. Осадчук

Институт цитологии и генетики СО РАН

630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 10

E-mail: losadch@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.07.11 г.

Окончательный вариант получен 26.01.12 г.

Цель настоящего исследования состояла в сравнительно-генетическом анализе развития семенников в постпубертатный период (с 70 по 90 день жизни) у самцов мышей инбредных линий РТ и СВА/Lac. Анализировали межлинейные различия по массе тела, семенников, уровню тестостерона в сыворотке периферической крови, количеству эпидидимальных сперматозоидов, площади семенного эпителия, просвета семенного канальца и островков клеток Лейдига. Обнаружено, что морфологические и гистоморфометрические параметры семенников у самцов линии РТ, в отличие от СВА/Lac, не достигали дефинитивного уровня с окончанием пубертатного периода, а продолжали увеличиваться до 90 дня жизни. Таким образом, у лабораторных мышей генетические различия в тестикулярном развитии продолжают формироваться в постпубертатный период.

Ключевые слова: онтогенез, морфометрия семенного канальца, клетки Лейдига, тестостерон, сперматозоиды, инбредные линии мышей.

Семенник млекопитающих является сложным органом, состоящим из семенных канальцев и интерстициальной ткани, которые соответственно продуцируют сперматозоиды и гормоны (Nel-Themaat et al., 2010). В семеннике можно выделить три важнейших типа клеток: половые клетки на разных стадиях развития, клетки Сертоли и Лейдига. Клетки Сертоли играют существенную роль в детерминации мужского пола и в поддержании сперматогенеза во взрослой жизни. Их пролиферация и дифференциация продолжается до начала половой зрелости, когда они прекращают делиться и начинают “выращивать” половые клетки (Petersen, Söder, 2006). Постнатальная дифференциация клеток Лейдига начинается у мышей приблизительно на 10-й день жизни. Формирование дефинитивной (“взрослой”) популяции клеток Лейдига включает несколько стадий: развитие клеток-предшественников (14–28 день жизни), формирование незрелых (28–56 день жизни) и “взрослых” клеток Лейдига (56 день жизни и далее) (Mendis-Handagama, Ariyaratne, 2001). Это отражается в изменении продукции тестостерона семенниками, а на гистологическом уровне может сопровождаться характерными изменениями морфометрических параметров.

В наших предыдущих исследованиях были обнаружены достоверные межлинейные различия по сперматогенной функции у взрослых самцов

мышей инбредных линий (Осадчук, 2010). При этом наиболее контрастными по гормональному потенциалу семенников оказались линии РТ и СВА/Lac (Дубовенко, Осадчук, 2010). Цель настоящей работы – установить межлинейные различия в стероидогенной и сперматогенной активности семенников в процессе постпубертатного развития у самцов мышей инбредных линий РТ и СВА/Lac, используя классический гистологический подход и традиционные физиологические методы оценки функциональной активности. В задачи исследования входило: провести морфометрический анализ гистологических препаратов поперечных срезов семенников; измерить уровень тестостерона в сыворотке крови; определить количество эпидидимальных сперматозоидов у самцов мышей в постпубертатный период онтогенеза; выявить межлинейные различия в гистоморфометрических, гормональных и сперматогенных параметрах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Условия эксперимента. Для исследования были взяты самцы ($n = 64$) двух инбредных линий РТ и СВА/Lac в возрасте 70, 80 и 90 дней, не имевшие сексуального опыта. Репродуктивные клетки формировали из трех самок и одного самца в возрасте 60 дней. Самок на последней неделе бере-

менности отсаживали в отдельные клетки, день родов считали первым днем жизни их потомства. Через неделю после родов число детенышей в помете корректировали до 4–7. Мышей выращивали в стандартных условиях вивария Института цитологии и генетики СО РАН при фиксированном световом режиме 12 ч/12 ч (день–ночь, соответственно) и температуре +22°C, воду и корм животные получали без ограничений. Молодняк отсаживали от матерей в возрасте 30 дней. Группы самцов одного возраста и одной и той же линии формировали из нескольких пометов, размер групп составлял 4–6 животных. Для снятия эффекта группового содержания, животных за 4 дня перед декапитацией отсаживали в индивидуальные клетки (изоляция). Перед отсадкой на изоляцию и декапитацией животных взвешивали. Из эксперимента самцов мышей выводили с соблюдением правил гуманного обращения с животными. Самцов декапитировали, собирали кровь, семенники извлекали и взвешивали. Сперматозоиды выделяли из каудальных эпидидимисов, помещали в раствор фосфатного буфера и окрашивали эозином согласно описанной ранее методике (Осадчук, 2010). Подсчет сперматозоидов производили в камере Горяева при увеличении $\times 200$.

Гистоморфометрический анализ поперечных срезов семенников. Один семенник, полученный от каждого самца, помещали в раствор Буэна для фиксации (17–18 часов при комнатной температуре под вытяжкой), после чего переносили в пробирку с 70% спиртом, где хранили при +4°C для последующего гистологического анализа. Исследуемый материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. На санном микротоме изготавливали серийные срезы толщиной 5–10 мкм и монтировали на предметные стекла смесь белка и глицерина в пропорции 1 : 1. Для получения обзорных препаратов срезы окрашивали гематоксилином Бемера и эозином. Препараты исследовали под световым микроскопом при увеличении $\times 200$.

Морфометрическое исследование гистологических препаратов поперечных срезов семенников проводили с использованием программного обеспечения Motic Image Inc. Измеряли общую площадь семенного канальца, площадь просвета семенного канальца, площадь островков клеток Лейдига, площадь сосудов и каверн в канальцах и островках клеток Лейдига. Площадь семенного эпителия рассчитывали как разницу площадей семенного канальца и его просвета, а суммарную площадь островков клеток Лейдига – как разницу суммарной площади островков клеток Лейдига и суммарной площади их сосудов.

Определение уровня тестостерона в сыворотке крови. Кровь центрифугировали 20 минут при 6000 об/мин и 4°C, свежую сыворотку отбирали в 1.5 мл пробирки типа Эппендорф, замораживали и хранили при –20°C до определения в ней тестостерона. Тестостерон в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием набора “Стероид ИФА-тестостерон-01” (Алкор Био, Санкт-Петербург).

Статистический анализ данных. Статистическую обработку данных проводили двухфакторным дисперсионным анализом (главные факторы – генотип и возраст) с использованием пакета программ “STATISTICA 8.0”. Различия между выборочными средними оценивали с использованием теста Duncan в рамках двухфакторного дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрия поперечных срезов семенников. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа площади семенного эпителия (главные факторы – генотип и возраст животных) позволили установить достоверное влияние генотипа ($F_{1,66} = 25.32, p < 0.001$), возраста ($F_{2,66} = 3.88, p < 0.05$) и достоверное взаимодействие факторов ($F_{2,66} = 6.57, p < 0.01$). Площадь семенного эпителия у мышей инбредной линии РТ на 70 и 80 день жизни была достоверно меньше, чем у 90-дневных животных ($p < 0.05$, рис. 1). На 70 и 80 день жизни площадь семенного эпителия у мышей линии СВА/Лас была достоверно больше, чем у РТ ($p < 0.05$), а на 90 день жизни межлинейных различий не обнаружено (рис. 1). Таким образом, у самцов линии СВА/Лас возрастные изменения с 70 по 90 день жизни по этому признаку отсутствуют, в то время как у самцов линии РТ наблюдается увеличение площади семенного эпителия в период между 70 и 90 днем постнатального онтогенеза.

Двухфакторный дисперсионный анализ площади просвета семенного канальца обнаружил достоверное влияние возраста ($F_{2,66} = 4.79, p < 0.05$) и достоверное взаимодействие факторов ($F_{2,66} = 4.04, p < 0.05$). Площадь просвета семенного канальца достоверно не отличалась у мышей линии РТ и СВА/Лас с 70 по 90 день постнатального онтогенеза (рис. 2). При этом значение параметра на 70 день у самцов линии РТ было достоверно меньше, чем у 90-дневных ($p < 0.05$), в то время как у самцов линии СВА/Лас возрастных различий не наблюдалось. Таким образом, к 70 дню постпубертатного периода у самцов линии СВА/Лас развитие этого признака завершилось.

В изученный период онтогенеза обнаружено достоверное влияние генотипа ($F_{1,66} = 29.67, p < 0.001$) на величину суммарной площади островков клеток Лейдига и достоверное взаимодей-

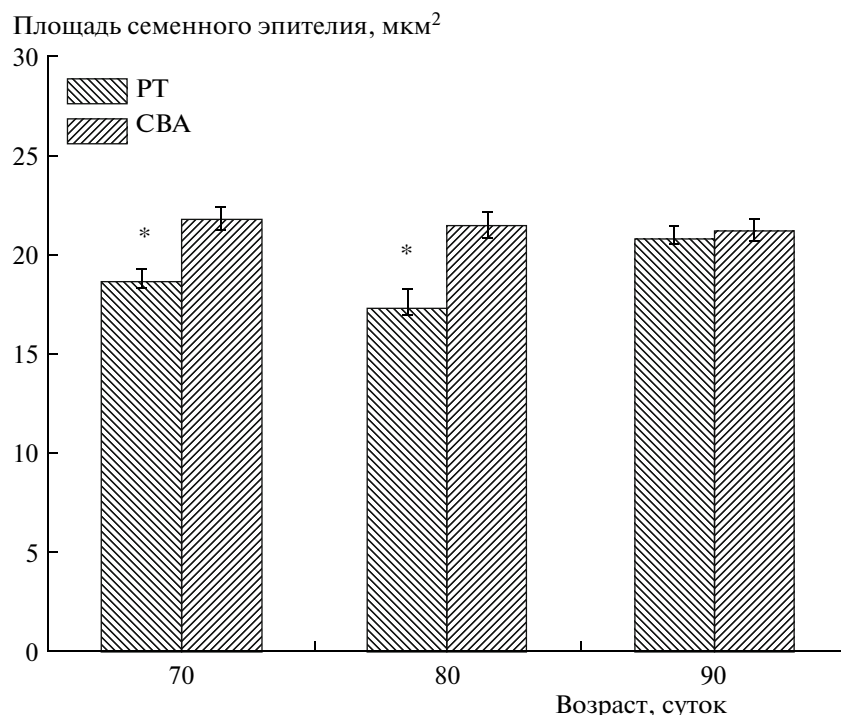


Рис. 1. Площадь семенного эпителия (по оси ординат, мкм²) у самцов мышей инбредных линий PT и CBA/Lac в постпубертатном периоде (по оси абсцисс, сут). Здесь и далее достоверность межлинейных различий у самцов одного возраста: * PT и CBA/Lac.

ствии факторов ($F_{2,66} = 4.60$, $p < 0.05$). Значение этого признака было достоверно выше у самцов линии PT по сравнению с CBA/Lac на 70 и 80 дни жизни ($p < 0.01$, таблица). Достоверных возрастных изменений суммарной площади островков клеток Лейдига у самцов линии CBA/Lac не обнаружено, а у самцов линии PT по этому признаку наблюдались достоверные различия между 70 и 80, а также 80 и 90 днями ($p < 0.01$, таблица).

Масса семенников и масса тела. Двухфакторный дисперсионный анализ массы семенников обнаружил достоверное влияние генотипа ($F_{1,56} = 41.20$, $p < 0.001$), возраста ($F_{2,56} = 4.60$, $p < 0.05$) и взаимодействие факторов ($F_{2,56} = 4.07$, $p < 0.05$). Самцы линии PT на 80 и 90 день жизни имели бо-

лее высокую массу семенников, чем CBA/Lac ($p < 0.01$, рис. 3). Масса семенников у самцов линии PT увеличивалась между 70 и 80, 80 и 90 днями жизни ($p < 0.05$). В то же время достоверных возрастных различий по массе семенников у самцов линии CBA/Lac не наблюдалось.

Обнаружено достоверное влияние возраста ($F_{2,54} = 31.23$, $p < 0.001$), генотипа ($F_{1,54} = 49.24$, $p < 0.001$), а также их взаимодействия ($F_{2,54} = 5.85$, $p < 0.01$) на массу тела. Масса тела достоверно отличалась у самцов обеих линий ($p < 0.05$) на 70 и 90 дни постнатального онтогенеза (рис. 4), внутрилинейные возрастные различия наблюдались у самцов линии PT между 70 и 80 днем ($p < 0.05$), а у

Уровень тестостерона в сыворотке крови (нг/мл) и суммарная площадь островков клеток Лейдига (мкм²) у самцов мышей инбредных линий PT и CBA/Lac в постпубертатном периоде

Показатель	Линия	Возраст, дней		
		70	80	90
Уровень тестостерона	PT	1.09 ± 0.63	3.12 ± 1.33	3.39 ± 1.53
	CBA/Lac	2.85 ± 1.13	3.14 ± 1.32	3.16 ± 0.52
Суммарная площадь островков клеток Лейдига	PT	10.51 ± 0.54*	11.16 ± 1.17*	10.09 ± 0.52
	CBA/Lac	7.66 ± 0.29	7.71 ± 0.49	8.45 ± 0.30

Примечание: * – обозначена достоверность межлинейных различий, $p < 0.05$.

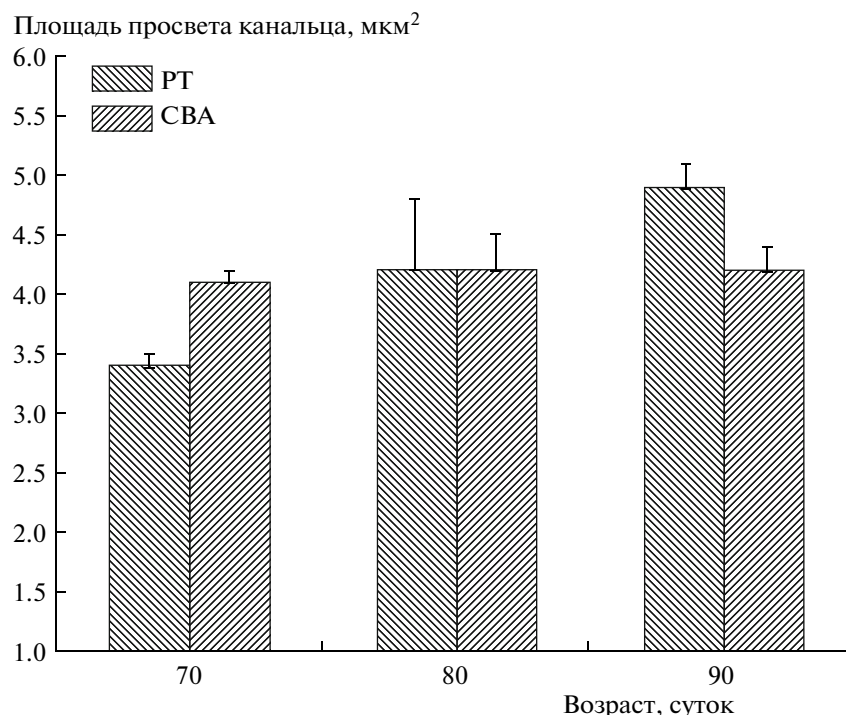


Рис. 2. Площадь просвета семенного канальца (по оси ординат, $\mu\text{м}^2$) у самцов мышей инбредных линий РТ и СВА/Лас в постпубертатном периоде (по оси абсцисс, сут).

самцов линии СВА/Лас между 80 и 90 днями ($p < 0.05$).

Уровень тестостерона и количество эпидидимальных сперматозоидов. Статистический анализ уровня тестостерона в сыворотке крови не позволил установить межлинейные и возрастные изменения (таблица). Количество эпидидимальных сперматозоидов у самцов линии РТ и СВА/Лас достоверно различались на протяжении всего изучаемого периода с 70 по 90 день, при этом достоверных возрастных изменений обнаружено не было (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что половое созревание означает переходный период между сексуально неполнозрелым состоянием и состоянием полной репродуктивной активности, что выражается в значительном увеличении веса и линейных размеров тела (Terasawa, Fernandez, 2001). По существующим в литературе представлениям, гормональная функция взрослых клеток Лейдига у мышей заканчивает свое формирование к 56–60 дню постнатального онтогенеза, когда популяция “взрослых” клеток Лейдига секретирует тестостерон в значительных количествах (Dong et al., 2007).

Полученные нами результаты показывают, что у самцов линии СВА/Лас морфогистологические параметры семенников, такие как площадь се-

менного эпителия, просвета семенного канальца и островков клеток Лейдига мало меняются в постпубертатный период от 70 до 90 дня жизни, в то время как у самцов линии РТ на протяжении этого периода наблюдалось увеличение всех трех параметров. В тот же период онтогенеза наблюдались межлинейные различия по массе семенников: у самцов линии РТ масса семенников продолжала увеличиваться от 70 до 80 дня жизни, в то время как у СВА/Лас – оставалась на одном уровне.

Известно, что масса и морфофункциональные характеристики семенников взаимосвязаны, и масса семенников может служить маркером полового созревания (Argyropoulos, Shire, 1989; Chubb, 1992; Le Roy et al., 2001). Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о генетических особенностях полового созревания у лабораторных мышей. На основании полученных данных можно предполагать, что морфофункциональное созревание семенников у самцов линии РТ длится значительно дольше, чем у СВА/Лас и выходит за рамки общепринятой временной классификации полового созревания.

Как известно, количество клеток Сертоли и гоноцитов, которые составляют основную массу семенного эпителия, детерминирует продукцию сперматозоидов и в конечном итоге – репродуктивную эффективность самцов (Chubb, 1992; Petersen, Söder, 2006; Leal, Franc, 2009). В нашем исследовании обращает на себя внимание большее

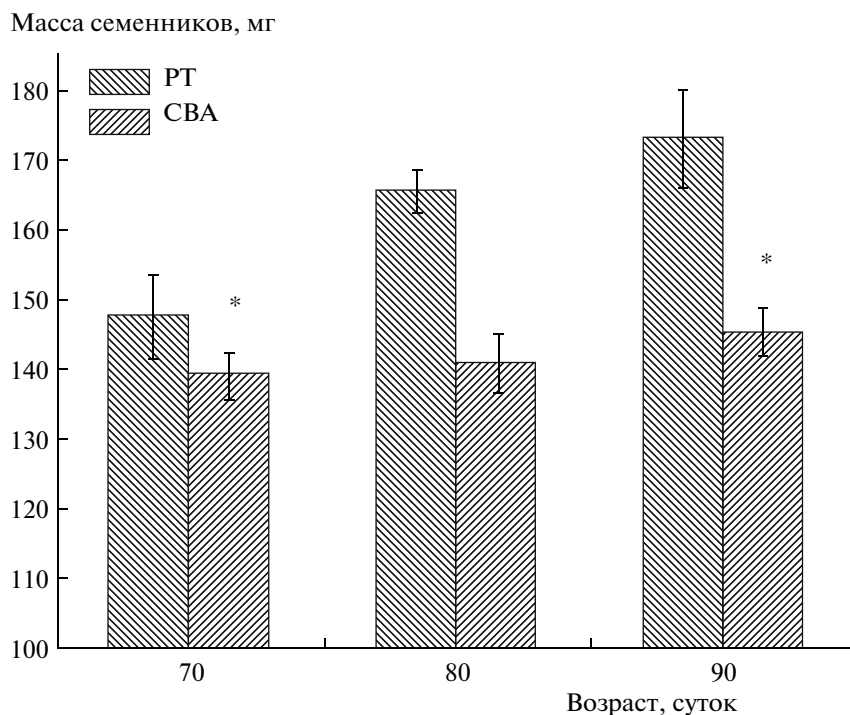


Рис. 3. Масса семенников (по оси ординат, мг) у самцов мышей инбредных линий РТ и СВА/Лас в постпубертатном периоде (по оси абсцисс, сут).

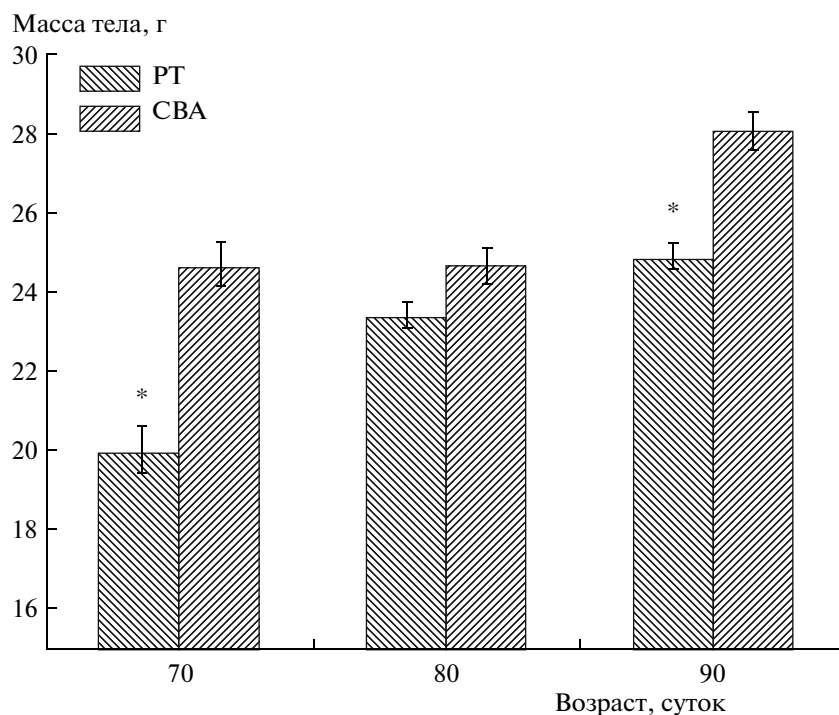


Рис. 4. Масса тела (по оси ординат, г) у самцов мышей инбредных линий РТ и СВА/Лас в постпубертатном периоде (по оси абсцисс, сут).

количество эпидидимальных сперматозоидов у мышей линии РТ по сравнению с СВА/Лас на протяжении всего изучаемого периода. При этом большая площадь семенного эпителия наблюда-

лась у самцов линии СВА/Лас по сравнению с РТ на 70 и 80 дни жизни, указывая на тот факт, что этот показатель не может служить маркером эффективности сперматогенеза. Действительно,

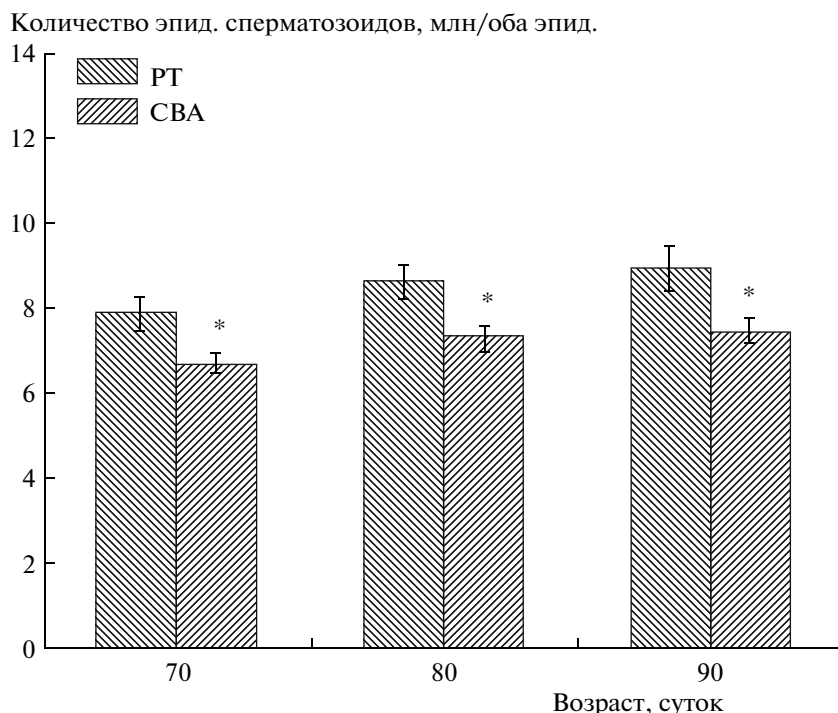


Рис. 5. Количество эпидидимальных сперматозоидов (по оси ординат, млн/оба эпидидимиса) у самцов мышей инбредных линий PT и CBA/Lac в постпубертатном периоде (по оси абсцисс, сут).

продукция сперматозоидов может в значительной степени определяться не толщиной сперматогенного эпителия, а длиной семенных канальцев и объемом (весом) семенников.

Известно, что важные аспекты функционирования клеток Сертоли, такие как митоз, дифференциация, синтез эстрадиола и андроген-связывающего протеина, а также секреция канальцевой жидкости и факторов роста являются зависимыми от продукции тестостерона (Bardin et al., 1994). Чтобы установить связь между тестикулярной продукцией тестостерона и гистоморфологическими показателями, мы исследовали суммарную площадь клеток Лейдига на поперечных срезах семенников. Обнаружены межлинейные различия в площади клеток Лейдига на 70 и 80 день жизни, однако по уровню тестостерона в сыворотке крови межлинейных различий не было найдено. Таким образом, в этот период онтогенеза гистоморфологические показатели клеток Лейдига не коррелируют с уровнем тестостерона в сыворотке крови. С другой стороны, базальный уровень тестостерона может не отражать гормональный потенциал семенников, что подтверждается реакцией семенников на введение ХГ, к которому имеют сродство ЛГ-рецепторы клеток Лейдига (Осадчук, Свешников, 1998; Дубовенко, Осадчук, 2010). Сравнение гормонального потенциала клеток Лейдига показало их более высокую функциональную активность у самцов мышей

линии PT по сравнению с CBA/Lac (Осадчук, Свешников, 1998; Дубовенко, Осадчук, 2010).

Таким образом, в настоящей работе у самцов лабораторных мышей были обнаружены генетические различия в паттерне морфологических и гистоморфометрических параметров тестикулярного развития в постпубертатный период.

Выражаем благодарность за помощь в подготовке гистологических препаратов д.б.н. А.В. Сахарову, к.б.н. А.А. Макееву Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-04-00930).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дубовенко Е.А., Осадчук Л.В. Гормональная реакция семенников на хорионический гонадотропин у мышей инбредных линий CBA/Lac и PT: эффект дозы и времени после введения препарата // Бюллетень эксп. биологии и медицины. 2010. Т. 150. № 8. С. 194–198.
- Осадчук Л.В. Межлинейные различия в формировании генеративной функции в период полового созревания у самцов мышей // Онтогенез. 2010. Т. 41. Вып. 3. С. 213–220.
- Осадчук А.В., Свешников К.В. Генетический контроль активности микросомальных ферментов стероидогенеза в клетках Лейдига инбредных линий мышей // Генетика. 1998. Т. 34. № 9. С. 1277–1285.

- Argyropoulos G., Shire J.G.M.* Genotypic effects on gonadal size in fetal mice // *J. Reprod. Fertil.* 1989. V. 86. P. 473–478.
- Bardin C.W., Cheng C.Y., Mustow N.A. et al.* The Sertoli cell // *The Physiology of Reproduction* / Eds. Knobil E., Neil J.D. N.Y.: Raven Press Ltd., 1994. P. 1291–1331.
- Chubb C.* Genes regulating testis size // *Biol. Reprod.* 1992. V. 47. P. 29–36.
- Dong L., Jelinsky S.A., Finger J.N. et al.* Gene expression during development of fetal and adult Leydig cells // *Ann N.Y. Acad. Sci.* 2007. V. 1120. P. 16–35.
- Leal M.C., Franc L.R.* Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent *Chinchilla lanigera* // *Theriogenology.* 2009. V. 71. P. 509–518.
- Le Roy I., Tordjman S., Migliore-Samour D. et al.* Genetic Architecture of Testis and Seminal Vesicle Weights in Mice // *Genetics.* 2001. V. 158. P. 333–340.
- Mendis-Handagama C.S.M.L., Ariyaratne S.H.B.* Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis // *Biology of Reproduction.* 2001. V. 65. P. 660–671.
- Nel-Themaat L., Gonzalez G., Akiyama H., Behringer R.R.* Illuminating testis morphogenesis in the mouse // *J. Androl.* 2010. V. 31. P. 5–10.
- Petersen C., Söder O.* The Sertoli Cell – A Hormonal Target and “Super” Nurse for Germ Cells That Determines Testicular Size // *Horm. Res.* 2006. V. 66. P. 153–161.
- Terasawa E., Fernandez D.L.* Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates // *Endocrinol. Rev.* 2001. V. 22. P. 111–151.

Growth and Development Peculiarities of Testicles in Inbred Mice Lines PT and CBA/Lac

N. V. Gutorova, M. A. Kleshchev, and L. V. Osadchuk

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia
e-mail: losadch@bionet.nsc.ru*

Abstract—The goal of this study is to perform a comparative genetic investigation of testicle development during the postpubescence period (from days 70 to 90 of life) in the inbred mice lines PT and CBA/Lac. Interlinear differences in the body and testicular weight, serum testosterone concentration, number of epididymal spermatozoa, area of testicular epithelium, semeniferous tubule lumen, and insulae of Leydig cells were analyzed. It was found that the morphological and histomorphometric parameters of testicles in males from the PT line compared to the males of the CBA/Lac line did not reach a definitive stage with the end of the postpubescence period and kept on developing until day 90 of life. Therefore, genetic differences remain in the postpubertal testicular development of laboratory mice.

Keywords: ontogenesis, morphometry of semen tubules, Leydig cells, testosterone, spermatozoa, inbred mice lines

УДК 574.3+591.3+57.02

РЕПРОДУКТИВНЫЙ УСПЕХ САМЦОВ АУТБРЕДНОЙ ЛИНИИ ICR ПРИ РАЗМНОЖЕНИИ НА ФОНЕ АНТИГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ

© 2012 г. Л. А. Герлинская*, С. О. Масленникова, Е. Л. Завьялов, Г. В. Концевая, М. П. Мошкин

Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д. 10

**Институт систематики и экологии животных СО РАН, 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 11*

Томский государственный университет, 634050, Томск, пр. Ленина, 36

E-mail: lgerlinskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 11.03.11 г.

Окончательный вариант получен 28.12.11 г.

Многообразие вирусов, бактерий, микроскопических грибов, эндо- и эктопаразитов являются неизбежным фактором среды, чье влияние на воспроизводство хозяев определяется не только негативными эффектами инфекционных болезней, но и активацией защитных механизмов, обеспечивающих противостояние прессу паразитов. В данной работе для изучения репродуктивных последствий антигенной стимуляции особей мужского пола, самцам аутбредной линии ICR вводили гемоцианин. На начальном этапе антителообразования к контрольным и антигенстимулированным самцам подсаживали интактных самок. В течение 6-ти дней совместного содержания у самок, подсаженных к самцам, которым вводили гемоцианин, было зарегистрировано достоверно большее число овулировавших яйцеклеток и живых эмбрионов по сравнению с теоретически ожидаемым для равного репродуктивного выхода. Самки, покрытые антигенстимулированными самцами, вынашивали более крупных эмбрионов по сравнению с таковыми в контроле. Показатели плодовитости самок зависели от преобладания у антигенстимулированных самцов клеточного (Th1) или гуморального (Th2) иммунных ответов. Смещение Th1/Th2 баланса приводило к тому, что у самок, покрытых самцами с преобладанием клеточного иммунного ответа, были более высокие доимплантационные эмбриональные потери, но они вынашивали более крупных эмбрионов. Таким образом, установлено, что активация иммунной системы самцов сама по себе влияет на их репродуктивные способности. Это позволяет, с одной стороны, объяснить вклад защитных реакций организма в повышение фертильности млекопитающих, населяющих территории с высоким видовым обилием паразитов, а, с другой, показывает новые пути управления размножением животных, разводимых под контролем человека.

Ключевые слова: гемоцианин, антигенная стимуляция самцов, беременность, эмбриональные потери, масса эмбрионов, иммунный ответ, Th1, Th2, IgG1, IgG2a.

Многочисленные клинические, ветеринарные и экологические наблюдения свидетельствуют о негативном влиянии инфекций и паразитарных болезней на репродуктивные характеристики особей обоего пола (Benfield et al., 1992; Feore et al., 1997; Deter, et al., 2007; Fichorova, 2009; Nour, 2010). Это положение подкрепляют результаты экспериментального заражения лабораторных животных, согласно которым инфицирование приводит к снижению внешней привлекательности потенциальных брачных партнеров (Kavaliers, Colwell, 1995; Willis, Poulin, 2000), подавляет гаметогенез и половое поведение (Weiss et al., 2009; Arteaga-Silva et al., 2009), а также повышает риск до и постимплантационной гибели эмбрионов (Fitzgerald, Shellam, 1992; Moshkin et al., 2002).

Следовательно, увеличение паразитарного пресса должно приводить к сокращению воспроизводства в популяциях хозяев. Вместе с тем, тщательный анализ рождаемости в 150 этнических группах людей свидетельствует об обратном (Guegan et al., 2001). Используя статистические

приемы, которые позволяют нивелировать влияние факторов, связанных с образом жизни (характер питания, религиозная принадлежность, уровень образования и др.), авторы показывают, что фактическая плодовитость женщин находится в прямой зависимости от видового разнообразия возбудителей паразитарных и инфекционных болезней на территории проживания исследуемых групп. Более того, не только общее число детей, но и масса новорожденных имеют нелинейную зависимость от биоразнообразия паразитов (Thomas et al., 2004). Самые крупные дети рождаются в этнических группах, живущих в условиях минимального паразитарного окружения, а самые маленькие при близком к среднему видовому разнообразию паразитов. Далее масса тела новорожденных возрастает пропорционально росту паразитарного обилия.

При обсуждении полученных результатов авторы акцентируют внимание на возможности адаптивной селекции, которая обеспечивает устойчивое существование популяций в условиях

видового обилия паразитов и которая предполагает генетически детерминированные межпопуляционные различия по репродуктивным параметрам (Guegan et al., 2001; Thomas et al., 2004). Однако не исключено, что в формирование данного феномена вносят вклад не только микроэволюционные преобразования. Разнообразие паразитических видов может положительно влиять на плодовитость хозяев, как следствие иммунофизиологического реагирования на интервенцию паразитов, сформировавшихся в ходе паразит-хозяинной коэволюции. Обилие паразитов в сочетании с разнообразной комменсальной микрофлорой неизбежно активирует системы иммунной защиты. При этом далеко не во всех случаях интервенции вирусов, бактерий, экто- и эндопаразитов приводят к болезни. Иными словами, оценивая репродуктивные последствия существования в среде с большим разнообразием паразитов нужно четко разграничить собственные эффекты инфекционных болезней, включая гельминтозы, от эффектов мобилизации различных звеньев иммунной системы.

Одним из подходов, который позволяет исследовать вклад защитных процессов в репродукцию, заключается в использовании чужеродных не реплицируемых антигенов. Их введение позволяет оценить как, в зависимости от фазы иммунного ответа и преобладающего варианта иммунного реагирования, изменяются вторичные половые признаки, определяющие привлекательность партнера, а также эффективность спаривания, вынашивания и выкармливания потомков. Первые результаты, указывающие на возможность позитивного влияния антигенной стимуляции на процессы беременности, были получены при изучении влияния иммуногенетических различий в системе мать-плод на жизнеспособность эмбрионов (Billington, 1964; James, 1967). Последующие результаты оказались не столь оптимистичными, поскольку подтвердить данные Джеймса (James, 1967) не удалось (Clarke, 1971; Netherington, Humber, 1975; Netherington 1978, Ho et al., 1994). В этих работах, выполненных на инбредных линиях мышей, самкам в разные сроки после внутрилинейных скрещиваний вводили либо клетки селезенки, либо эритроциты самцов иной генетической принадлежности. Противоречивость полученных результатов отчасти объясняется тем, что разные авторы вводили чужеродные антигены на постимплантационной стадии беременности. В более поздних работах учет сроков становления иммуногенетического диалога матери и плода, который начинается с экспрессии генов гистосовместимости уже на 2-х клеточной стадии развития (Goldbard et al., 1985; Warner, Gollnick, 1993), позволил воспроизвести показанные Джеймсом (1967) положительные эффекты антигенной стимуляции. Так, в исследовании Герлинской и соавт. (Gerlinskaya et al., 2000) было

установлено, что введение инбредным самкам линии BALB/c на 2-е сутки после внутрилинейного скрещивания эритроцитов, взятых от самцов линии C57Bl, приводит к увеличению массы тела эмбрионов и к снижению постнатальной гибели новорожденных. Учитывая общность иммунных процессов, развертывающихся в ответ на самые разнообразные антигенные стимулы, можно предположить, что и паразитарные антигены, с которыми сталкивается материнская иммунная система, могут в зависимости от стадии беременности оказать положительное влияние на вынашивание и выкармливание потомков. Если при этом эффективность иммунной защиты будет достаточной для предотвращения инфекционной болезни.

Следует отметить, что риск столкновения с паразитами, как правило, выше у особей мужского пола, чем женского (Zuk, McKean, 1996). Тем не менее, исследования репродуктивных эффектов, обусловленных стимуляцией защитных механизмов самцов, ограничиваются, главным образом, работами, посвященными сигнальной привлекательности представителей мужского пола (Moshkin et al., 2000, 2002; Faivre et al., 2003; Zala et al., 2004; Garamszegi et al., 2004; Litvinova et al., 2005; Akakawa et al., 2009, 2010). Лишь в единичных исследованиях анализируется влияние антигенной стимуляции самцов на вероятность фертильного покрытия и последующее развитие потомков. В частности, активация неспецифического иммунитета введением бактериального липополисахарида (ЛПС) повышала общий репродуктивный выход у самцов олуши, причем только у старых особей (Velando et al., 2006). В опытах на мышах аутбредной линии ICR было установлено, что введение самцам ЛПС вызывает в первые часы подавление половой активности, но к концу 5-х суток совместного содержания самца с самками общее число фертильных покрытий и число живых эмбрионов не различается в контрольной и экспериментальной группах (Мошкин и др., 2009). При этом у интактных самок, покрытых ЛПС стимулированными самцами, отмечено снижение до- и постимплантационных эмбриональных потерь. Еще более выраженные репродуктивные эффекты были получены при подсадке интактных самок к самцам, чья иммунная система была активирована введением эритроцитов барана (ЭБ). При практической одинаковом числе фертильных покрытий спаривание с антигенстимулированными самцами характеризовалось большей потенциальной (число овулировавших яйцеклеток) и фактической плодовитостью самок (Мошкин и др., 2010). Причем основные репродуктивные эффекты антигенной стимуляции самцов приходились на 3–5-е сут после введения ЭБ, т.е. на период, соответствующий началу специфического антителообразования. Сопоставляя результаты экспериментов с введением ЛПС и ЭБ, можно заключить, что репродуктивные эф-

факты, обусловленные активацией защитных механизмов, зависят от характера иммунной реакции. При активации неспецифического иммунитета самцов (введение ЛПС) у покрытых ими самок падают эмбриональные потери, а при развитии специфического иммунного ответа (введение ЭБ) увеличивается потенциальная и фактическая плодовитость.

Не вызывает сомнения, что в реализации репродуктивных эффектов при антигенной стимуляции принимают участие цитокины, которые вырабатываются активированными иммунокомпетентными клетками и влияют на многие нейроэндокринные процессы, включая регуляцию гаметогенеза и полового поведения (Larson, Dunn, 2001; Sarkar et al., 2011). Профиль секретируемых цитокинов может существенно различаться в зависимости от преобладания клеточного (Th1) или гуморального (Th2) иммунных ответов (Fietta, Delsante, 2009). В этой связи возникает вопрос, с преобладанием какого типа иммунного реагирования коррелируют репродуктивные эффекты, обусловленные введением чужеродных антигенов. Одним из интегральных критериев доминирования Th1 или Th2 вариантов иммунного ответа является определение изотипов иммуноглобулинов (IgG). Антителообразование при клеточном (Th1) иммунном ответе приводит к повышению титра IgG2a, а при гуморальном (Th2) титра IgG1 (Gargaud et al., 2003).

В данной работе, выполненной на мышах аутбредной линии ICR, мы вводили самцам гемоцианин и использовали коммерчески доступные реактивы для определения изотипов антител (IgG2a и IgG1), специфических к данному антигену. Учитывая то обстоятельство, что наиболее выраженные позитивные изменения фертильности наблюдаются при спаривании, происходящим вслед за началом антителообразования, интактных самок подсаживали к самцам через 3-е суток после введения антигена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Исследование выполнено в марте–апреле 2010 г на лабораторных мышах аутбредной линии ICR в возрасте 3-месяцев, полученных из вивария ИЦиГ СО РАН. Самцов и самок содержали в изолированных помещениях с раздельной вентиляцией при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$ и искусственном фотопериоде 14С:10Т (свет включался в 18 ч местного времени). Сухие древесные опилки использовали в качестве подстилочного материала. Стандартный брикетированный корм и воду животные получали *ad libitum*. За 2 недели до начала эксперимента самцы были рассажены по одному, а самки по 5 особей в пластиковые клетки ($25 \times 35 \times 8$). Для поддержания устойчивых эстральных циклов в клетки самок ежедневно, перед выключением све-

та (в 17.30 ч местного времени) добавляли подстилку из клеток самцов.

Экспериментальные модели

Эксперимент 1. Изучение начальных стадий специфического антителообразования при инъекции гемоцианина. Исследование выполнено на 2-х группах самцов – экспериментальной и контрольной. Самцам (11 особей) экспериментальной группы вводили внутривентриально в дозе 50 мкг на мышь гемоцианин (KLH – Keyhole Limpet Hemocyanin, Sigma). Контрольной группе – 8 самцов вводили физиологический раствор. На 3-и сут после инъекций гемоцианина и физиологического раствора декапитировали 9 животных (4 контрольных и 5 экспериментальных), а на 6-е сут 10 животных – 4 и 6 соответственно. В момент декапитации собирали кровь, которую для получения плазмы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин, плазму крови хранили при -20°C до проведения анализов по определению уровня изотипов антител – IgG1 и IgG2a.

Эксперимент 2. Исследование репродуктивной эффективности самцов при антигенной стимуляции гемоцианином. Из самцов приблизительно равного веса было сформировано 2 группы (экспериментальная и контрольная) по 19 особей в каждой группе. Самцам экспериментальной группы внутривентриально вводили гемоцианин в дозе, описанной выше, а контрольной группе в это же время вводили физиологический раствор. Весь эксперимент выполняли в 4 этапа, каждый из которых начинали с одновременного введения препаратов одинаковому числу контрольных и экспериментальных животных. На 3-е сутки после инъекций гемоцианина или физиологического раствора, к каждому самцу из экспериментальной и контрольной групп, сразу после отключения света, подсаживали по 2 самки и далее, в течение 6-ти сут, содержали совместно. Ежедневно с 4-х по 9-е сут после введения гемоцианина самок осматривали на наличие вагинальной пробки и при обнаружении таковой отсаживали в отдельные клетки. День отсадки считали первым днем беременности. Осмотр проводили по окончании каждой ночи. Для исключения возможных ошибок в определении покрытия всех самок, оставшихся непокрытыми, помещали в индивидуальные клетки.

На 9-е сут после инъекции гемоцианина или физиологического раствора у самцов брали при декапитации образцы плазмы крови для определения специфических антител IgG.

Определение уровня специфических к гемоцианину изотипов IgG1 и IgG2a

Уровень специфических антител анти-KLH IgG1 и анти-KLH IgG2a определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В качестве негативного контроля использовали плазму крови контрольных самцов. В

лунки иммунологических планшет вносили по 50 мкл гемоцианина (KLH, Sigma) в концентрации 10 мг/мл фосфатного буфера, инкубировали 24 часа при +4°C и промывали фосфатным буфером с Твином-20 (0.01%). В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл 1% блокирующего раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в фосфатном буфере, инкубировали 2 часа при комнатной температуре и промывали фосфатным буфером с Твином-20 (0.01%).

Уровень IgG1 и IgG2a определяли в образцах плазмы иммунизированных животных после предварительного титрования. Для титрования использовали образец пулированный от 10 иммунизированных самцов. По результатам титрования было определено оптимальное разведение 1 : 3200, которое было использовано в дальнейшем при определении уровня IgG1 и IgG2a. Каждый образец плазмы вносили в дублях по 100 мкл для определения IgG1 и также в дублях для определения IgG2a в лунки планшета, покрытые гемоцианином. Планшеты с образцами плазмы инкубировали 3 ч при +37°C и после инкубации промывали фосфатным буфером с Твином-20.

Вторичные биотинилированные антитела (BD Biosciences) IgG1 и IgG2a (разведение 1/26000, 1/7000 соответственно) вносили по 100 мкл и инкубировали 1 ч при +37°C. После инкубации планшеты были вновь промыты и в каждую лунку внесено по 50 мкл конъюгата (стрептавидин-пероксидаза 1 : 15000). После инкубации в течение 1 час при +37°C и последующей промывки в каждую лунку вносили по 100 мкл субстрата (тетраметилбензидин – Sigma), инкубировали в темноте при комнатной температуре 30 мин. Ферментативную реакцию останавливали 100 мкл стоп реагента. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на планшетном фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Оптическая плотность образцов варьировала от 0.025 до 2.700. Условные единицы (у.е.), которым соответствовали значения оптической плотности, а также их отношение для IgG2a и IgG1, были использованы при статистической обработке.

Беременность и развитие зародышей

На 16-е сут беременности самок декапитировали и определяли число желтых тел и общее число эмбрионов с учетом резорбированных и живых зародышей. На основе разницы между числом овулировавших клеток и общим числом эмбрионов вычисляли процент доимплантационных потерь, а разницу общего числа зародышей и живых эмбрионов использовали для расчета постимплантационных потерь. Соответственно, общие потери вычисляли на основе разницы числа яйцеклеток и числа живых зародышей. Эмбрионов без видимых признаков нарушения развития извлекали, отделяли от плацент и взвешивали. Кри-

терием фертильного покрытия считали наличие желтых тел в яйчниках вскрытых самок.

Статистические методы анализа данных

Для нормально распределенных признаков влияние контролируемых факторов на изучаемые показатели оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и ковариационного анализа. Множественное сравнение средних значений признаков проводили на основе критерия наименьшей статистической разницы (least significant difference – LSD тест). Два средних значения нормально распределенных признаков сравнивали по *t*-критерию Стьюдента. Для ненормально распределенных признаков использовали критерий Краскала-Уоллиса. Сравнение частот проводили с помощью критерия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика иммунного ответа на введение гемоцианина (KLH)

Специфические анти-KLH IgG2a и анти-KLH IgG1 детектировались в плазме крови самцов уже на 3-и сутки после введения гемоцианина (табл. 1). Содержание IgG1 достигало максимальных значений на 6-е сутки и далее практически не изменялось. Уровень IgG2a также имел тенденцию к увеличению на 6-е сутки, но далее снижался к 9-м суткам после введения препарата. На ранней стадии иммунного ответа (3-и сутки), судя по отношению IgG2a/IgG1, преобладали антитела, вырабатываемые при клеточном (Th1) иммунном ответе, а в более поздние сроки (6 и 9 сутки) возрастал вклад антител, продуцируемых при гуморальном (Th2) ответе.

Репродуктивная эффективность самцов

Как следует из кумулятивных кривых, отражающих долю фертильных спариваний от максимально возможного значения (рис. 1А), к концу совместного содержания антигенстимулированные самцы покрыли в 1.8 раза больше самок, чем контрольные. Эти различия были близки к статистически значимым – $\chi^2 = 3.61$, $p = 0.057$.

Накопление числа овулировавших яйцеклеток и числа живых эмбрионов, зарегистрированных у самок в ходе совместного содержания, показало, что в первые 2-е суток контрольные самцы превосходили антигенстимулированных по репродуктивной эффективности (рис. 1Б, В). Однако затем показатели репродуктивного выхода возрастали быстрее у самок, подсаженных к антигенстимулированным самцам (рис. 1Б, В). Поэтому к концу эксперимента суммарное число овулировавших яйцеклеток, общее число зародышей, включая резорбированных, и число живых эмбрионов были существенно выше у самок, содержащихся с антигенстимулированными самцами

Таблица 1. Содержание в плазме крови анти-KLN IgG1 и анти-KLN IgG2a, а также их соотношение в разные сроки после введения самцам мышей гемоцианина

Показатели	Время после введения KLN, сутки			Достоверность различий*
	3 (<i>n</i> = 5)	6 (<i>n</i> = 6)	9 (<i>n</i> = 19)	
IgG1, у.е.	0.14 ± 0.03	0.93 ± 0.31	0.87 ± 0.18	<i>H</i> = 6.12; <i>p</i> = 0.047
IgG2a, у.е.	0.26 ± 0.05	0.80 ± 0.27	0.41 ± 0.13	<i>H</i> = 5.01; <i>p</i> = 0.082
IgG2a/IgG1	2.06 ± 0.38	0.96 ± 0.12	0.59 ± 0.12	<i>H</i> = 13.46; <i>p</i> = 0.001

* – критерий Краскела-Валлиса.

по сравнению с таковыми в группе самок, содержащихся с контрольными самцами (рис. 1Б, В и табл. 2). Вместе с тем, у самок, покрытых антигенстимулированными самцами, был отмечен рост эмбриональных потерь, главным образом на доимплантационной стадии развития (табл. 2).

Межгрупповые различия по общему репродуктивному выходу были обусловлены, главным образом, тем, что в контрольной группе, числом фертильных покрытий при подсадке самок к антигенстимулированным самцам. В свою очередь показатели плодовитости, рассчитанные на одну самку, были практически одинаковыми при покрытиях контрольными (*n* = 10) и антигенстимулированными (*n* = 18) самцами. Число овулировавших яйцеклеток составило 9.7 ± 0.65 в контрольной группе самок и 9.8 ± 0.86 ($t = 0.11$, $p = 0.92$) в группе самок, покрытых антигенстимулированными самцами, и соответственно общее число зародышей – 7.6 ± 1.68 и 6.7 ± 1.08 ($t = 0.49$, $p = 0.62$) и число живых эмбрионов – 7.4 ± 1.65 и 6.2 ± 1.02 ($t = 0.64$, $p = 0.53$).

Масса эмбрионов

Масса живых эмбрионов, вынашиваемых самками, покрытыми контрольными и антигенстимулированными самцами, варьировала от 429 до 763 мг. Масса потомков контрольных самцов существенно не изменялась в зависимости от времени покрытия (рис. 2). А масса эмбрионов, вынашиваемых самками, покрытыми антигенстимулированными самцами, была минимальной при спаривании в 1-е и 2-е сутки после подсадки и возрастала при более поздних сроках покрытия. Учитывая влияние фактора времени, сравнение массы тела потомков контрольных и антигенстимулированных самцов было выполнено с ковариатой по срокам покрытия, которые существенно влияли на массу эмбрионов ($F_{1,152} = 13.72$, $p < 0.001$). Антигенная стимуляция также вносила статистически значимый вклад в изменчивость массы потомков ($F_{1,152} = 4.97$, $p = 0.027$). При этом массы эмбрионов были выше у самок, покрытых антигенстимулированными



Рис. 1. Кумулятивные кривые доли покрытых самок (А) от максимально возможного (*n* = 38 в каждой группе), числа овулировавших яйцеклеток (Б) и числа живых эмбрионов (В), зарегистрированных в течение 6 суток совместного содержания интактных самок с контрольными и антигенстимулированными (гемоцианин) самцами.

Оценка статистической значимости для:

– доли покрытий (А) – # – $\chi^2 = 3.61$, $p = 0.057$;

– отличие числа овулировавших яйцеклеток от теоретически ожидаемого равного количества у самок, содержащихся с контрольными и антигенстимулированными самцами (Б) – * – $\chi^2 = 4.24$, $p = 0.039$, ** – $\chi^2 = 6.74$, $p = 0.009$, *** – $\chi^2 = 11.93$, $p < 0.001$;

– отличие числа живых эмбрионов от теоретически ожидаемого равного количества у самок, содержащихся с контрольными и антигенстимулированными самцами (В) – * – $\chi^2 = 3.92$, $p = 0.047$, ** – $\chi^2 = 8.18$, $p = 0.004$.

Таблица 2. Суммарные показатели плодовитости и эмбриональные потери у самок, подсаженных на 6 суток к контрольным и антигенстимулированным самцам

Группа самцов	Плодовитость*	Эмбриональные потери		
		Доимплантационные	Постимплантационные	Общие
Контроль	97/83/74	14.4 ± 3.6	10.8 ± 3.4	23.7 ± 4.3
Введение гемоцианина	177/128/112	27.7 ± 3.4 $\chi^2 = 6.21; p = 0.013$	10.9 ± 2.8 $\chi^2 = 0.13; p = 0.72$	36.7 ± 3.6 $\chi^2 = 4.87; p = 0.027$

Примечание: здесь и в таблице 3 показаны – число овулировавших яйцеклеток/общее число эмбрионов/число живых эмбрионов.

самцами, по сравнению с контролем (583.0 ± 7.4 мг и 620.3 ± 6.2 мг, $t = 3.81, p < 0.001$).

Репродукция антигенстимулированных самцов в зависимости от преобладания Th1 или Th2 иммунных ответов

У самцов, участвовавших в размножении, было отмечено бимодальное распределение логарифмированных значений IgG2a/IgG1 (рис. 3). Это послужило основанием для выделения 2-х групп, которых можно условно отнести к особям с преобладанием Th1 иммунного ответа – $\text{Log IgG2a/IgG1} > -0.4$ – и особям с преобладанием Th2 иммунного ответа – $\text{Log IgG2a/IgG1} < -0.4$. Общее число овулировавших яйцеклеток и живых эмбрионов, полученных от самцов с Th1 и Th2 типами иммунного реагирования, достоверно не отличалось от теоретически ожидаемого, рассчитанного с учетом разного числа животных в группах – $\chi^2 = 0.01, p = 0.91$ и $\chi^2 = 1.79, p = 1.18$, соответственно. При одинаковом репродуктивном выходе у самок, покрытых самцами с доминированием Th1 иммунного ответа, имели место большие доимплантационные и общие эмбриональные потери по сравнению с таковыми у са-

мок, чьими партнерами были особи, характеризующиеся преобладанием Th2 ответа (табл. 3).

Масса эмбрионов при покрытии самцами с преобладанием клеточного (Th1) ответа (641.5 ± 9.4 мг) была достоверно выше, чем при покрытии самцами с преобладанием гуморального (Th2) иммунного ответа (607.2 ± 8.3 мг, $t = 2.66, p = 0.009$). Отчасти эти эффекты были обусловлены сроками покрытия, которые значимо влияли на темпы роста зародышей (рис. 2). При анализе влияния типа иммунного ответа на массу эмбрионов с ковариатой по времени покрытия было установлено статистически значимое влияние срока, в который произошло спаривание ($F_{1,89} = 5.32, p = 0.023$), и лишь тенденция к различию между потомками самцов, характеризующихся преобладанием Th1 или Th2 ответов ($F_{1,89} = 3.07, p = 0.083$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, активация специфического иммунитета, которая требует существенного энергетического и субстратного обеспечения, в частности, для образования специфических антител (Руднев, Романюха, 2008), не только не подавляет репродуктивную эффективность самцов мышей, а скорее

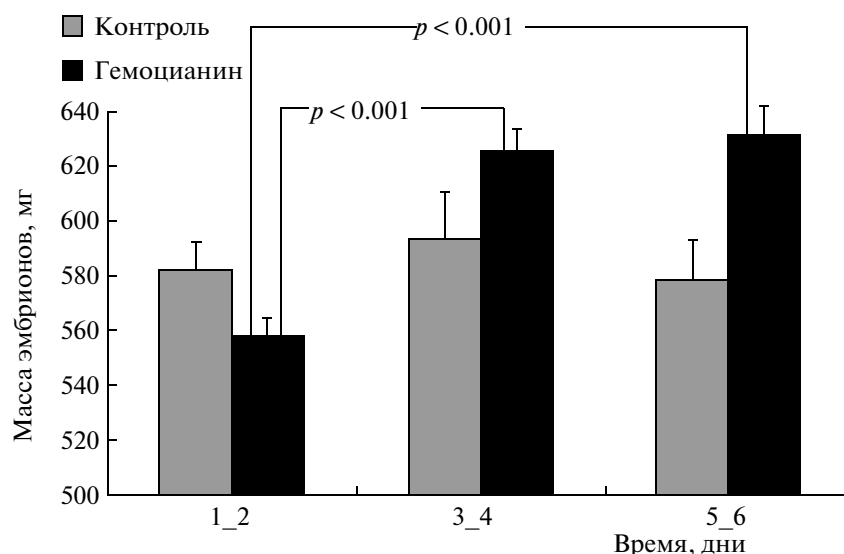


Рис. 2. Масса эмбрионов у самок, покрытых контрольными и антигенстимулированными (KLH) самцами, в разные сроки совместного содержания.

Статистическая значимость различий оценена по критерию LSD.

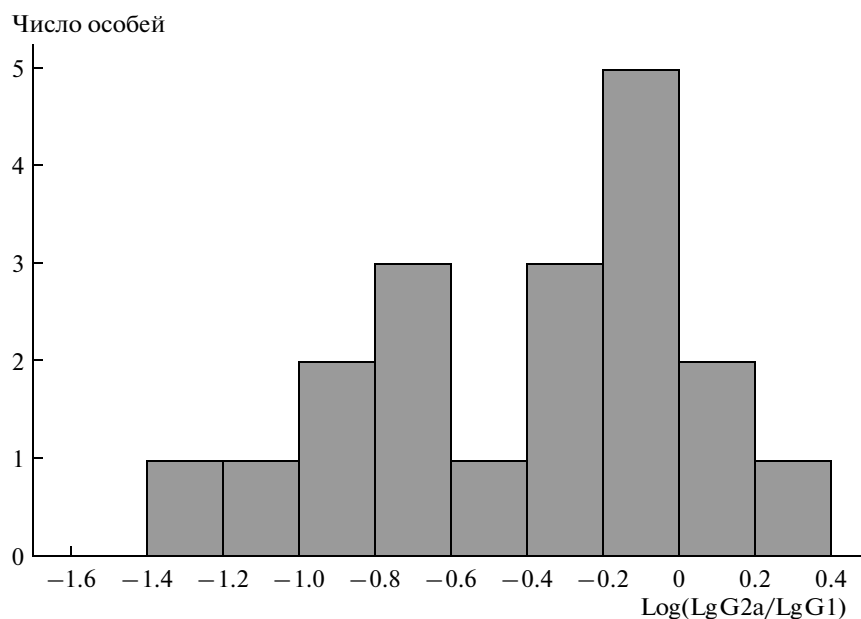


Рис. 3. Распределение логарифмированных значений IgG2/IgG1 у антигенстимулированных самцов, исследованных на 9-е сутки после введения гемоцианина.

наоборот, усиливает ее. Интактные самки, подсаженные к антигенстимулированным самцам в интервале от начала антителогенеза до достижения максимальных титров антител, производят больше жизнеспособных эмбрионов по сравнению с самками, подсаженными на такой же срок к контрольным самцам. В целом эти данные воспроизводят результаты, полученные при использовании в качестве антигенного стимула ЭБ (Мошкин и др., 2010). Отличие между двумя экспериментами заключается в путях повышения репродуктивного выхода. При введении самцам ЭБ было отмечено статистически значимое увеличение среднего (для самок) числа овулировавших яйцеклеток, а при введении гемоцианина увеличение числа фертильных покрытий. Кроме того, самки, покрытые самцами, которым вводили гемоцианин, вынашивали более крупных потомков по сравнению с контролем. В случае с введением ЭБ не было отмечено статистически значимого увеличения массы потомков антигенстимулированных самцов. Но масса эмбрионов достоверно коррелировала с силой гуморального иммунного ответа на ЭБ, оцененной по числу антителообразующих клеток (АОК).

Определение АОК дает лишь общую оценку гуморального иммунного ответа, который имеет альтернативные пути развития (Cunningham, Toellner, 2003). Наблюдаемое нами бимодальное распределение логарифмированных значений IgG2a/IgG1 у самцов, исследованных на 9-е сутки после введения гемоцианина, хорошо согласуется с этими представлениями. Как известно преобладание клеточного (Th1) или гуморального (Th2) ответов формируется благодаря взаимному подавлению пролиферации лимфоцитов, относящихся к Т-хелперам одного типа, цитокинами, секретируемыми Т-хелперами альтернативного типа (Roberts et al., 2003). Наши данные показывают, что основное позитивное влияние на темпы роста потомков антигенстимулированных самцов оказывало превалирование Th1 иммунного ответа.

Оба эксперимента, в которых для активации иммунной защиты использовали ЭБ (Мошкин и др., 2010) или гемоцианин, свидетельствуют о том, что повышение репродуктивного выхода при спаривании на фоне специфического иммунного ответа у особей мужского пола сочетается с увеличением доимплантационных и общих эмбриональных потерь. Судя по представленным здесь результатам, ключевую роль в доимплантацион-

Таблица 3. Суммарные показатели плодовитости и эмбриональные потери у самок, покрытых самцами с преобладанием Th1 или Th2 иммунных ответов

Группа самцов	Плодовитость	Эмбриональные потери		
		Доимплантационные	Постимплантационные	Общие
Преобладание Th1 ($n = 11$)	103/59/55	42.7 ± 4.9	6.8 ± 3.3	46.6 ± 6.5
Преобладание Th2 ($n = 8$)	74/61/57	17.6 ± 4.4	6.6 ± 3.2	23.0 ± 4.9
		$\chi^2 = 12.48; p = 0.004$	$\chi^2 = 0.00; p = 0.96$	$\chi^2 = 10.35; p = 0.009$

ной гибели играют иммунофизиологические процессы, характерные для доминирования Th1 иммунного ответа. Этот эффект может определяться складывающимся при Th1 ответе балансом про- и противовоспалительных цитокинов в семенной жидкости, которые влияют на успешное прохождение зародышами этапов развития, предшествующих имплантации (Johansson et al., 2004). Следует подчеркнуть, что, несмотря на более высокие эмбриональные потери, фактическая плодовитость самок, содержащихся с антигенстимулированными самцами, существенно превосходит таковую в контроле, благодаря значительно большему числу овулировавших яйцеклеток.

Как следует из результатов, представленной работы, а также из полученных ранее данных (Gerlinskaya et al., 2000; Мошкин и др., 2009, 2010), общий эффект активации иммунной системы у одного из брачных партнеров направлен на увеличение фертильности. Однако конкретные пути достижения этого результата зависят от иммуногенного фактора и фазы иммунного ответа, во время которой происходит покрытие, а в случае с самками и от стадии беременности. Поскольку, активация иммунной системы может вносить вклад в повышение репродукции, то совпадение во времени репродуктивно значимых событий с благоприятным для воспроизводства иммунофизиологическим состоянием брачных партнеров существенно возрастает в среде с выраженным разнообразием паразитических видов, стимулирующих различные звенья иммунной системы.

Таким образом, экспериментально обоснованная возможность увеличения воспроизводства при активации иммунной системы позволяет, с одной стороны, объяснить вклад защитных реакций организма в повышение фертильности млекопитающих, населяющих территории с высоким видовым обилием паразитов, а, с другой, показывает новые пути управления размножением животных, разводимых под контролем человека.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№10-04-01066) и Программы междисциплинарных исследований СО РАН (№ 94).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Литвинова Е.А., Гармс А.И., Зайдман А.М. и др. Перераспределение иммунной защиты у самцов мышей при экспозиции запахом самок // ЖОБ. 2009. № 1. С. 46–55.
- Мошкин М.П., Кондратюк Е.Ю., Литвинова Е.А. и др. Активация специфического иммунитета самцов как стимулятор фертильности самок. “Феномен дочерей Лота” // ЖОБ. 2010. № 5. С. 425–435.
- Руднев С.Г., Романюха А.А. О принципах адаптации иммунной системы // Успехи современной биологии. 2008. 128. 3. 260–270.
- Arakawa H., Arakawa K., Deak T. Acute illness induces the release of aversive odor cues from adult, but not prepubertal, male rats and suppresses social investigation by conspecifics // *Acute illness induces the release of aversive odor cues from adult, but not prepubertal, male rats and suppresses social investigation by conspecifics*. *Behav Neurosci*. 2009. V. 123 (5). P. 964–78.
- Arakawa H., Arakawa K., Deak T. Sickness-related odor communication signals as determinants of social behavior in rat: a role for inflammatory processes // *Horm. Behav*. 2010. V. 57 (3). P. 330–341.
- Arteaga-Silva M., Vargas-Villavicencio J.A., Viguera-Villaseñor R.M. et al. *Taenia crassiceps* infection disrupts estrous cycle and reproductive behavior in BALB/c female mice // *Acta Trop*. 2009. V. 109 (2). P. 141–145.
- Benfield D.A., Nelson E., Collins J.E. et al. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332) // *J. Vet. Diagn. Invest*. 1992. V. 4 (2). P. 127–133.
- Billington W.D. Influence of immunological dissimilarity of mother and foetus on size of placenta in mice // *Nature*. 1964. V. 202. P. 317–318.
- Clarke A.G. The effects of maternal pre-immunization on pregnancy in the mouse // *J. Reprod. Fertil*. 1971. V. 24 (3). P. 369–375.
- Cunningham A.F., Toellner K.M. Rapid development of Th2 activity during T cell priming // *Clin. Dev. Immunol*. 2003. V. 10 (1). P. 1–6.
- Deter J., Chaval Y., Galan M., Berthier K., Salvador A.R., Casanova Garcia J.C., Morand S., Cosson J.F., Charbonnel N. Linking demography and host dispersal to *Trichuris arvicolae* distribution in a cyclic vole species // *Int. J. Parasitol*. 2007. V. 37 (7). P. 813–824.
- Faivre B., Gregoire A., Preault M. et al. Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait // *Science*. 2003. V. 300. P. 103.
- Feore S.M., Bennett M., Chantrey J. et al. The effect of cowpox virus infection on fecundity in bank voles and wood mice // *Proc. Biol. Sci*. 1997. V. 22 (264). P. 1457–1461.
- Fichorova R.N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome // *J. Reprod. Immunol*. 2009. V. 83 (1–2). P. 185–9.
- Fietta P., Delsante G. Focus on human natural killer cells // *Riv. Biol*. 2009. V. 102 (2). P. 219–235.
- Fitzgerald N.A., Shellam G.R. Host genetic influences on fetal susceptibility to murine cytomegalovirus after maternal or fetal infection // *J. Infect. Dis*. 1991. V. 163 (2). P. 276–281.
- Garamszegi L.Z., Török J., Michl G. et al. Female survival, lifetime reproductive success and mating status in a passerine bird // *Oecologia*. 2004. V. 138. № 1. P. 48–56.
- Garraud O., Perraut R., Riveau G., Nutman T.B. Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses // *Trends. Parasitol*. 2003. V. 19 (7). P. 300–304.
- Gerlinskaya L.A., Moshkin M.P., Evsikov V.I. Allogenic stimulation in early pregnancy improves pre- and postnatal ontogenesis in BALB.cLac mice // *J. Reprod. and Develop*. 2000. V. 46 (6) P. 387–396.
- Goldbard S.B., Verbanac K.M., Warner C.M. Role of the H-2 complex in preimplantation mouse embryo development // *Biol. Reprod*. 1982. V. 26. №. 4. P. 591–596.
- Guégan J.F., Thomas F., Hochberg M.E. et al. Disease diversity and human fertility // *Evolution*. 2001. V. 55 (7). P. 1308–1314.
- Hetherington C.M., Humber D.P. The effects of active immunization of the decidual cell reaction and ectopic blastocyst development in mice // *J. Reprod. Fertil*. 1975. V. 43 (2). P. 333–336.

- Hetherington C.M.* Absence of effect of maternal immunization to paternal antigens on placental weight, fetal weight and litter size in the mouse // *J. Reprod. Fertil.* 1978. V. 53 (1). P. 81–84.
- Ho H.N., Yang Y.S., Hsieh R.P., Lin H.R., Chen S.U., Chen H.F., Huang S.C., Lee T.Y., Gill T.J.* Sharing of human leukocyte antigens in couples with unexplained infertility affects the success of *in vitro* fertilization and tubal embryo transfer // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994. V. 170. P. 63–71.
- James D.A.* Effects of antigenic dissimilarity between mother and foetus on placental size in mice // *Nature.* 1965. V. 202. P. 613–614.
- Johansson M., Bromfield J.J., Jasper M.J., Robertson S.A.* Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice // *Immunology.* 2004. V. 112. (2). P. 290–300.
- Kavaliers M., Colwell D.D.* Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males // *Proc. Biol. Sci.* 1995. V. 22 (261). P. 31–35.
- Larson S.J., Dunn A.J.* Behavioral effects of cytokines // *Brain. Behav. Immun.* 2001. V. 15. (4). P. 371–387.
- Litvinova E.A., Kudaeva O.T., Mershieva L.V. et al.* High level of circulating testosterone abolishes decline of scent attractiveness in antigen-treated male mice // *Anim. Behav.* 2005. V. 69. № 3. P. 511–517.
- Moshkin M., Gerlinskaya L., Morozova O. et al.* Behavior, chemosignals and endocrine functions in male mice infected with tick-borne encephalitis virus // *Psychoneuroendocrinology.* 2002. V. 27. P. 603–608.
- Moshkin M.P., Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I.* The role of the immune system in behavioral strategies of reproduction // *J. Reprod. and Develop.* 2000. V. 46 (6). P. 341–365.
- Nour N.M.* Schistosomiasis: health effects on women // *Rev. Obstet. Gynecol.* 2010. V. 3 (1). P. 28–32.
- Roberts A.I., Devadas S., Zhang X. et al.* The role of activation-induced cell death in the differentiation of T-helper-cell subsets // *Immunol. Res.* 2003. V. 28 (3). P. 285–293.
- Sarkar C., Basu B., Chakroborty D., Dasgupta P.S., Basu S.* The immunoregulatory role of dopamine: an update // *Brain. Behav. Immun.* 2010. V. 24(4). P. 525–528. Epub. 2009. Nov. 5.
- Thomas F., Teriokhin A.T., Budilova E.V. et al.* Human birthweight evolution across contrasting environments // *J. Evol. Biol.* 2004. V. 17 (3). P. 542–53.
- Velando A., Drummond H., Torres R.* Senescent birds redouble reproductive effort when ill: confirmation of the terminal investment hypothesis // *Proc. Biol. Sci.* 2006. V. 273. P. 1443–1448.
- Warner C.M., Gollnick S.O.* Expression of H-2K major histocompatibility antigens on preimplantation mouse embryos // *Biol. Reprod.* 1993. V. 48 (5). P. 1082–1087.
- Weiss G., Goldsmith L.T., Taylor R.N. et al.* Inflammation in reproductive disorders // *Reprod. Sci.* 2009. V. 16 (2). P. 216–229.
- Willis C., Poulin R.* Preference of female rats for the odours of non-parasitised males: the smell of good genes // *Folia Parasitologica.* 2000. V. 47. P. 6–10.
- Zala S.M., Potts W.K., Penn D.J.* Scent-marking displays provide honest signals of health and infection // *Behavioral Ecology.* 2004. V. 15. №. 2. P. 338–344.
- Zuk M., McKean K.A.* Sex differences in parasite infections: Patterns and processes // *Int. J. Parasitology.* 1996. V. 26 (10). P. 1009–1023.

Reproductive Success of Males of the ICR Outbred Line during Propagation against the Background of Antigenic Stimulation

L. A. Gerlinskaya^a, S. O. Maslennikova, E. L. Zav'yalov, G. V. Kontsevaya, and M. P. Moshkin

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090*

^a *Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
ul. Frunze 11, Novosibirsk, 630091*

*Tomsk State University, pr. Lenina 36, Tomsk, 634050
e-mail: lgerlinskaya@gmail.com*

Abstract—Diversity of viruses, bacteria, microscopic fungi, and endo- and ectoparasites is an inevitable environmental factor that influences the host reproduction and that is determined not only by negative effects of infectious diseases but also by activation of protective mechanisms, which provide a confrontation to the pressure of parasites. In the present work, hemocyanin was injected into males of the ICR outbred line in order to study reproductive consequences of antigenic stimulation of males. Intact females were added to control and antigen-stimulated males at the initial stage of antibody formation. During 6 days of combined keeping, a significantly greater amount of ovulated egg cells and living embryos were registered in the females added to males that were injected with hemocyanin compared with that theoretically expected for equal reproductive yield. Females covered by antigen-stimulated males bred larger embryos compared with those in the control. Indices of female fertility depended on prevalence of cellular (Th1) or humoral (Th2) immune responses in antigen-stimulated males. Shift of Th1/Th2 balance resulted in higher preimplantation embryonic losses in females covered by males with a prevalence of cellular immune response; however, they bred larger embryos. Thus, it was established that activation of the immune system in males does not influence their reproductive abilities. This allows us, on the one hand, to explain the contribution of protective reactions of the organism in the increase in fertility of the mammals that inhabit territories with high specific abundance of parasites; on the other hand, it demonstrates new ways of the management of the reproduction of animals bred under human control.

Keywords: hemocyanin, male antigenic stimulation, pregnancy, embryonic losses, weight of embryos, immune response, Th1, Th2, IgG1, IgG2a

УДК 575.16:595.773.4

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОМНЫХ РАЙОНОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭКСПРЕССИЮ *lawc/Trf2* В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ *D. MELANOGASTER*

© 2012 г. О. Б. Симонова¹, Е. А. Модестова², Ю. Е. Воронцова¹, Р. О. Черезов¹¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

² Институт биологии гена РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

E-mail: osimonova@hotmail.com

Поступила в редакцию 11.07.11 г.

Окончательный вариант получен 31.01.12 г.

Мутации *leg-arista-wing complex (lawc)* нарушают экспрессию белка дрозофилы, гомологичного базовому фактору транскрипции человека ТВР (TATA-box binding protein) Related Factor 2 (TRF2), специфически контролирующего развитие. Впервые проведен генетический скрининг различных областей генома с целью выявления межгенных взаимодействий *lawc/Trf2* с другими генами и геномными районами, для чего применялась коллекция линий Deficiency Kit с делециями, в сумме перекрывающими значительную часть генома. В результате генетического картирования были выявлены 26 цитологических зон, делеции которых вызывают либо гибель особей, либо модификацию мутантного фенотипа, вызванного пониженной экспрессией белка TRF2. Эти делеции можно использовать в дальнейшем для выявления как новых генов-мишеней белка TRF2, так и его позитивных или негативных регуляторов. Известно, что в процессе клеточной дифференцировки TRF2 может входить в состав высокомолекулярных комплексов, содержащих фактор, контролирующий репликацию хромосом DREF и компоненты хроматин-ремодулирующего комплекса NURF. В данной работе установлены новые генетические взаимодействия *lawc/Trf2* с рядом генов, кодирующих базовые и специфические факторы транскрипции. В подавляющем большинстве нарушение этих взаимодействий вызывает дефекты развития и гибель особей. Однако в случае с геном *e(y)1*, кодирующем фактор транскрипции *Taf9*, его взаимодействие с *lawc/Trf2* ограничено репродуктивной системой самцов. Мутантные самцы *lawc^{p1}e(y)1^{u1}* становятся стерильны из-за нарушения созревания сперматоцитов первого порядка и недостаточной премейотической конденсацией хромосом клеток полового пути.

Ключевые слова: делеция, аутосома, цитологическая карта, экспрессивность, пенетрантность, генетический скрининг, гаплонедостаточность, фактор транскрипции, сперматогенез, *Drosophila melanogaster*.

ВВЕДЕНИЕ

Процесс индивидуального развития организма сопровождается активацией конкретных сигнальных путей, которые включают различные программы клеточной детерминации и дифференцировки. Для выявления эволюционно-консервативных генов-участников сигнальных путей и характеристики их специфических функций применяют генетические скрининги, выполненные на плодовой мушке *Drosophila melanogaster*, которая является объектом, удобным для такого рода поиска, и широко используется для детального исследования многих иерархически консервативных механизмов. Скорость, с которой осуществляется направленный скрининг компонентов сигнальных путей при работе с дрозофилой, является одним из самых мощных преимуществ этого модельного объекта перед другими. Прин-

цип скрининга заключается в выявлении локусов, нарушение экспрессии которых специфически модифицируют определенный мутантный фенотип. При таком подходе используют восприимчивый генетический фон, который слабо выражен, но легко заметен (например, “грубоватые” глаза, небольшая вырезка крыловой пластинки). Поиск мутаций на слабовыраженном генетическом фоне позволяет обнаружить *транс-*действующие регуляторные факторы, например, гены-энхансеры, если мутация усиливает фенотипическое проявление, либо гены-супрессоры, если происходит ослабление фенотипа.

С целью выявить возможные межгенные взаимодействия скрещивают дрозофил из двух лабораторных линий, несущих мутации по разным генам. Обычно такие скрещивания проводят, предполагая, что исследуемые гены участвуют во

взаимосвязанных процессах. При этом не будут выявлены взаимодействия, о которых ничего неизвестно, или же взаимодействия с генами, мутации по которым еще не описаны или недоступны.

Другой, более масштабный, но менее точный способ поиска межгенных взаимодействий – делеционное картирование. Строго говоря, это один из старых методов, получивших новое развитие в рамках проектов по картированию генома дрозофилы. Из множества делеций составляется так называемый Deficiency Kit – минимальное количество делеций, затрагивающих наибольшую часть генома *Drosophila melanogaster*. В настоящей работе мы используем Bloomington Deficiency Kits (DF2 и DF3), по последним данным его полный набор составляют 238 линий, что соответствует от 85 до 91% полос на карте политенных хромосом.

В последнее время создана система делеционного картирования с гораздо большим разрешением, так называемые Exelixis Deficiencies (Parks et al., 2004). Геном дрозофилы насыщался инсерциями трансгенных конструкций на основе Р-элемента, включавших последовательности сайт-специфичной рекомбинации. С помощью рекомбинации между такими конструкциями можно получать делеции с четко устанавливаемыми границами (Thibault et al., 2004). Линии имеют изогенное происхождение и перекрывают чуть более 50% генома. Районы, по которым в принципе невозможно получить делеции из-за летальности гетерозиготных особей (гаплонедостаточности), минимизируются тщательным подбором изначально полученных инсерций.

Мутация *leg-aristae-wing complex (lawc^{p1})* проявляла варьирующую экспрессивность. При сильной экспрессивности мутантов характеризуют расставленные, приподнятые, обрезанные крылья; дополнительные щетинки на голове, груди и щитке; “грубоватые” глаза; более того, нарушалась сегментация ног и ариста трансформировалась в тарзус (Симонова и др., 1992; Симонова, 2000). Со временем экспрессивность мутации резко снизилась (изменения ограничиваются лишь дополнительными щетинками). Слабый фенотип послужил отличным фоном для поиска генов, мутации которых либо приводят к восстановлению утраченных признаков фенотипа *lawc*, либо становятся гаплонедостаточными летальными в комбинации с аллелем *lawc^{p1}*.

Последние исследования показали, что мутация *lawc* вызывает снижение уровня экспрессии фактора транскрипции, который гомологичен белку TRF2 человека (Копытова и др., 2005). Этот белок принадлежит семейству TBP-подобных белков, являющихся альтернативными факторами базовой транскрипции (Rabenstein et al., 1999).

Процесс транскрипции у эукариотических организмов осуществляют РНК-полимеразы. Для того чтобы РНК-полимераза связалась с промотором гена, необходимо присутствие большого числа белковых факторов транскрипции. Считается, что основным и универсальным фактором базовой транскрипции является белок TBP, связывающийся с коровой последовательностью ТАТА, входящей в состав большинства промоторов. Совсем недавно были обнаружены еще три гена, продукты которых имеют структурное сходство ДНК-связывающего домена и, как полагают, выполняют схожую функцию, проявляя при этом некоторую тканевую специфичность. Это гены *TBP related factor 1, 2 и 3 (Trf1 и Trf2, Trf3)*. Интересно, что в геноме дрожжей есть только один ген этого семейства – *Tbp*. У дрозофилы их три: *Tbp, Trf1 и Trf2*. У человека нет гена *Trf1*, но наряду с *Tbp* и *Trf2* присутствует другой гомолог – *Trf3* (Persengiev et al., 2003)

В отличие от TBP, TRF2 входит в состав высокомолекулярного комплекса (500 кДа) и следовательно, может быть ассоциирован с набором белков, которые отличаются от TBP- и TRF1-ассоциированных факторов. Были идентифицированы TRF2-содержащие комплексы дрозофилы, в состав которых входят компоненты хроматин-ремодулирующего комплекса NURF (Nucleosome Remodelling Factor), белка DREF (DNA Replication-related Element (DRE)-binding Factor), а также другие белки, которые могут взаимодействовать с хроматином (Hochheimer et al., 2002). Биохимический анализ TRF2-содержащего комплекса дрозофилы выявил некоторые TRF2-специфичные промоторы. Исследования *in vitro* показали, что DREF-содержащий TRF2-комплекс участвует в распознавании промотора гена *PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)*. Анализ экспрессии генов выявил несколько дополнительных генов-мишеней TRF2, вовлеченных в репликацию ДНК и клеточную пролиферацию, которые содержат элемент DRE (Hochheimer et al., 2002). Однако генетических экспериментов позволяющих выявлять межгенные взаимодействия с участием гена *Trf2 in vivo* не проводилось, в силу отсутствия его жизнеспособных мутаций. Единственной мутацией, нарушающей уровень экспрессии TRF2, оказалась мутация *lawc^{p1}*. В предыдущих исследованиях мы установили ряд генов X-хромосомы, мутации которых усиливают *lawc*-фенотип: *cut* (Симонова и др., 1992), *scute* (Симонова и др., 1996), *zeste* (Симонова и др., 1998). Аутомсомные мутации практически не исследовались.

В данной работе проведены крупномасштабные генетические эксперименты по скринированию генома дрозофилы, с целью обнаружить другие гены, с которыми может взаимодействовать *lawc/Trf2* в различных клетках, тканях и органах в

процессе развития. В результате были выявлены 14 “летальных” цитологических зон, содержащих локусы, возможно, участвующих с геном *lawc/Trf2* в одних и тех же процессах. Кроме того, мы провели поиск взаимодействий *lawc^{p1}* с рядом мутаций генов, кодирующих основные компоненты (транскрипционные факторы, TF), участвующие в базовой транскрипции. Обнаружены генетические взаимодействия *lawc/Trf2* с генами, кодирующими субъединицы базового фактора транскрипции TF_{II}N и ряда факторов, ассоциированных с белком TBP (TBP associated factors – TAFs).

Более того, было изучено взаимодействие *lawc/Trf2* с генами группы *enhancer of yellow (e(y)1, 2, 3)*. Гены этой группы кодируют факторы, являющиеся компонентами белковых комплексов, регулирующих эффективность транскрипционного процесса, осуществляемого РНК-полимеразой II (Soldatov et al., 1999; Georgieva et al., 2001; Shidlovskii et al., 2005). Ранее было показано, что продукты генов *Taf9/e(y)1* и *e(y)2* взаимодействуют между собой (Georgieva et al., 2001). Мы установили, что мутации этих генов на фенотип *lawc^{p1}* не влияют. Однако самцы *lawc^{p1}e(y)1^{u1}/Y*, в отличие от самцов *lawc^{p1e(y)2^{u1}/Y}*, становятся стерильными из-за нарушения дифференцировки сперматоцитов первого порядка и премейотической конденсации хромосом. То есть, проявление комбинации мутации гена *Taf9/e(y)1* и *lawc^{p1}* тканеспецифично ограничено репродуктивной системой самцов. В отличие от первых двух комбинаций совмещение *lawc^{p1}* с мутацией третьего гена из этой группы – *e(y)3^{u1}* – вызвало гибель дрозофил, что также говорит о явных взаимодействиях продуктов этих генов в процессе развития дрозофилы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетические эксперименты. В работе использовался ряд линий и мутаций *Drosophila melanogaster*, обозначения которых даны согласно принятой символике (Lindsley, Zimm, 1992). *lawc^{p1}* – исходная линия со слабой мутацией в гене *lawc/Trf2*, вызванной инсерцией двойной копии Р-элемента в транскрибируемый, но не транслируемый 5' район гена (Симонова и др., 1992; Копытова и др., 2005). В контрольных экспериментах и для подтверждения специфичности найденных взаимодействий использовалась линия с реверсией мутации *lawc^{p1}* – *lawc^{R30}* (Петрук и др., 1998) и линии с конститутивной экспрессией белка TRF2 – *lawc^{p1}p{w+[LAWC2]}* (Воронцова и др., 2007).

Делеционные картирование проводили при помощи так называемого Deficiency Kit, составленного и поддерживаемого в Bloomington Stock Center. Deficiency Kit представляет собой набор

делечий, перекрывающий значительную часть генома дрозофилы. Набор стандартных делечий по 2 и 3 хромосомам был получен из коллекционного Центра линий дрозофилы (Блумингтон, США). Перечень использованных линий с описанием генотипов дан на сайте Bloomington Stock Center, размещенном в базе данных дрозофилы FlyBase (<http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/df/dftop.htm>).

Самки *lawc^{p1}* скрещивались с самцами линий из Deficiency Kit, несущими делецию в одной из аутосом и гомологичную ей хромосому-балансер. Анализировались самцы F₁ *lawc^{p1}* двух генотипов: с хромосомой-балансером (определялась по соответствующим маркерным мутациям) и делецией. Отсутствие, резкое снижение жизнеспособности, фенотипические аномалии самцов с делецией интерпретировались как выявление межгенных взаимодействий *lawc/Trf2* и неизвестных генов, локализованных в области делеции. Как правило, делеции Deficiency Kit имеют значительную протяженность и включают множество изученных генов и неизвестных открытых рамок считывания. Поэтому мы повторяли эксперименты с более мелкими делециями по исследуемым районам и таким образом сужали зону летальных взаимодействий.

Для изучения взаимодействий гена *lawc/Trf2* с другими *транс*-регуляторными генами группы *enhancer of yellow* использовались линии с гипоморфными мутациями этих генов *e(y)1^{u1}*, *e(y)2^{u1}*, *e(y)3^{u1}* (Georgiev, Gerasimova, 1989; Georgiev et al., 1990). Их парные комбинации с мутацией *lawc^{p1}* были созданы с помощью генетической рекомбинации. В качестве контроля найденных взаимодействий использовалась линия *w; P{e(y)3}* с конститутивной экспрессией белка E(y)3 (Shidlovskii et al., 2005), предоставленная П.Г. Георгиевым (ИБГ РАН).

Флуоресцентное окрашивание семенников. Семенники выделяли в растворе фосфатного буфера PBS и фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 15 минут. Инкубацию с первичными моноклональными мышинными антителами к тубулину (Hybridoma Bank) проводили в течение одного часа при +25°C. Антитела к тубулину использовали в разведении 1 : 100 в буфере РВТ (PBS, 0.2% Triton X-100). Вторичными козьими антителами против мыши Су2 в разведении 1 : 100 (Molecular Probes, Invitrogen) окрашивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее образцы отмывали в буфере PBS и окрашивали ДНК-специфичным красителем DAPI (1 мкг/мл). Материал переносили на предметное стекло и заключали в среду, препятствующую выгоранию (Vectashield mounting medium H-1000, Vector Laboratories). Анализ полученных

препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus CX41.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск межгенных взаимодействий при помощи делеционного картирования. Поиск взаимодействий осуществлялся только по аутосомам (2 и 3 хромосомы). Для этого мы использовали набор музейных линий (Deficiency Kit – более 200 линий), с делециями, в сумме перекрывающимися значительную часть аутосом. Анализировались самцы *lawc^{p1}/Y; Df/+*, несущие в гетерозиготе делеции (подопытный класс). Альтернативный класс самцов *lawc^{p1}/Y; Balancer/+*, (контроль) был представлен особями, не несущими делеций. Он идентифицировался по стандартным маркерным мутациям, характерным для аутосомных хромосом-балансеров. Сами по себе делеции в гетерозиготе не вызывают гибели особей или сильных фенотипических нарушений. Однако если на фоне *lawc^{p1}* в линии будут возникать морфологические аномалии или отклонения от стандартного расщепления, то можно говорить о существовании межгенных взаимодействий. Следует отметить, что мы не претендуем на обнаружение всех генов, задействованных в биохимически связанных процессах – это невозможно в силу ограниченности метода. Какие-то взаимодействия в принципе невозможно проследить, наблюдая мутации в гетерозиготном состоянии (применительно к нашим экспериментам, это означает, что отсутствие взаимодействий не указывает на их отсутствие в живом организме).

Исходно мы выявили 14 линий с делециями, которые в гетерозиготном состоянии вызывали гибель слабых *lawc*-мутантов: [21A1; 21B7-8], [24C2-8; 25C8-9], [36E4; 38A6-7], [38A6-B1; 40A3-B1], [46D7-9; 47F15-16], [48F4; 49A11], [49C1-4; 50C23-D2], [55A; 55F], [64C; 65C11], [66D6; 66E1-2], [67A2-5; 67D7-9], [75B8; 75F1], [86E2; 87C6-7], [91F1-2; 92D3-6]. Обнаружив взаимодействие слабой мутации с делецией из Deficiency Kit, для уточнения “летальных” цитологических зон мы использовали небольшие делеции. Для этого в скрещиваниях было задействовано еще 77 линий. В результате было обнаружено, что в 9 дополнительных линиях содержатся гаплонедостаточные цитологические зоны, делеции которых в гетерозиготном состоянии вызывают гибель слабых *lawc*-мутантов. Их мы использовали для уточнения границ “летальных” зон. Еще 25 линий несли доминантные модификаторы слабой мутации *lawc^{p1}*. В некоторых случаях “летальные” зоны почти полностью перекрывались более мелкими делециями с более слабым воздействием на фенотип мутантов. Очевидно, эти цитологические районы содержат сразу несколько локусов, вызывающих доминантное коммулятив-

ное воздействие на *lawc^{p1}*. Возможно также, что в этих районах локализируются супрессоры, нейтрализующие влияние сильных *lawc^{p1}*-модификаторов. Для всех случаев были поставлены контрольные эксперименты с линией, содержащей реверсию *lawc^{R30}*. Гибели особей не наблюдалось, поэтому все обнаруженные взаимодействия вызваны мутацией *lawc^{p1}*. Более того, жизнеспособность особей восстанавливалась на фоне *mis*-экспрессии изоформ белка TRF2, что доказывает участие этого белка в выявленных взаимодействиях.

Мы отметили локализацию этих делеций на цитологической карте аутосомных хромосом дрозофилы. Результаты представлены на рис. 1. Прямой толстой линией изображены участки цитологической карты, цифрами сверху обозначены соответствующие секции, а буквами ниже их подсекции. Расположенные ниже отрезки соответствуют данным о размерах исследованных делеций, неточно картированные области отмечены пунктирной линией. За символом # над каждым отрезком следует номер линии из Bloomington Stock Center. Под обозначением делеции знак ☺ обозначает жизнеспособность при совмещении с мутацией по *lawc*, ☹ – гибель, в случае сильных нарушений приведен их фенотип. Если линия не обозначена на карте, значит, взаимодействия не обнаружены, самцы с делецией и мутацией *lawc^{p1}* выживают и не имеют видимых нарушений. Цитологические области [22B2-3; 24A1], [28C; 29B11], [44F10; 46A1], [51B7; 51D2], [52F5; 54B17], [56F16; 57B3], [62A9; 64A11], [69B3; 71C1], [79E9; 83B] не тестировались в силу отсутствия доступных делеций этих районов.

Проанализировав результаты делеционного картирования, мы выявили 22 более мелких цитологических района, где расположены различной силы доминантные энхансеры фенотипа *lawc^{p1}*, из них 12 вызывали гибель особей, остальные усиливали фенотипическое проявление мутантов. Также было выявлено 4 района, содержащих вероятные супрессоры, снимающие эффекты энхансеров *lawc^p* (Табл. 1, рис. 2).

Разумеется, ген *lawc/Trf2* не может “взаимодействовать” с протяженным участком хромосом длиной в несколько секций. Речь идет о взаимодействии продуктов двух или более генов, и поиск отдельных генов логично должен быть нашей следующей задачей.

Был проведен скрининг генов, попадающих в картированные области летальных взаимодействий, в базе данных <http://flybase.bio.indiana.edu>. Среди известных генов, локализованных в этих районах много факторов как базовой, так и специфической транскрипции, а также генов, участвующих в компактизации хроматина и правильном расхождении хромосом при митозе и мейозе.

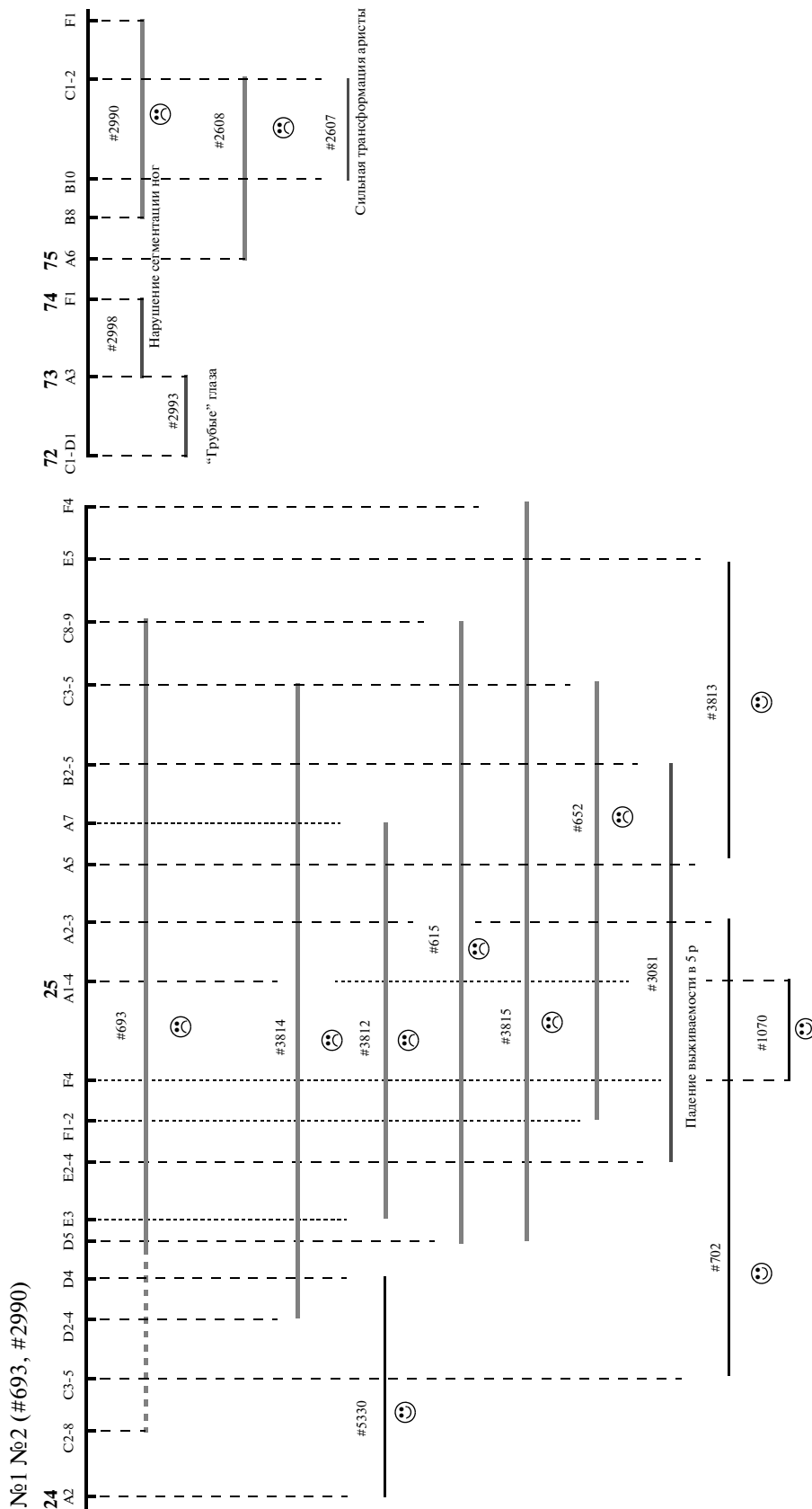


Рис. 1. Цитологическое картирование районов, которые в гетерозиготном состоянии модифицируют фенотип *lawe^{pl}*. Объяснения в тексте.

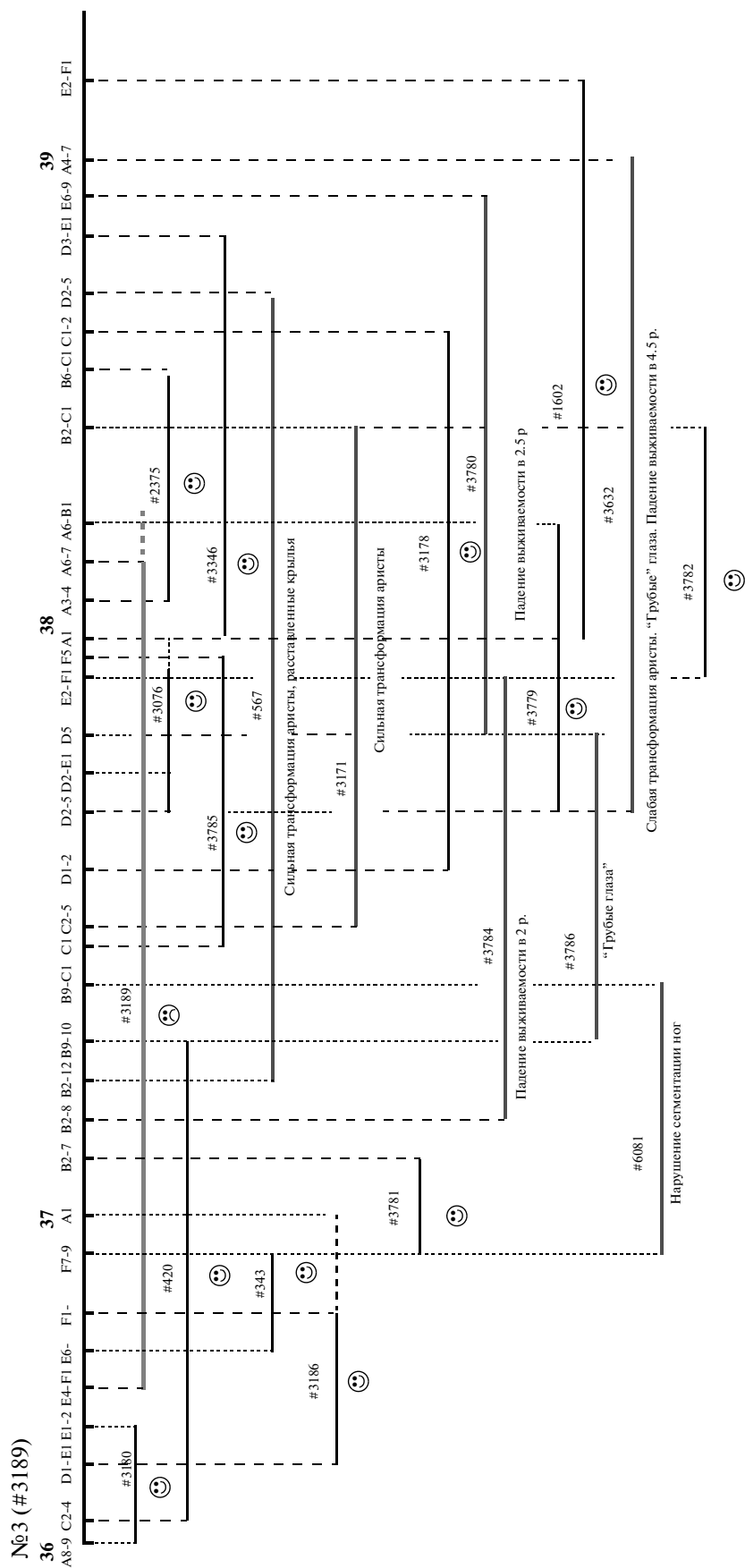


Рис. 1. Продолжение.

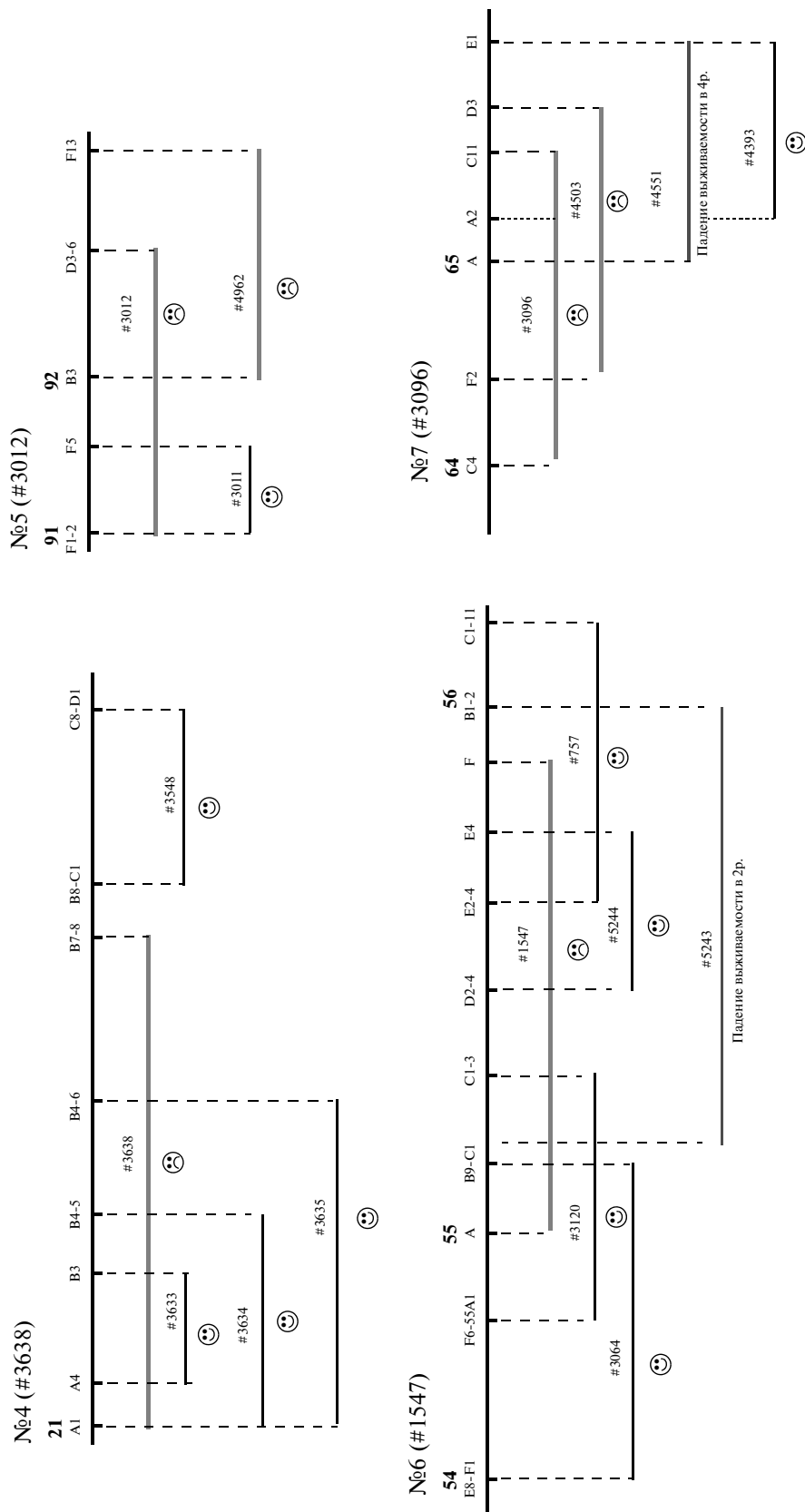


Рис. 1. Продолжение.

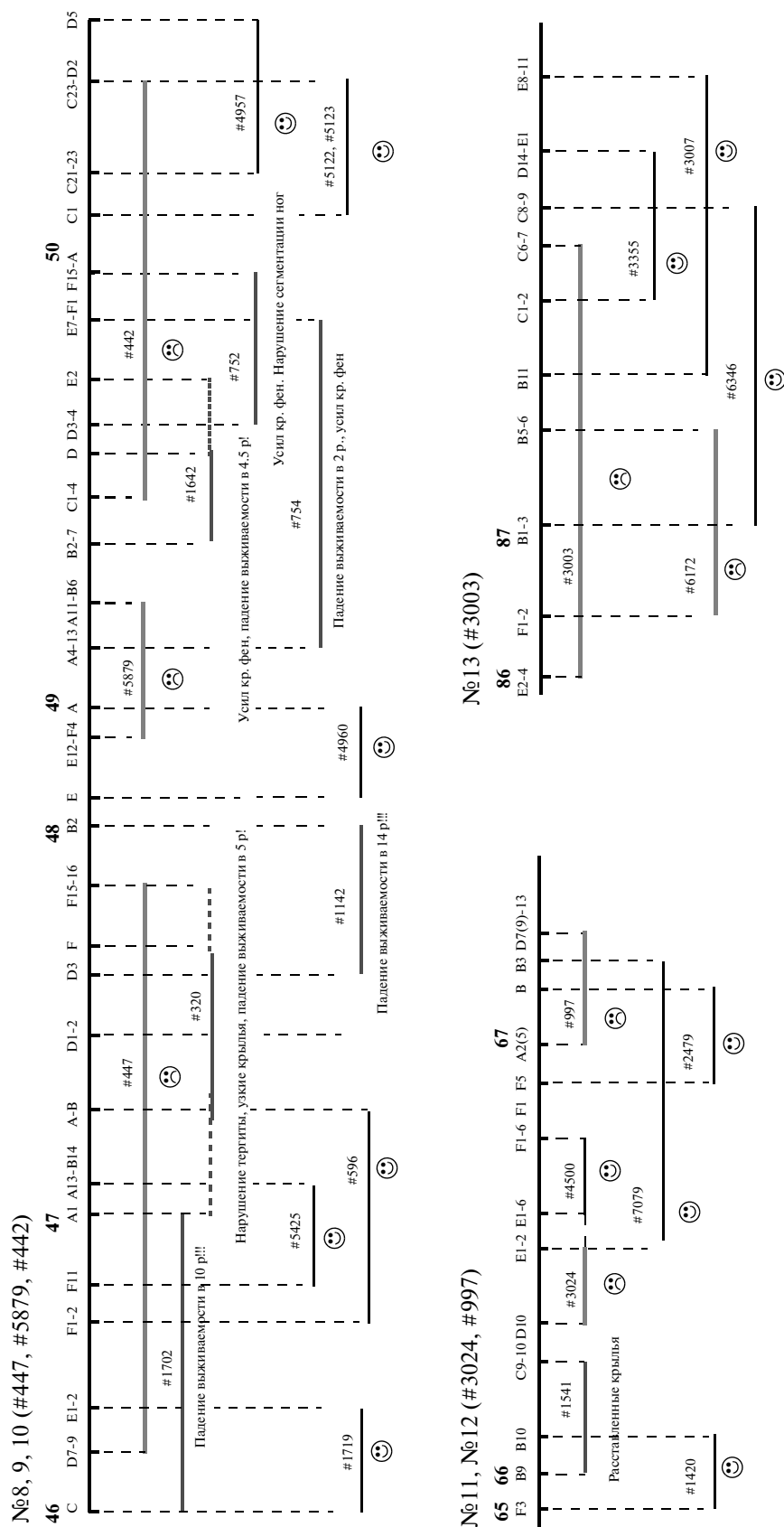


Рис. 1. Продолжение.

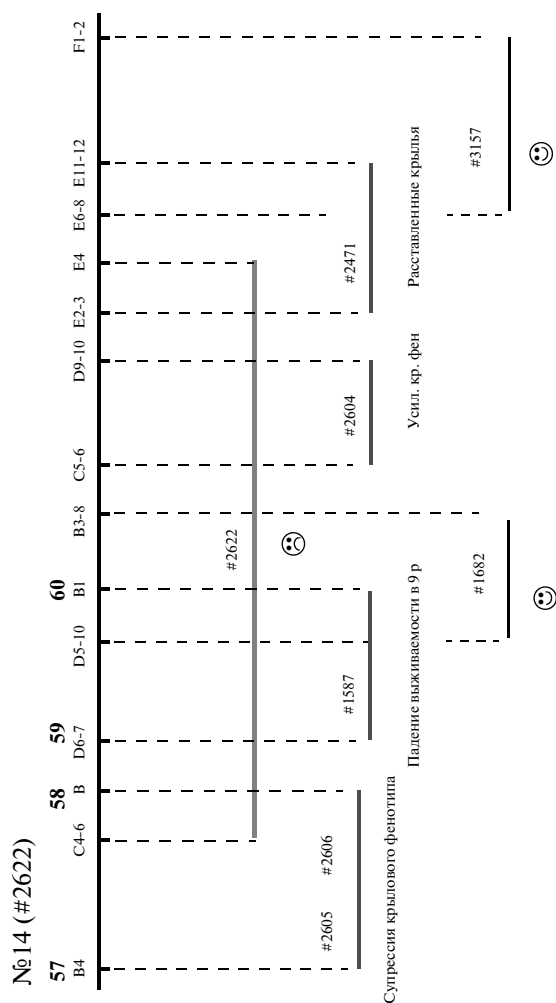


Рис. 1. Окончание.

Мы сочли наглядным вынести эти данные в табл. 2. По многим генам сейчас нет доступных мутаций в мировой коллекции, но мы рассматриваем всех их как первоочередных кандидатов на поиск взаимодействий.

Сходным образом в ряде случаев мы искали взаимодействия с мутациями по отдельным ге-

нам. Так как среди генов, локализованных в “летальных” зонах, было много транскрипционных факторов, мы провели подобный эксперимент с рядом мелких делеций и мутаций в генах, кодирующих транскрипционные факторы TF_{II} , участвующие в базовой транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II. Тестировались $TF_{II}B$, $TF_{II}E$, $TF_{II}H$, *TATA-box binding protein (TBP)*, а также группа генов семейства *TBP associated factor (Taf)*, табл. 3). Так как в настоящее время белки *TAF* обозначаются по новой унифицированной системе, чтобы не возникло путаницы, мы приводим таблицу новых и старых обозначений (табл. 4). Анализ взаимодействия *lawc^{p1}* и существующих мутаций/делеций ряда генов, кодирующих факторы базовой транскрипции, показал, что в одних случаях происходит сильное взаимоусиление фенотипических признаков, даже приводящее к летальности компаундов (компоненты комплекса $TF_{II}H$ и ряд генов семейства *taf*: *taf_{II}30\alpha*, *taf_{II}40/e(y)1*, *taf_{II}60*, *taf_{II}110*, *taf_{II}150*). В случае *TBP* [57B7-10] происходит супрессия мутантного фенотипического проявления *lawc^{p1}*, а в остальных случаях никаких взаимодействий не наблюдалось. Данные суммированы в сводной таблице 5.

Таким образом, взаимоусиление фенотипических мутантных признаков является надежной гарантией того, что эти гены совместно участвуют в регуляции транскрипции. Тот факт, что взаимоусиление проявляется не со всеми компонентами, входящими в состав базовой транскрипционной машины, говорит о том, что это участие, по видимому, ограничивается определенным набором белок-белковых взаимодействий.

Для изучения взаимодействия гена *lawc* с *транс*-регуляторными факторами транскрипции группы *enhancer of yellow (Taf9/e(y)1, e(y)2, e(y)3)* при помощи кроссинговера были созданы генетические компаунды, содержащие комбинации жизнеспособных мутаций этих генов с мутацией *lawc^{p1}*. Оказалось, что совмещение мутаций по этим генам приводит либо к гибели (*e(y)3*), либо к нарушению фертильности полученных компаундов в сочетании со взаимоусилением мутантных

Таблица 1. Делеции цитологических районов II и III хромосом, которые в гетерозиготном состоянии модифицируют фенотип *lawc^{p1}*

Энхансеры				Возможные супрессоры
Сильные		Слабые		
[21B6-7; 21B7-8]	[64F2; 65A2]	[24D5; 24E2-4]	[59D6-7; 59D5-10]	[25A5; 25B2-5]
[25A2-3; 25A5]	[66D10; 66E1-2]	[25B2-5; 25C3-5]	[60C5-6; 60D9-10]	[55F; 56B1-2]
[37B9-10; 37C1]	[67B3 67D7-13]	[46E1-2; 46F1-2]	[60E2-3; 60E4]	[57B4; 58B]
[49A; 49A4-13]	[75B8; 75B10]	[47D1-2; 47D3]	[66B10; 66C9-10]	[65D3-65E1]
[49F15; 50C1]	[86F1-2; 87B1-3]	[49B2-7; 49E2]	[72C1-D1; 74F1]	
[55C1; 55D2-4]	[92B3; 92D3-6]			

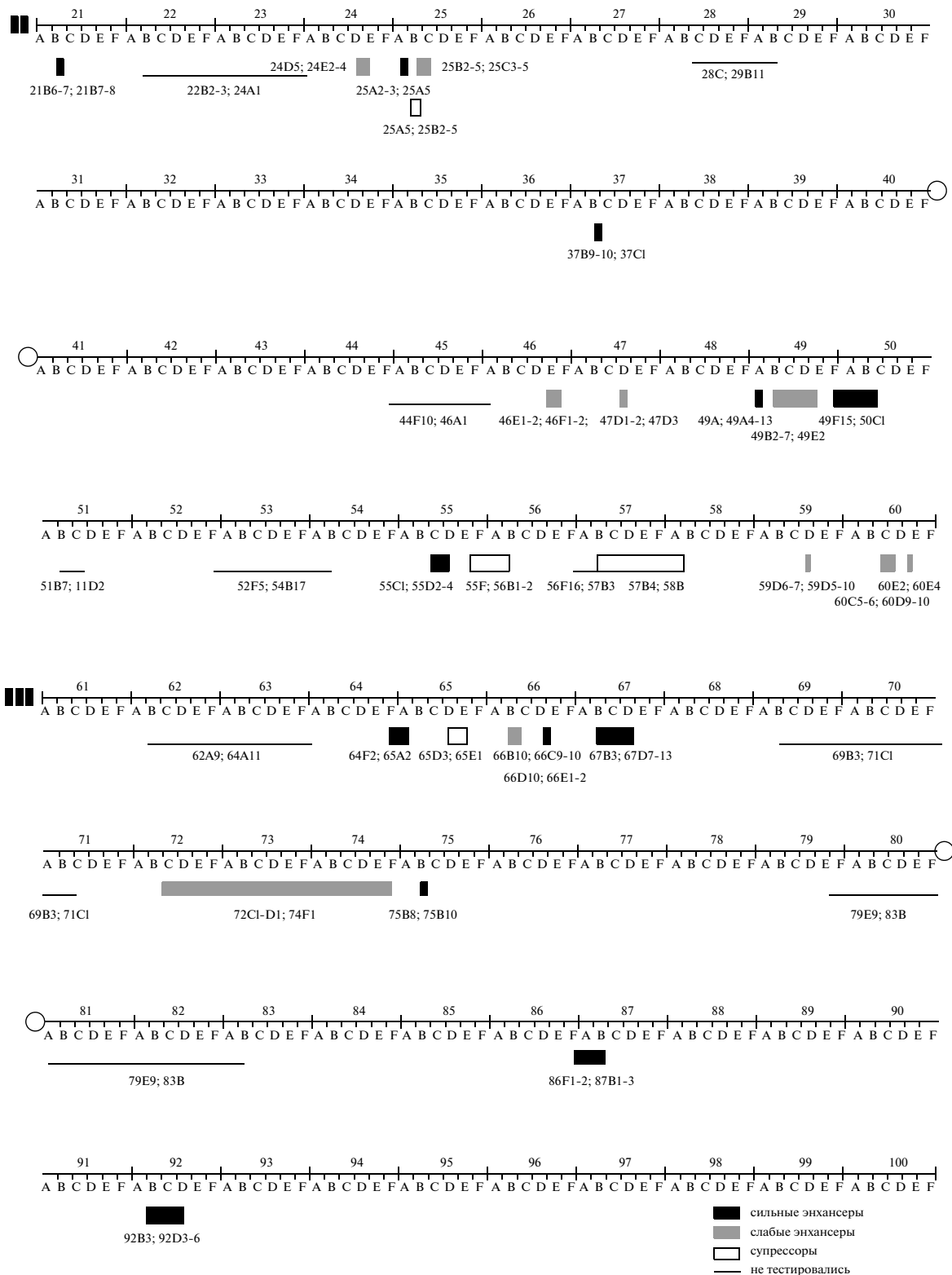


Рис. 2. Суммарный результат делеционного картирования. Цифрами обозначены секции, а буквами – подсекции II и III политенной хромосомы слюнных желез. Центромеры обозначены неокрашенными кружками. Прямоугольниками обозначены районы, модифицирующие *lawe^{D1}*-фенотип: черными прямоугольниками обозначены сильные энхансеры, серыми – слабые энхансеры, белыми – супрессоры. Тонкими линиями обозначены районы, которые не тестировались в нашем эксперименте.

Таблица 2. Классификация расположенных в “летальных” зонах генов, которые могут взаимодействовать с *lawc/Taf2*

Базовые факторы комплекса РНК-полимеразы II	Специфические факторы транскрипции/локализация	Факторы, участвующие в компактизации хроматина	Гены митоза
<i>MAT</i> (TF _{IIH})	net/21B1	<i>MTF-1 Metal regulatory transcription factor 1</i> – специфический фактор транскрипции (комплекс РНК-полимеразы II)/67B5-67B6	<i>Top2 (Topoisomerase 2)</i>
<i>Ss11</i> (TF _{IIH})	<i>bsh (brain-specific homeobox)/3&A3</i>	<i>Top3alpha (Topoisomerase 3alpha)</i>	<i>Vls (valois)</i>
<i>Tfb4</i> (TF _{IIH})	<i>E2f2 (E2F transcription factor 2)/39A5</i>	<i>spir (spire)/организация и биогенез актиновых компонентов цитоскелета</i>	<i>barr/конденсация хромосом</i>
<i>Tfb2</i> (TF _{IIH})	<i>Mio (Mx interactor)/39C1-39C2</i>	<i>dia (diaphanous)/организация актиновых компонентов цитоскелета</i>	<i>CG2508/анафаза митоза</i>
<i>Hay</i> (TF _{IIH})	<i>crc (cryptocephal)/39C2-39C3</i>	<i>Df31 (Decondensation factor 31)/ремоделирование хроматина</i>	<i>cnn/сборка веретена деления</i>
<i>Taf60 (TBP-associated factor 60kD) – TF_{IID}</i>	<i>dimm (dimmed)/39D1</i>		<i>Sse (Separase)/протеиназа, основной белок, контролирующий расхождение хромосом</i>
<i>Taf150 (TBP-associated factor 150kD) – TF_{IID}</i>	<i>Bin (biniou)/65D6</i>		<i>CG17498/чек-пойнт митотического веретена деления</i>
<i>Taf110 (TBP-associated factor 110kD) – TF_{IID}</i>	<i>Jra (Jun-related antigen)/46E4-46E5</i>		<i>Vj1/конденсация митотических хромосом</i>
<i>Taf30α (TBP-associated factor 30kD) – TF_{IID}</i>	<i>vis (vismay)/49A10</i>		<i>eIF-4E</i>
<i>e(y)1/Taf40 (TBP-associated factor 40kD) – TF_{IID}</i>	<i>achi (achintya)/49A10</i>		<i>Gap1</i>
<i>Taf12L/Taf30-2 (TBP-associated factor 30kD subunit-2) – TF_{IID}</i>	<i>bic (bicaudal)/49D6</i>		
<i>Taf18 (TBP-associated factor 18kD) – TF_{IID}</i>	<i>MTF-1 (Metal regulatory transcription factor 1)/67B5-67B6</i> <i>lolal (lola like)/55B9</i> <i>tsh (teashirt)/40A5</i>		

признаков (*Taf9/e(y)1*). Мутация *e(y)2* не повлияла на фенотип *lawc^{p1}*.

Нарушения в репродуктивной системе самцов *lawc^{p1}e(y)1^{u1}/Y*. У самцов герминативная и две соматические стволовые клетки одновременно делятся. В результате деления каждой стволовой клетки одна дочерняя клетка сохраняет свою функцию, а одна дифференцируется (рис. 3). Дифференцирующиеся соматические клетки, цистобласты, больше не делятся, а клетки полового пути, гониобласты, претерпевают 4 митотических деления с неполным цитокинезом, образуя 16-клеточную сперматоцисту. Каждая из 16 клеток в результате мейоза формирует 4 сперматозоида. Таким образом, из каждого гониобласта в норме образуется 64 сперматозоида.

Морфологический анализ репродуктивной системы мутантных самцов *lawc^{p1}e(y)1^{u1}/Y* показал, что их стерильность вызвана нарушением дифференцировки герминативных клеток на стадии сперматоцитов I порядка (перед первым мейотическим делением). Хроматин у самцов *lawc^{p1}e(y)1/Y* декомпактизован, хромосомы разбросаны по периферии клетки. В результате стадия сперматоцита первого порядка затягивается, мейотические формы практически отсутствуют. На рис. 4 представлена иллюстрация возникающих аномалий, сперматоциты отличаются от нормы более размытым окрашиванием хроматина.

В ряде случаев происходит нарушение расхождения хромосом, при котором формируются полиплоидные клетки. На рис. 3 в рамке внизу видно аномальное деление клетки, в результате кото-

Таблица 3. Взаимодействие *lawc^{p1}* с мутациями и/или делециями генов, кодирующих субъединицы базовых факторов транскрипции РНК-полимеразы II (TF_{II}) и TBP-ассоциированных факторов (TAFs)

Ген [локализация]	Df номер линии	Самки	Подопытные самцы	Контрольные самцы	Фенотип компаундов
TF_{II}H					
<i>SsII</i> [79F5-6]	79F; 80A #4370	271	73	48	Аномалия тергитов, микрохет и всего DC-кластера щетинок.
<i>MAT1</i> [47B7-10]	46D7-9; 47F15-16 #447	310	0	126	† (Компаунды не живут)
<i>Tfβ4</i> [21E3-4]	21D1-2; 22B2-3 #3084	327	74	98	Слегка “грубоватые” глаза, слабое усиление трансформации аристы.
<i>Tfβ2</i> [71D3-E1]	71C; 71F #2992	177	26	23	Слабое усиление, “грубые” глаза.
	71F1-4; 72D1-10 #3640	156	32	65	Недоразвитие ног у 50% компаундов.
<i>hay</i> [67E3-4]	67E1-2; 68C1-2 #89	126	39	21	Сильная трансформация аристы с высокой пенетрантностью.
TF_{II}E					
<i>TF_{II}Eα</i> [68C12-13]	68B1-3; 68F3-6 #2610	94	24	26	Нет взаимодействий.
	68C8-11; 69B4-5 #2612	59	19	15	Нет взаимодействий.
	68A2-3; 69A1-3 #264	60	18	22	Нет взаимодействий.
<i>TF_{II}Eβ</i> [64B5-6]	63E1-2; 64B17 #3687	67	18	20	Нет взаимодействий.
	63F4-7; 64C13-15 #3686	103	10	12	Нет взаимодействий.
TF_{II}B					
<i>TF_{II}B</i> [31E1-2]	31C-D; 32D-E #1469	272	54	54	Нет взаимодействий.
	31B; 32A #3366	158	44	19	Нет взаимодействий.
TF_{II}D					
<i>TBP (TATA-binding protein)</i> [57B7-10]	57B4; 58B #2605	166	22	25	Супрессия крылового фенотипа.
	57B4; 58B #2606	328	51	72	Супрессия крылового фенотипа.

Таблица 3. Окончание

Ген [локализация]	Df номер линии	Самки	Подопытные самцы	Контрольные самцы	Фенотип компаундов
Tafs (TBP-associated factors)					
Taf60 [76B9-11]	Taf60¹	491	0	105	† (Компаунды не живут)
	76B1-2; 76D5 #3617	402	37	102	Ноги-культы, много эктопических щетинок. Снижение выживаемости в 2.8 раза
Taf150 [67C3-4]	67A2(67A5); 67D7-13 (67D9-13); #997	146	0	56	† (Компаунды не живут)
	72C1-D1; 73A3-4 #2993	273	37	27	Очень сильная трансформация аристы.
Taf110 [72D5-7]	Taf110¹	210	130	80	Нет взаимодействий.
	84A1-2; 84A4-5 #2172	266	60	54	Нет взаимодействий.
Taf230 [84A2]	Taf230¹ #5300	226	52	41	Нет взаимодействий.
	84A1-2; 84B1-2 #1884	62	27	30	Нет взаимодействий.
	86E2-3; 87C6-7 #3003	17	0	16	† (Компаунды не живут)
Taf30α [86E20-F1]	86E3; 87A9 #5916	134	17	14	Нет взаимодействий.
	86C13; 87B1-5 #3128	151	68	71	Нет взаимодействий.
	30C1-2; 30F #556	491	158	130	Нет взаимодействий.
Taf30β [30D1] Taf24, Taf16 [23B1]	23A6; 23B1 #3910	118	56	41	Нет взаимодействий.
	23C1; 23E1-2 #1567	130	40	37	Нет взаимодействий.
	22F3-4; 23C3-5 #90	97	23	42	Нет взаимодействий.

Примечание: во второй графе жирным шрифтом отмечены районы локализации делеций, совпадающие с районом локализации соответствующего транскрипционного фактора.

Таблица 4. Новая и старая номенклатура генов семейства *Taf*, используемых в нашей работе

Новое название	Старое название
TAF1	TAFII230
TAF2	TAFII150
TAF4	TAFII110
TAF6	TAFII60
TAF9	TAFII40
TAF10	TAFII24
TAF10b	TAFII16
TAF11	TAFII30 beta
TAF12	TAFII30 alpha

рого весь хроматин сосредотачивается только в одной из дочерних клеток. Вероятно, нарушение конденсации хроматина вызывает его аномальную сегрегацию из-за невозможности прикрепления нитей веретена деления к центромерам. Это приводит к гибели клеток и дефициту сперматозоидов у мутантных самцов *lawc^{p1}e(y) I^{u1}/Y*.

У самцов дикого типа семенные пузырьки наполнены спермой. У мутантных самцов зрелая сперма практически отсутствует, семенной пузырек спавшийся (рис. 4). Перед тем как разделиться, сперматозоиды у самцов дикого типа упакованы плотными, ярко окрашивающимися “пачками”. У мутантных особей таких конгломератов

Таблица 5. Взаимодействие *lawc^{p1}* с мутациями и/или делециями ряда основных транскрипционных факторов РНК-полимеразы II. Подчеркнуты локусы, мутации в которых приводят к летальному исходу на фоне *lawc^{p1}*

Сильные взаимодействия	Нет взаимодействий
<i>TF_{II}H</i> (<i>Ssl1</i> , <u><i>MAT1</i></u> , <i>Tfb4</i> , <i>Tfb2</i> , <i>hay</i>) <u><i>e(y)3</i></u>	<i>TF_{II}E</i> (<i>TF_{II}Eα</i> , <i>TF_{II}Eβ</i>) <i>TF_{II}B</i> <i>TF_{II}D</i> (<i>TBP</i> (<i>TATA-binding protein</i>))
<i>Tafs</i> (<i>TBP-associated factors</i>):	
<u><i>Taf60</i></u> , <u><i>Taf150</i></u> , <i>Taf110</i> , <u><i>Taf30α</i></u> , <u><i>e(y)1/Taf40</i></u>	<i>Taf250</i> , <i>Taf30</i> , <i>Taf24</i> , <i>Taf16</i>

нет, возможно, это следствие не только редкого вступления в мейоз, но и гибели части клеток.

Таким образом, совмещение мутаций *lawc^{p1}* и *e(y)1^{u1}* приводит к узко специфическому нарушению – самцовой стерильности, возникающей из-за отсутствия дифференцировки половых клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Целью работы было выявление “летальных” цитологических районов, в которых расположены локусы, имеющие общую с геном *lawc/Trf2* функциональную нагрузку. Для этого мы провели скрининг генома дрозофилы с использованием слабой мутации *lawc^{p1}* и набора музейных линий (deficiency kit) с делециями, в сумме перекрывающими весь геном за исключением X-хромосомы. Были выявлены 14 “летальных” цитологических зон, содержащих либо возможные гены-мишени белка TRF2, либо его позитивные регуляторы.

Важно, что иногда при уточнении “летальных” цитологических зон они могли распадаться на несколько зон с пониженной жизнеспособностью и морфологическими аномалиями у компаундных особей. Например, в секциях 36–40, где локализованы две соседствующие делеции, ряд более мелких делеций вызывает у мутантных по *lawc* особей снижение жизнеспособности, аномалии в развитии ног и фасеток глаза, а также характерные для сильных *lawc*-мутаций вырезки крыловой пластинки. Возможно, гибель особей при постановке опыта с большими делециями объясняется наличием сразу нескольких взаимодействий. В

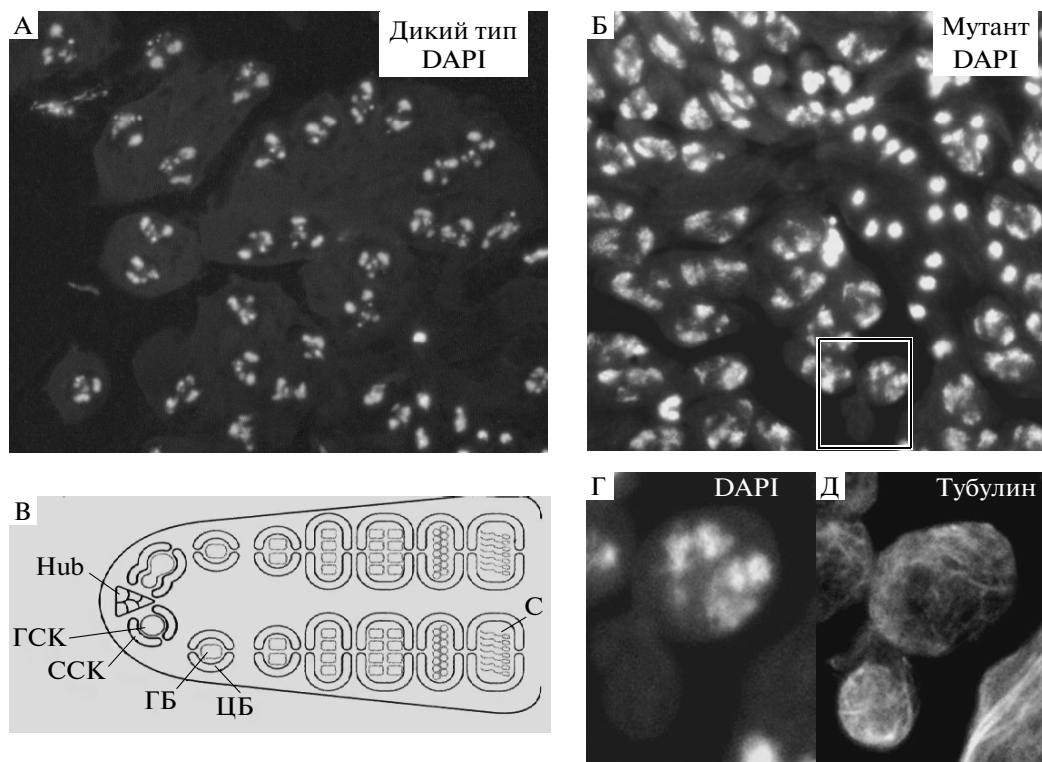


Рис. 3. Аномальное деление герминативных клеток во время сперматогенеза у мутанта *lawc^{p1}e(y)1/Y*.

А, Б – сперматоциты I порядка (А – дикий тип, Б - *lawc^{p1}e(y)1/Y*). Рамкой обозначена область с аномальным делением клетки, увеличенная на Г–Д. В – схема сперматогенеза: ГБ – гониобласты, ГСК – герминативные стволовые клетки, С – сперматозоиды, ССК – соматические стволовые клетки, ЦБ – цистобласты, Hub – группа клеток, определяющих локализацию (нишу) ГСК. Г, Д – область отмеченная рамкой на Б (Г – окрашивание DAPI, Д – окрашивание антителами к тубулину (использовался как маркер веретена деления)).

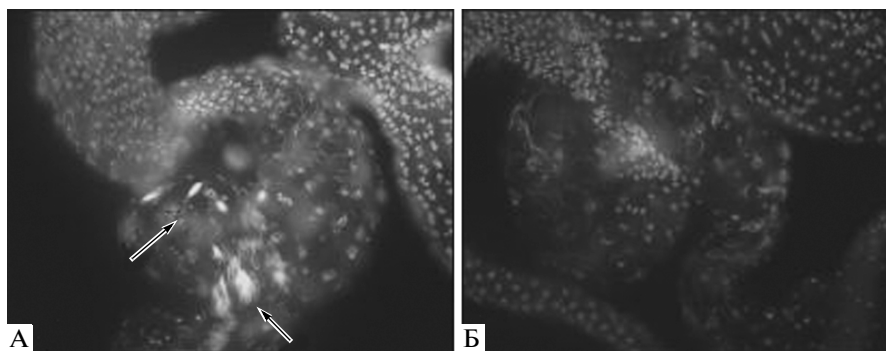


Рис. 4. Семенник особи дикого типа (А) и стерильного мутанта (Б). Стрелки указывают на упакованные сперматозоиды. Окрашивание DAPI.

результате такого детального анализа были обнаружены: 12 цитологических зон, которые в гетерозиготном состоянии вызывают гибель *lawc*-мутантов; 10 цитологических зон, которые в гетерозиготном состоянии усиливают мутантный *lawc*-фенотип; и 4 цитологические зоны, которые в гетерозиготном состоянии супрессируют мутантный *lawc*-фенотип.

В настоящее время в крупнейших американских и европейских лабораториях в рамках проекта “Genome Project” идет работа по насыщению генома инсерционными мутациями в области предполагаемых рамок считывания неизвестных пока генов. Мы планируем использовать имеющиеся в мировых коллекциях линии с такими мутациями в генах, локализованных в “летальных” цитологических районах, для постановки генетических экспериментов.

Первые гены-мишени фактора TRF2 были идентифицированы в экспериментах по коиммунопреципитации, в которых было обнаружено, что TRF2 ассоциирован с 18 полипептидами, среди которых были компоненты хроматин-ремодулирующего комплекса NURF, включая каталитическую субъединицу АТФ-азу ISWI, и фактор DREF, связывающийся с последовательностью DRE (DNA replication-related element; 5'-TATC-GATA) (Hochheimer et al. 2002, табл. 6).

DREF, как известно, вовлечен в регуляцию генов, контролирующей клеточный цикл и клеточную пролиферацию, таких, как *proliferating cell nuclear antigen (PCNA)*, посредством связывания с последовательностью DRE — альтернативным сайтом начала транскрипции, расположенном выше промотора этого гена, регулируемого комплексом TF_{II}D. Стоит отметить, что по данным компьютерного анализа генома дрозофилы элемент DRE входит в состав многих промоторов и является превалирующим коровым промоторным мотивом (Ohler et al. 2002; Tomancak et al. 2002).

На клетках человека было показано, что сверхэкспрессия TRF2 активирует транскрипцию промотора гена *neurofibromatosis type 1 gene (NF-1)*, не имеющего TATA-бокса (TATA-less). Интересно, что этот эффект зависел от его способности связываться с TF_{II}A. Также, сверхпродукция TRF2 репрессировала транскрипцию гена *c-fos*, промотор которого содержит TATA-бокс. Предполагают, что причиной этого явилось TRF2-опосредованное изолирование фактора TF_{II}A от промотора, то есть, избыточный TRF2 связывался с TF_{II}A и не давал ему контактировать с промотором (Chong et al. 2005).

Было показано, что схожим образом, через свою способность связываться с TF_{II}A, TRF2 цыпленка может ингибировать транскрипцию с TATA-промоторов и стимулировать транскрипцию с промоторов без TATA-бокса (TATA-less), а TRF2 мыши ингибировать транскрипцию гена *wee1* (Ohbayashi et al., 2003; Tanaka et al., 2007). Мы не изучали взаимодействия *lawc/Trf2* с TF_{II}A, зато впервые показали, что *lawc/Trf2* генетически взаимодействует с компонентами другой субъединицы комплекса РНК-полимеразы II — TF_{II}H (гены *Ssl1, MAT1, Tfb4, Tfb2, hay*) (табл. 3).

По данным Рабенштейна с соавторами (Rabenstein et al., 1999) сайты связывания TRF2 на политенных хромосомах *D. melanogaster* отличаются от сайтов локализации ТВР и TRF1. Иммуноокрашивание политенных хромосом слюнных желез личинки дрозофилы показало, что TRF2 локализуется в сайтах 74EF, 75B, 45F-46A, 55E, 71DE, 72D, 78D, 85EF, 88D, 93D, а также еще в 40 других сайтах. Первые четыре из упомянутых сайтов, совпадают с районами, которые становились гаплонедостаточными на фоне мутации *lawc^{pl}*.

Хотя функция TRF2 до конца не выяснена, показана его необходимость для эмбриогенеза и сперматогенеза модельных организмов. Исследование функций TRF2 у *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* и *Danio rerio* продемонстрировало необходимость TRF2 для контроля генов, экспрес-

Таблица 6. Характеристика генов, кодирующих субъединицы, входящие в состав TRF2-содержащего комплекса, выявленного Хокхеймером с соавторами (Hochheimer et al., 2002)

Ген*	Локализация	Особенности белкового продукта	Ссылки
<i>CG30020</i>	47C5**	ДНК-связывающий белок, возможно, мишень Dorsal.	Stathopoulos, et al., 2002.
<i>putzig (pzig)</i>	78C5	Связывается с ДНК, участвует в организации структуры хромосом, необходим для клеточной пролиферации.	Kugler et al., 2007.
<i>Imitation SWI (Iswi)</i>	49B10**	Являясь АТФазой комплекса <i>NURF</i> , участвует в АТФ-зависимом ремоделировании хроматина. Ассоциирован с микротрубочками веретена и необходим для хромосомной сегрегации.	Corona et al., 2007; Yokoyama et al., 2009.
<i>CG12272</i>	72D8	<i>CG12272</i> – не исследован.	
<i>CG13957</i>	14B9***	<i>CG13957</i> – не исследован.	
<i>DNA replication-related element factor (DREF)</i>	30F2-30F3	Транскрипционный фактор, участвует в организации митотического веретена деления, регулирует транскрипцию на промоторах, зависимых от РНК-полимеразы II.	Hirose, et al., 1993.
<i>trailer hitch (tral)</i>	69C4***	Вовлечен в пост-транскрипционную регуляцию работы генов, участвуя в транспортировке везикул от эндоплазматического ретикулума к комплексу Гольджи; в организацию актинового цитоскелета; в организацию цитоскелета из микротрубочек; в спецификацию дорсо-вентральной оси ооцита.	Monzo et al., 2006; Snee, Macdonald, 2009.
<i>washout (wash)</i>	48E6	Участвует в формировании трахейной системы.	Liu, et al., 2009.
<i>Chromatin assembly factor 1 subunit (CAF-1)</i> синоним <i>NURF-55</i>	88E3	Компонент комплексов, участвующих в модификации гистонов и ремоделировании хроматина.	Martinez-Balbas et al., 1998; Parrish et al., 2006; Ridgway, Almouzni, 2000.
β - <i>Tubulin at 60D</i> (β <i>Tub60D</i>)	60C6	Структурный компонент цитоскелета. Контролирует поведение личинок, аксоногенез.	Bialojan, et al., 1984; Hoyle, Raff, 1990.
<i>Nucleosome remodeling factor 38kD</i> (<i>NURF-38</i>)	60D5	Неорганическая дифосфатазная активность. Вовлечен в передачу сигналов через экдизоновый рецептор; в формирование нуклеосом; транскрипцию; ремоделирование хроматина.	Tsukiyama, Wu, 1995; Gdula et al., 1998.

Примечания:

* – В скобках дано сокращенное название гена.

** – Совпадает с районом, модифицирующим *lawc*-фенотип.

*** – Район на взаимодействие с *lawc^{p1}* не исследовали.

сирующихся на стадии зиготы (ранние стадии эмбриогенеза). С другой стороны, инактивация гена *Trf2* у мышей продемонстрировала отсутствие его влияния на эмбриогенез, но показала, что он необходим для сперматогенеза (Shimada et al., 2003). Наши данные, полученные на *D. melanogaster*, говорят о том, что TRF2 функционирует в сперматогенезе совместно с продуктом

гена *e(y)1*, поскольку снижение экспрессии *e(y)1* у мутантов *lawc^{p1}* оказалось критичным для сперматогенеза. Самцы *lawc^{p1}e(y)1^{u1}* не могли размножаться из-за дефектов, вызванных слабой дифференцировкой сперматоцитов первого порядка. Мутантов *lawc*, специфически нарушающих сперматогенез, пока не обнаружено. Однако следует отметить, что у самцов *ph^{p1}lawc^{p1}/Y* из линии

с репрессией гена *lawc* при помощи химерного белка Р-Ph (Belenkaya et al., 1998) также наблюдается задержка в прохождении I митотического деления (Модестова и др., 2003). В семенниках накапливаются сперматоциты первого порядка, в семяприемниках обнаруживается небольшое количество спермы, но потомство эти особи оставляют, несмотря на сокращенную продолжительность жизни. То есть в обеих линиях *lawc^{p1}e(y)I^{u1}* и *ph^{p1}lawc^{p1}* возникают сходные нарушения, но степень их выраженности различается. Учитывая этот факт можно предположить, что продукт гена *e(y)I* участвует в тканеспецифической, ограниченной половой системой самцов, регуляции экспрессии *lawc/Trf2*. Известно, что ген *e(y)I* кодирует белок TAF_{II}40 (TAF9, согласно новой классификации (табл. 4, Tora L. 2002)) и экспрессируется преимущественно в яичниках (Soldatov et al., 1999). Мы впервые в генетических экспериментах получили доказательства того, что *e(y)I* может функционировать также в семенниках, очевидно взаимодействуя с геном *lawc/Trf2*.

Было показано, что TAF_{II}40 колокализуется с другим белком семейства TAF_{II} – TAF_{II}60 (TAF6 по новой классификации) и происходит это вблизи промоторов DPE (Burke, Kadonaga, 1997). В генетических экспериментах на дрозофиле было выявлено, что мутации, нарушающие аминокислотные последовательности TAF_{II}40 и TAF_{II}60, приводят как к понижению, так и к усилению транскрипции генов, чья экспрессия контролируется или предположительно контролируется промоторами DPE (Soldatov et al., 1999; Aoyagi, Wassarman, 2001). Природа промотора *lawc/Trf2* до сих пор не выяснена. Чтобы проанализировать, как влияет TAF_{II}60 на экспрессию TRF2, мы объединили мутации, кодирующих их генов *lawc^{p1}* и *Taf60^l*. Внедрение одной дозы мутации *Taf60^l* в мух линии *lawc^{p1}* привело к гибели особей *lawc^{p1}; Taf60^l/+* на ранних стадиях развития (табл. 3). Из этого следует вывод о том, что в отличие от *TAF_{II}40/e(y)I* характер взаимодействий *Taf_{II}60* с *lawc/Trf2* менее специфичен.

С белком TAF_{II}40 взаимодействует продукт другого гена – *e(y)2*. Было показано, что этот ген кодирует эволюционно консервативный фактор транскрипции, который формирует с TAF_{II}40 комплексы на хромосомах (Georgieva et al., 2001). В наших экспериментах снижение концентрации белка E(Y)2 не повлияло на фенотип *lawc*-мутантов, на их репродуктивность или жизнеспособность. Отсутствие генетических взаимодействий предполагает либо наличие неких компенсаторных механизмов, восстанавливающих нехватку белка E(Y)2, либо несущественность снижения концентрации этого белка для процессов, контролируемых белком TRF2. Возможно и то, что при регуляции сперматогенеза TAF_{II}40 может

входить в состав транскрипционных комплексов и без своего напарника E(Y)2.

Совмещение *lawc^{p1}* с *e(y)3^{u1}* приводило к гибели особей. Ген *e(y)3* кодирует белок Supporter of Activation of Yellow Protein (SAYP) (Shidlovskii et al., 2005; Chalkley et al., 2008). Недавно показали, что в состав SAYP входит эволюционно консервативный домен SAY, способный связываться с субъединицей комплекса ремоделирования хроматина Brahma (SWI/SNF) – VAP170 – и субъединицей преинициаторного транскрипционного комплекса TF_{II}D – TAF5. В результате на промоторе формируется стабильный суперкомплекс VTFly (Brahma and TF_{II}D in one assembly), который выступает, в качестве активатора транскрипции (Vorobyeva et al., 2009). Гибель мутантов, несущих одновременно две слабые мутации *lawc^{p1}* и *e(y)3^{u1}*, каждая из которых по отдельности не нарушает жизнеспособность, говорит о взаимодействиях этих двух генов. Двойные мутанты восстанавливают жизнеспособность на фоне эктопической экспрессии как TRF2, так и SAYP. Однако в последнем случае у “спасенных” особей появляется сильный *lawc*-фенотип (трансформация аристы в тарзусные структуры, вырезки на крыльях, дополнительные макрохеты). Это доказывает специфическое участие белков TRF2 и SAYP в выявленных взаимодействиях. Возможно, суперкомплекс VTFly является позитивным активатором гена *lawc/Trf2*. Возможно также, что TRF2, являясь альтернативным фактором белка ТВР в составе TF_{II}D, может взаимодействовать с суперкомплексом VTFly через белок SAYP. Другой вариант – существование альтернативного суперкомплекса, включающего компоненты TRF2-содержащего комплекса (NURF и др.) и белок SAYP. В дальнейшей работе мы планируем исследовать причину гибели двойных мутантов.

Мы выражаем благодарность Bloomington Drosophila Stock Center за предоставленные линии дрозофил с набором делеций (Deficiency Kit). Также благодарим П.Г. Георгиева за предоставленные линии дрозофил с мутациями генов группы *e(y)*, *taf_{II}60*, *taf_{II}110* и *taf_{II}150*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воронцова Ю.Е., Модестова Е.А., Бурдина Н.В. и др. Восстановление жизнеспособности летальных мутантов гена *leg-arista-wing complex* на фоне конструкций, экспрессирующих домены гена *trf2*, у *Drosophila melanogaster* // ДАН. 2007. Т. 417. № 1. С. 133–135.
- Копытова Д.В., Краснов А.Н., Симонова О.Б. и др. Изучение гена *lawc-trf2* *Drosophila melanogaster*, и его белкового продукта // ДАН. 2005. Т. 405. № 1. С. 380–382.
- Модестова Е.А., Копытова Д.В., Георгиева С.Г. и др. Использование генетической системы химерного

- белка Р-Ph для репрессии транскрипции гена *leg-
arista-wing complex* у дрозофилы // Генетика. 2003.
№ 5. С. 713–716.
- Петрук С.Ф., Джагаева И.В., Солдатов А.В. и др. Кло-
нирование гена гена *leg-arista-wing complex (lawc)* и
анализ его мутантных производных у дрозофилы //
Генетика. 1998. Т. 34. № 3. С. 446–448.
- Симонова О.Б., Кузин Б.А., Георгиев П.Г. и др. Новая ре-
гуляторная мутация *Drosophila melanogaster* // Гене-
тика. 1992. № 2. Т. 28. С. 164–167.
- Симонова О.Б., Петрук С.Ф., Корочкин Л.И. Генетиче-
ский анализ мутации *lawc^{p1}* в ее комбинациях с
различными аллелями генов AS-C у дрозофилы //
Генетика. 1996. Т. 32. № 7. С. 949–955.
- Симонова О.Б., Петрук С.Ф., Джагаева И.В. и др. Роль
мутации *lawc^{p1}* в регуляции экспрессии локуса
white у дрозофилы // Генетика. 1998. Т. 34. №3.
С. 349–354.
- Симонова О.Б. Новый транс-регуляторный локус дро-
зофилы // Генетика. 2000. Т. 36. № 11. С. 1464–
1474.
- Aoyagi N, Wassarman D.A. Developmental and transcrip-
tional consequences of mutations in *Drosophila*
TAFII60 // Mol. Cell. Biol. 2001. V. 21. P. 6808–19
- Belenkaya T., Soldatov A., Nabirochkina E. et al. P-Element insertion at the *polyhomeotic* gene leads to formation of a novel chimeric protein that negatively regulates *yellow* gene expression in P-element-induced alleles of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1998. V. 150. P. 687–697.
- Bialojan S., Falkenburg D., Renkawitz-Pohl R. Characterization and developmental expression of β tubulin genes in *Drosophila melanogaster* // EMBO J. 1984. V. 3. P. 2543–2548.
- Burke T.W., Kadonaga J.T. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila* // Genes Dev. 1997. V. 11. P. 3020–31.
- Chalkley, G.E., Moshkin, Y.M., Langenberg, K. et al. The transcriptional coactivator SAYP is a trithorax group signature subunit of the PBAP chromatin remodeling complex // Mol. Cell Biol. 2008. V. 28. P. 2920–2929.
- Chong J.A., Moran M.M., Teichmann M. et al. TATA-binding protein (TBP)-like factor (TLF) is a functional regulator of transcription: reciprocal regulation of the neurofibromatosis type 1 and c-fos genes by TLF/TRF2 and TBP // Mol. Cell Biol. 2005. V. 25. № 7. P. 2632–43.
- Corona D.F.V., Siriaco G., Armstrong J.A. et al. ISWI regulates higher-order chromatin structure and histone H1 assembly *in vivo* // PLoS Biol. 2007. V. 5. № 9. P. 2011–2022.
- Gdula D.A., Sandaltzopoulos R., Tsukiyama T. et al. Inorganic pyrophosphatase is a component of the *Drosophila* nucleosome remodeling factor complex // Genes Dev. 1998. V. 12. № 20. P. 3206–3216.
- Georgiev P.G., Gerasimova T.I. Novel genes influencing the expression of the *yellow* locus and *mdg4 (gypsy)* in *Drosophila melanogaster* // Mol. Gen. Genet. 1989. V. 220. P. 121–126.
- Georgiev P.G., Kiselev S.L., Simonova O.B. et al. A novel transposition system in *Drosophila melanogaster* depending on the Stalker mobile genetic element // EMBO J. 1990. V. 9. № 7. P. 2037–2044.
- Georgieva S., Nabirochkina E., Dilworth F.J. et al. The novel transcription factor e(y)2 interacts with TAF(II)40 and potentiates transcription activation on chromatin templates // Mol. Cell Biol. 2001. V. 21. № 15. P. 5223–5231.
- Hirose F., Yamaguchi M., Handa H. et al. Novel 8-base pair sequence (*Drosophila* DNA replication-related element) and specific binding factor involved in the expression of *Drosophila* genes for DNA polymerase and Proliferating Cell Nuclear Antigen. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 3. P. 2092–2099.
- Hochheimer A., Zhou S., Zheng S. et al. TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila* // Nature. 2002. V. 420. P. 439–445.
- Hoyle H.D., Raff E.C. Two *Drosophila* beta tubulin isoforms are not functionally equivalent // J. Cell Biol. 1990. V. 111. № 3. P. 1009–1026.
- Kugler S.J., Nagel A.C. Putzig is required for cell proliferation and regulates Notch activity in *Drosophila* // Mol. Biol. Cell. 2007. V. 18. № 10. P. 3733–3740.
- Lindsley D.M., Zimm G. The genome of *Drosophila melanogaster* NY: Academic Press, Inc. 1992. P. 1134.
- Liu R., Abreu-Blanco M.T., Barry K.C. et al. Wash functions downstream of Rho and links linear and branched actin nucleation factors // Development. 2009. V. 136. № 16. P. 2849–2860.
- Martinez-Balbas M.A., Tsukiyama T., Gdula D. et al. *Drosophila* NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 132–137.
- Monzo K., Papoulas O., Cantin G.T. et al. Fragile X mental retardation protein controls *trailer hitch* expression and cleavage furrow formation in *Drosophila* embryos // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 48. P. 18160–18165.
- Ohbayashi T., Shimada M., Nakadai T. et al. Vertebrate TBP-like protein (TLP/TRF2/TLF) stimulates TATA-less terminal deoxynucleotidyl transferase promoters in a transient reporter assay, and TFIIA-binding capacity of TLP is required for this function // Nucleic Acids. Res. 2003. V. 31. № 8. P. 2127–2133.
- Ohler U., Liao G.C., Niemann H. et al. Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome // Genome Biol. 2002. V. 3. № 12. P. 871–812.
- Parks A.L., Cook K.R., Belvin M. et al. Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. // Nat. Genet. 2004. V. 36. № 3. P. 288–292.
- Parrish J.Z., Kim M.D., Jan L.Y. et al. Genome-wide analyses identify transcription factors required for proper morphogenesis of *Drosophila* sensory neuron dendrites // Genes Dev. 2006. V. 20. № 7. P. 820–835.
- Persengiev S.P., Zhu X., Dixit B.L. et al. TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed // PNAS. 2003. V. 100. № 25. P. 14887–14891.
- Rabenstein M.D., Zhou S., Lis J.T. et al. TATA box-binding protein (TBP)-related factor 2 (TRF2), a third member of the TBP family // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 9. P. 4791–4796.

- Ridgway P., Almouzni G. CAF-1 and the inheritance of chromatin states: at the crossroads of DNA replication and repair // *J. Cell Sci.* 2000. V. 113. № 15. P. 2647–2658.
- Shidlovski Y.V., Krasnov A.N., Nikolenko J.V. et al. A novel multidomain transcription coactivator SAYP can also repress transcription in heterochromatin // *EMBO J.* 2005. V. 24. № 1. P. 97–107.
- Shimada M., Nakadai T., Tamura T.A. TATA-binding protein-like protein (TLP/TRF2/TLF) negatively regulates cell cycle progression and is required for the stress-mediated G(2) checkpoint // *Mol. Cell Biol.* 2003. V. 23. P. 4107–4120.
- Snee M.J., Macdonald P.M. Bicaudal C and trailer hitch have similar roles in *gurken* mRNA localization and cytoskeletal organization // *Dev. Biol.* 2009. V. 328. № 2. P. 434–444.
- Soldatov A., Nabirochkina E., Georgieva S. et al. TAFII40 protein is encoded by the *e(y)I* gene: biological consequences of mutations // *Mol. Cell Biol.* 1999. V. 19. № 5. P. 3769–3778.
- Stathopoulos A., Van Drenth M., Erives A. et al. Whole-genome analysis of dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Cell.* 2002. V. 111. № 5. P. 687–701.
- Tanaka Y., Nanba Y.A., Park K.A. et al. Transcriptional repression of the mouse *wee1* gene by TBP-related factor 2 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 352. № 1. P. 21–28.
- Thibault S.T., Singer M.A., Miyazaki W.Y. et al. A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. № 3. P. 283–287.
- Tora L. A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription // *Genes Dev.* 2002. V. 16. P. 673–675.
- Tomancak P., Beaton A., Weiszmann R. et al. Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis // *Genome Biol.* 2002. V. 3. № 12. P. 88.1–88.14.
- Tsukiyama T., Wu C. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor // *Cell.* 1995. V. 83. № 6. P. 1011–1020.
- Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Nikolenko J.V. et al. Transcription coactivator SAYP combines chromatin remodeler Brahma and transcription initiation factor TFIID into a single supercomplex // *PNAS.* 2009. V. 106. № 27. P. 11049–11054.
- Yokoyama H., Rybina S., Santarella-Mellwig R. et al. ISWI is a RanGTP-dependent MAP required for chromosome segregation // *J. Cell Biol.* 2009. V. 187. № 6. P. 813–829.

Recovery of Genomic Regions Affecting *lawc/Trf2* Expression during *Drosophila melanogaster* Development

O. B. Simonova^a, E. A. Modestova^b, Yu. E. Vorontsova^a, and R. O. Cherezov^a

^a Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ulitsa Vavilova dom 26, Moscow 119334

^b Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, ulitsa Vavilova dom 34/5, Moscow 119334
e-mail: osimonova@hotmail.com

Abstract—*Leg-arista-wing complex (lawc)* mutations affect the expression of *D. melanogaster* proteins homologous to a human basic transcription factor, TBP (TATA-box binding protein) Related Factor 2 (TRF2), specifically involved in development. The paper for the first time reports the application of genetic screens for various genomic regions to recover genetic interactions between the *lawc/Trf2* gene and other genes and genetic loci by using Deficiency Kit lines with small deletions in total providing maximal coverage of the genome. The deletion mapping allowed us to recover 26 genomic regions that, when deleted, are lethal or modify the mutant phenotype due to a decreased TRF2 expression level. These deletions could be useful in identifying both novel TRF2 targets and its positive and negative regulators. There is evidence that TRF2 can be a component of high molecular DNA Replication-related Element Factor (DREF)- and Nucleosome Remodeling Factor (NURF)-containing complexes. The present study for the first time reports new genetic interactions of *lawc/Trf2* with genes that encode basic and specific transcription factors. In most cases, if mutated, those genes caused developmental defects or death of progeny. However, in the case of the *e(y)I* gene, coding for the *Taf9* transcription factor, only the male reproductive system is impaired when the *lawc/Trf2* phenotype is associated with a *e(y)I* gene mutation. Mutant *lawc^{P1}e(y)I^{u1}* males become infertile due to primary spermatocyte maturation arrest and impaired premeiotic chromosome condensation in germ cells.

Keywords: deletion, autosome, cytological map, expressivity, penetrance, genetic screening, haploinsufficiency, transcription factor, spermatogenesis, *Drosophila melanogaster*