

	<i>Название статьи</i>	<i>Страницы</i>	<i>Цит.</i>
ОБЗОР			
<input type="checkbox"/>	НЕОНАТАЛЬНЫЕ ИНЪЕКЦИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ ГЕНОТИП-ЗАВИСИМЫЕ ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ У МЫШЕЙ И КРЫС <i>Полетаева И.И., Перепелкина О.В., Бояршинова О.С., Лильп И.Г., Маркина Н.В., Тимошенко Т.В., Ревещин А.В.</i>	387	0
<input type="checkbox"/>	Н.К. КОЛЬЦОВ И ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭМБРИОЛОГИИ (К 140-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ) <i>Помелова М.А.</i>	401	1
ФИЗИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ			
<input type="checkbox"/>	ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ КАЛЬЦИТОНИН ГЕН РОДСТВЕННЫЙ ПЕПТИД В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА АФФЕРЕНТАЦИИ У КРЫСЫ <i>Порсева В.В., Стрелков А.А., Шилкин В.В., Маслюков П.М.</i>	405	4
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ			
<input type="checkbox"/>	ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСПОРТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТОННЫХ НАСОСОВ КЛЕТОК КОЛЕОПТИЛЕЙ НА РАННИХ ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ <i>Шишова М.Ф., Танкелюн О.В., Рудашевская Е.Л., Емельянов В.В., Шахова Н.В., Кирпичникова А.А.</i>	413	1
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ			
<input type="checkbox"/>	СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO ТРЕХ ВИДОВ ЛИСТВЕННИЦЫ <i>Третьякова И.Н., Барсукова А.В.</i>	425	6
МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК			
<input type="checkbox"/>	АПОПТОЗ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В ПРЕЗУМПТИВНОЙ НЕЙРАЛЬНОЙ СЕТЧАТКЕ И ПРЕЗУМПТИВНОМ ПИГМЕНТНОМ ЭПИТЕЛИИ СЕТЧАТКИ В РАННЕМ РАЗВИТИИ ГЛАЗА У ЖАБЫ BUFO RADDEI STRAUCH <i>Хан В., Хан И.П., Ванг З.Р.</i>	436	0
ИСТОРИЯ НАУКИ			
<input type="checkbox"/>	АНДРЕЙ ПАВЛОВИЧ ДЫБАН (К 90-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ) <i>Васецкий С.Г., Дыбан П.А.</i>	447	0
<input type="checkbox"/>	К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ТАТЬЯНЫ АНТОНОВНЫ ДЕТЛАФ <i>Васецкий С.Г.</i>	450	0
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ			
<input type="checkbox"/>	ОТКРЫТИЕ ПАМЯТНОЙ ДОСКИ К.Ф. ВОЛЬФУ В ПЕТЕРБУРГСКОМ АКАДЕМИЧЕСКОМ ЦЕНТРЕ <i>Иванова Е.А.</i>	455	0

УДК 591

НЕОНАТАЛЬНЫЕ ИНЪЕКЦИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ ГЕНОТИП-ЗАВИСИМЫЕ ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ У МЫШЕЙ И КРЫС

© 2012 г. И. И. Полетаева*, О. В. Перепелкина*, О. С. Бояршинова*, И. Г. Лильп*, Н. В. Маркина*, Т. В. Тимошенко*, А. В. Ревещин**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119992 Москва, Воробьевы горы

**Институт биологии гена РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5

E-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Поступила в редакцию 26.10.10 г.

Окончательный вариант получен 14.02.11 г.

Представлен обзор экспериментальных данных, свидетельствующих, что введение новорожденным мышам и крысам ряда биологически активных соединений (АКТГ₄₋₁₀, его синтетический аналог семакс, пирарцетам, кофеин, леветирацетам, бусперон и др.) обнаруживает свой эффект во взрослом возрасте в виде изменений поведения и физиологических реакций, а также некоторых морфологических показателей. Анализировали предрасположенности к аудиогенным судорогам, выраженность реакций страха—тревоги, исследовательской активности, болевой чувствительности. Обнаруженные отдаленные эффекты неонатального введения этих веществ мышам и крысам разных генотипов по своему направлению либо совпадали с таковыми при введении их взрослым животным, так и имели противоположный знак. Подобное фармакологическое вмешательство в процессы развития ЦНС в период раннего постнатального онтогенеза видоизменяют ход нормального развития мозга. Эти модулирующие влияния предположительно можно связать с воздействием на формирование нейротрансмиттерных систем мозга. Они могут сказываться и на морфологических признаках ЦНС (число катехоламинергических нейронов, нейрогенез взрослого мозга).

Ключевые слова: онтогенез, неонатальные воздействия, генотип, аудиогенная эпилепсия, болевая чувствительность, тревожность, исследовательское поведение, мыши, крысы.

Начало серии работ, обзору которых посвящена статья, было положено сообщением Л.И. Корочкина о результатах одной из его ранних работ. В ней было обнаружено, что введение дексаметазона крысам в ранний постнатальный период вызвало у взрослых животных увеличение числа холинергических нейронов в шейном симпатическом ганглии. Предложив исследовать этот феномен, Л.И. Корочкин высказал предположение, что если нервные клетки, проходящие дифференцировку, испытывают влияние низкомолекулярных биологически активных веществ, то может произойти изменение числа нейронов той или иной “эргичности”, и этот эффект можно будет обнаружить и у взрослых животных. Сейчас очевидно, что изучение отдаленных последствий ранних воздействий на развивающийся мозг важно как в теоретическом, так и в практическом отношении (Slotkin, 1998; Viggedal et al., 1993; Vorhees, 1994; Mothes et al., 1996; Maguire, Mody, 2008). Эти феномены интенсивно исследуют, однако они остаются малоизученными в аспекте механизмов их отложенного действия. Согласно предположению О. Краера (Otto Krayer) уровни экспрессии генов

при стимуляции рецепторов в критические периоды развития изменяются по-иному, чем при такой же стимуляции зрелой ЦНС (цитировано по Slotkin, 1998). Оценка генотипических особенностей в реализации отдаленных эффектов ранних воздействий на мозг практически отсутствует. Один и тот же рецептор при этом может участвовать в сигнальных каскадах, связанных с пролиферацией, с ее остановкой, с ростом клеток и их смертью. В качестве примера Т. Слоткин приводит разную роль бета-адренергических рецепторов, стимуляция которых в раннем постнатальном онтогенезе усиливает деление клеток, а более поздняя стимуляция вызывает остановку деления клеток (Slotkin, 1998).

Обнаружены отдаленные изменения различных признаков поведения взрослых мышей и крыс после раннего введения целого ряда препаратов: этанола (Pick et al., 1993; Middaugh et al., 1994), морфина (D’Amato et al., 2001), хлорпирифоса (Venerosi et al., 2008), азид-тимидина (Venerosi et al., 2002), анестетиков (Schroeder et al., 1997, Koch et al., 2008; Loepke et al., 2009; Agrawal, Shapiro, 2005; Wang et al., 2008), никотина (Counotte et al.,

2009), кофеина (Guillet, 1995; Алексеев и др., 2003а; Tchekalarova et al., 2007), анксиолитиков (Shibuya et al., 1986), пептидов ряда групп (McGivern et al., 1987; Полетаева и др., 1996а; Шилова и др., 2000; Дубынин и др., 2000; Алексеев и др., 2003а; Бояршинова и др., 2004а, б), агонистов и антагонистов нейромедиаторов (File, Tucker, 1983; Kaindl, Ikonomidou, 2007; Mehta et al., 2007, Ammassari-Teule et al., 1990; Táira et al., 1992, 1993; Costei et al., 2002; Morford et al., 2002; Шилова и др., 2004; Cohen et al., 2005; Maple et al., 2007; Maguire, Mody, 2008; Vorhees et al., 2009; Williamsa et al., 2003, 2004; Noorlander et al., 2008; Vorhees et al., 2009 и др.), ингибитора NO-синтазы NG-нитро-L-аргинин-метил-эфир — L-NAME (Тимошенко и др., 2009а, б) и других веществ.

Ниже дается краткий обзор результатов анализа изменений поведения, физиологических и морфологических признаков, полученных нашей группой в течение ряда лет. Биологически активные агенты вводили в течение 1-й (реже — в течение 2-й) недели жизни крыс или мышей с последующей оценкой их физиологического статуса в возрасте 1 мес. или в половозрелом возрасте. Были также показаны морфологические изменения в ЦНС.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

В разных сериях опытов были использованы крысы линий КМ, Вистар и Wag/Rij, а также мыши линий CBA/Lac/Sto, C3H/He, C57BL/6J, DBA/2J, 101/HY, RLB, RSB.

Линии крыс. Инбредная линия крыс Крушинского-Молодкиной (КМ) характеризуется предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии с почти 100% пенетрантностью и высокой экспрессивностью этого признака (Семиохина и др., 2006). Аутбредная линия Вистар в конце 40-х годов послужила основой для селекции крыс линии КМ. В настоящее время небольшая и изменчивая доля (12–23%) крыс Вистар обнаруживает аудиогенные судорожные припадки невысокой интенсивности, практически никогда не имеющие тонического компонента. Крысы линии Wag/Rij, использованные в одном из исследований (Алексеев и др., 2002а), характеризуются спонтанными приступами кратковременных “малых припадков” (Kuznetsova et al., 1996). Примерно у трети животных этой линии обнаруживаются также и аудиогенные судорожные припадки (Midzyanovskaya et al., 2004).

Линии мышей. Инбредные линии CBA, DBA/2J, C3H и C57BL/6J — коммерческие стандартные линии (Бландова и др., 1983). Мыши линии DBA/2J в высоком проценте случаев предрасположены к аудиогенной эпилепсии и обнаруживают ее с 20 до 42–45-дневного возраста. Мыши линий CBA и C3H не обнаруживают аудиогенных

судорожных припадков. Линия C57BL/6J — устойчива к действию звука, однако могут стать чувствительными после процедуры прайминга (предварительному воздействию звука в возрасте 14–18 дней (Henry, 1967)). Мыши линии 101/HY обладают нестабильностью хромосомного аппарата и имеют дефекты в системе репарации ДНК, которые наследуются рецессивно и обусловлены мутацией одного гена, обозначенного *mut-1* (Карагодина, Сьяксте, 1981). Для мышей линии 101/HY характерны редко встречающееся нарушение локомоции, выражающееся в попятных движениях в новой ситуации (Полетаева и др., 1992) и предрасположенность к аудиогенной эпилепсии, которая, в отличие от мышей DBA/2J, наиболее сильно выражена у них в возрасте 2–3 мес. (Полетаева и др., 1996б). Мыши линий RLB и RSB (Russian Large Brain, Russian Small Brain) были получены каждая от одной самки линий БМ и ММ, селективированных, соответственно, на большой и малый вес мозга, и подвергнутых процедуре пересадки эмбрионов (Маркина и др., 2004).

Использованные вещества, их введение. Новорожденным мышам и крысам ряда генотипов (см. ниже) в возрасте со 2-го по 6-й дни жизни вводили АКТГ₄₋₁₀, семакс (устойчивый к расщеплению пептидазами аналог АКТГ₄₋₁₀), кетамин (неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов), кофеин (антагонист аденозиновых А-1 рецепторов), пирacetам, мелатонин (данные не представлены), бупирон (агонист 5HT-2A рецепторов), L-NAME (ингибитор NOS), леветирацетам (противосудорожное средство). Вещества, растворенные в дистиллированной воде или физиологическом растворе, вводили в течение 5 дней подкожно в область холки детенышам крыс и мышей, начиная с 2-дневного возраста, за исключением нескольких серий, в которых сроки введения были иными (см. ниже). Контрольными во всех экспериментах были две группы — 1) контроль эффекта болевой стимуляции (введение растворителя) и 2) интактные животные. Контрольные и экспериментальные животные принадлежали одному и тому же помету.

В возрасте 4 недель животных индивидуально метили, рассаживали самцов и самок и содержали до достижения ими взрослого возраста (в большинстве серий — 8 нед. и старше). Воду и корм (фирмы МЭСТ и Лабораторкорм, Москва) животные получали *ad lib*. При выполнении работы авторы придерживались биоэтических правил, изложенных в декларации 86 ЕС.

ТЕСТИРОВАНИЕ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ВЗРОСЛЫХ ЖИВОТНЫХ

Аудиогенная эпилепсия

Методика. Животное помещали в звукоизолирующую камеру, в которую подавали звук (звонок, сила 100 дБ). В случае развития аудиогенного судорожного припадка животное немедленно вынимали из камеры.

Таблица 1. Средний балл (\pm ошибка средней) аудиогенного припадка мышей разных генотипов в возрасте 1 мес. у интактных мышей, а также после неонатального введения семакса и болевой неонатальной стимуляции

Линия	Воздействие		
	семакс	бол. стимул.	интактные
DBA/2	1.16***# \pm 0.23	4.00*** \pm 0.30	2.00 \pm 0.29
СВА	1.21 \pm 0.18	0.08 \pm 0.26	0.84 \pm 0.24
101/НУ	1.21 \pm 0.19	0.96 \pm 0.18	0.95 \pm 0.19
СЗН	0.85 \pm 0.25	0.08 \pm 0.26	1.21 \pm 0.26
С57BL/6	0.08 \pm 0.26	0.00 \pm 0.27	0.00 \pm 0.38

*** – достоверно отличается от группы интактных мышей при $p < 0.001$;

– достоверно отличается от группы с неонатальной болевой стимуляцией при $p < 0.05$.

Таблица 2. Средний балл (\pm ошибка средней) аудиогенного припадка мышей разных генотипов в возрасте 1 мес. у интактных мышей, а также после неонатальной болевой стимуляции, введения кофеина и пираретама

Линия	Неонатальное воздействие			
	Интактные	Бол. стимуляция	Кофеин	Пираретам
DBA/2J	1.42 \pm 0.18	1.18 \pm 0.20 [@]	1.59 \pm 0.22	0.65 \pm 0.24**
101/НУ	1.56 \pm 0.17	1.05 \pm 0.25	3.12 \pm 0.22***#	1.96 \pm 0.18**
СВА/Lac/Sto	0.27 \pm 0.21	0.82 \pm 0.20 [@]	0.86 \pm 0.25 ^{&}	0.54 \pm 0.32

*, **, *** – достоверно отличается от группы интактных мышей при $p < 0.05$, $p < 0.01$ и $p < 0.001$ соответственно (критерий Фишера);

– достоверно отличается от группы мышей с болевой стимуляцией при $p < 0.001$ (критерий Фишера);

[@] – достоверно отличается от группы интактных мышей (тест медианы);

[&] – отличается от группы интактных мышей $p = 0.069$ (тенденция);

[§] – отличается от группы интактных мышей $p = 0.055$ (тенденция).

рожного приступа (АП) регистрировали латентный период (ЛП) его начала, а также начала его последующих фаз и интенсивность приступа в условиях баллах (Семиохина и др., 2006).

Эксперименты на мышах. В разных сериях опытов мышам линий DBA/2J, 101/НУ и СВА/Lac/Sto, СЗН, С57BL/6J в возрасте 2–6 дней вводили семакс (40 мг/кг), кофеин (200 мг/кг), пираретам (50 мг/кг) или растворитель. Небольшой группе мышей линии 101/НУ в неонатальный период вводили фрагмент АКТГ 4-10 (40 мг/кг). Эти воздействия изменили зависимым от генотипа образом интенсивность и временные показатели аудиогенных судорожных припадков этих животных в возрасте 1 мес. (табл. 1 и 2).

Интенсивность АП у взрослых мышей линии 101/НУ после неонатальной болевой стимуляции была недостоверно выше, а после введения АКТГ 4-10 – ниже, чем у интактных. Неонатальное введение семакса и болевая стимуляция резко изменили показатели АП только у мышей линии DBA/2, но не у 101/НУ (табл. 1). АП был причиной гибели некоторых животных, причем среди мышей DBA/2 погибших мышей было достоверно больше, чем среди животных других линий (21 животное – DBA/2 и 6 мышей – всех остальных линий). Это связано с тестированием их в период

наибольшей подверженности мышей данной линии аудиогенной эпилепсии. У мышей DBA/2 доля погибших животных после неонатальной болевой стимуляции ($p < 0.001$, метод ф) была достоверно выше, чем у интактных, тогда как после введения семакса она была достоверно ниже, чем при болевой стимуляции ($p < 0.01$) (Бояршинова и др., 2008).

Анализ длительности АП и его тяжести (табл. 2) с помощью двухфакторного ANOVA (по выборке мышей двух линий – DBA/2J и 101/НУ, подверженных аудиогенной эпилепсии) выявил достоверное влияние факторов “линия” и “неонатальное воздействие” (неонатальное введение кофеина и пираретама), а также достоверный эффект их взаимодействия (Маркина и др., 2006).

Таким образом, “неонатальное” введение нейропептидов, кофеина и пираретама имело отдаленные последствия в виде модуляции АП у мышей, и выявило генотипические особенности в этих реакциях. Даже у двух линий мышей, предрасположенных к АП, отдаленные эффекты неонатальных воздействий различались. Столь разные по механизму действия кофеин и пираретам сходным образом усилили АП у линии 101/НУ, но изменили его в разных направлениях у мышей линии DBA/2J.

Эксперименты на крысах. Неонатальная болевая стимуляция снизила интенсивность АП у крыс КМ и Вистар, тогда как последующее введение семакса возвратило эти показатели к уровню интактной группы. Неонатальное введение кофеина крысам КМ парадоксально ослабило интенсивность АП (у взрослых крыс кофеин усиливает предрасположенность к АП). Неонатальные воздействия были менее эффективными у крыс Вистар, и, в особенности, у крыс линии WAG/Rij (Алексеев и др., 2003а).

Неонатальное воздействие (болевая стимуляция и введение леветирацетама, эффективно снижающего интенсивность АП при введении взрослым животным, достоверно снизило интенсивность АП у молодых крыс КМ. По данным однофакторного ANOVA ($F_{1,2} = 4.96$, $p = 0.0013$) эффект введения леветирацетама был достоверным (достоверные отличия от группы с неонатальной БС $p = 0.0041$ и интактной группы, $p = 0.0002$, LSD тест). У всех животных, получавших леветирацетам, при включении звука наблюдалась мощная стартл-реакция, которая по своей интенсивности напоминала начальные фазы АП, но была очень короткой, после чего в некоторых случаях развивался АП. Кроме того, неонатальное введение леветирацетама резко изменило характер мышечных сокращений в судорожной фазе припадка – все судороги происходили в положении на спине. Сходное явление было отмечено у крыс и после неонатального введения кофеина. Подобный феномен описан впервые. Он может быть результатом изменений в распространении возбуждения по нейронным цепям, участвующим в генерации АП.

Неонатальное введение семакса и L-NAME крысам КМ и Вистар изменило интенсивность АП генотип-зависимым образом (Тимошенко и др. 2009а), а введение кетамина и мелатонина привело к видоизменению предрасположенности к АП (Салонин и др., 2004; Савина и др., 2005).

Болевая чувствительность

Методика. Болевой порог оценивали методом “tail flick”, при локальном термическом раздражении средней части хвоста. Каждое животное тестировали 3 раза с интервалом 5–6 мин, регистрируя ЛП отдергивания хвоста (в с).

У мышей линии СВА и DBA неонатальное введение пиретама (а у мышей DBA – и леветирацетама) вызвало у взрослых животных достоверное ($p < 0.05$, LSD тест Фишера) снижение болевых порогов, т.е. повышение болевой чувствительности. В то же время у взрослых мышей СЗН неонатальное введение пиретама, напротив, понизило болевой порог ($p < 0.05$).

У 2 мес. мышей СВА при неонатальном введении семакса болевой порог повысился (отличие от группы с болевой стимуляцией, $p = 0.0492$).

Болевая чувствительность взрослых мышей и крыс контрольных групп, получавших в неонатальном возрасте инъекции растворителя, т.е. испытывавших в течение пяти дней болевую стимуляцию, была изменена, а во многих случаях повышена (см. рис. 1, Бояршинова и др., 2003б; Алексеев и др., 2003б). У мышей нескольких генотипов (СВА, DBA/2J, их гибридов, 101/HY, СЗН, RSB и RLB и др.) неонатальная болевая стимуляция вызвала изменение болевого порога, выраженность которого зависела от пола и генотипа (рис. 1). Двухфакторный ANOVA для данных по первой пробе “tail-flick” показал приближающееся к достоверности влияние фактора “генотип” ($F_{1,4} = 3.8531$, $p = 0.0506$), фактора “воздействие” ($F_{1,4} p = 0.0531$) и достоверное взаимодействие двух факторов ($F_{1,15} = 2.0504$, $p = 0.0125$). Снижение болевых порогов после неонатальной болевой стимуляции было достоверным у взрослых самцов линий DBA, 101/HY и RSB ($p = 0.0351$, $p = 0.0318$ и $p = 0.0424$, соответственно) и недостоверным у взрослых самок этих генотипов, тогда как у всех мышей линии СВА болевые пороги были также снижены, но недостоверно (Бояршинова и др., 2003б).

У крыс неонатальная болевая стимуляция также изменила уровень болевой чувствительности в возрасте 3 мес., причем этот эффект был обнаружен у крыс линии КМ и Вистар, но отсутствовал у WAG/Rij, что, возможно, отражает описанную у них аномалию опиоидной системы (Алексеев и др., 2003б).

Поскольку проблема снижения болевых порогов после болезненных вмешательств в неонатальный период существует и в клинической неонатологии (Fitzgerald, Beggs; 2001, Anand, Bhutta, 2002; Peters et al., 2005; Grunau, 2002), в частности с демонстрацией половых различий (Rasakham, Chen, 2011), демонстрация в эксперименте генетических различий в характере этого эффекта показывает новый и важный в практическом отношении аспект этого феномена.

ТЕСТИРОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ ВЗРОСЛЫХ ЖИВОТНЫХ

Тест “открытое поле”

Методика. Тест проводили в круглой арене диаметром 1 м с высотой стенок 60 см. В полу арены, расчерченном на квадраты (8×8 см для мышей и 16×16 см для крыс), имелись отверстия для выявления заглядываний в них (норковая реакция). В полуавтоматическом режиме регистрировали число пересеченных сторон квадратов, стойки, норковые реакции, реакции замирания, эпизоды груминга и число фекальных болюсов.

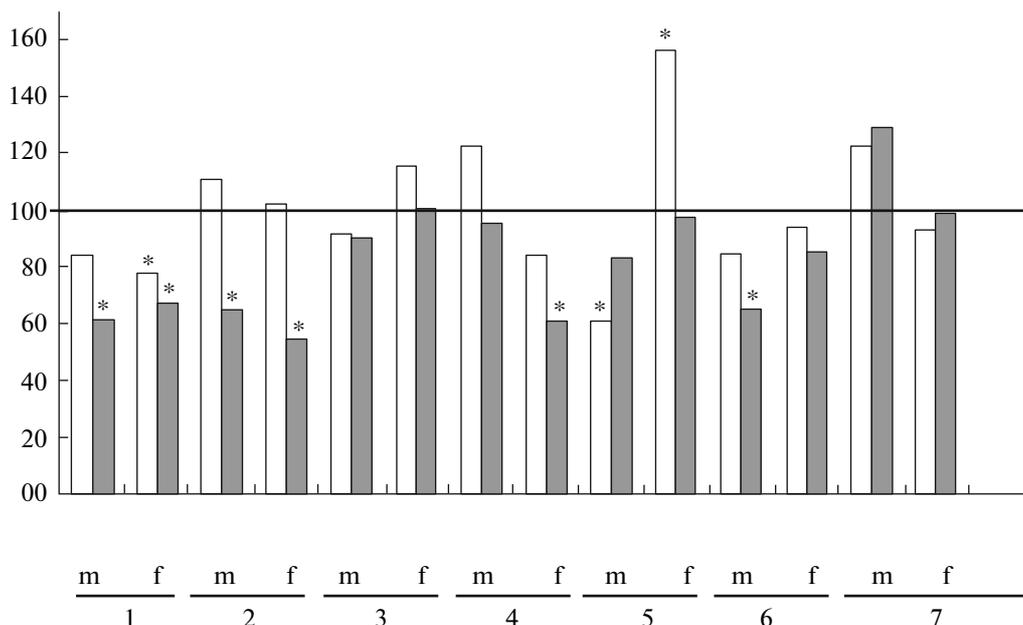


Рис. 1. Отдаленный эффект болевой стимуляции в неонатальный период. Уровень порогов болевой чувствительности 2 мес. самцов и самок мышей линий DBA/2J (1, $n = 70$), CBA/Lac/Sto (2, $n = 74$), гибридов F1 этих линий (3, $n = 56$), 101/HY (4, $n = 85$), C3H/He (5, $n = 48$), RLB и RSB (6, 7, $n = 84$, выведены от единственных самок линий мышей, селективных на малый и большой вес мозга, эмбрионы которых подверглись процедуре пересадки). Болевая чувствительность выражена как доля (в %) от 100% уровня болевой чувствительности интактных контрольных животных. m – самцы, f – самки. * – достоверно отличается от уровня контроля ($p < 0.05$).

Исследования на мышах. Оценка отдаленных эффектов ранних воздействий проводилась в данном тесте в 2 сериях экспериментов (Шилова и др., 2004). Приведем некоторые из полученных результатов. Неонатальное (2–6 дни жизни) введение семакса (7 мкг/мышь) и растворителя мышам линий DBA/2, CBA, и их гибридам, а в другой серии – мышам линий 101/HY и C3H вызывали зависимые

от генотипа изменения поведения у взрослых животных в возрасте 2–3.5 мес.

Были отмечены, в частности, изменения (рост или снижение) числа эпизодов и длительности реакции замирания, эпизодов чистки шерсти (груминга), уровня двигательной активности, а также числа вставаний на задние лапы и “норковых реакций” (см. рис. 2).

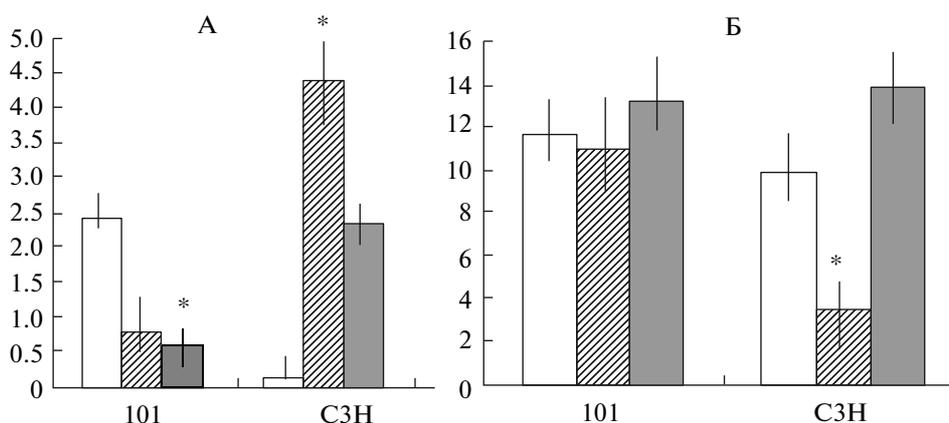


Рис. 2. Отдаленный эффект неонатального введения семакса мышам двух линий. Тест “открытое поле”. А – число эпизодов груминга за 3 мин теста суммарно. Б – число “стоек” за 3 мин теста суммарно. Обозначения: белые столбики – интактные мыши, косая штриховка – неонатальная болевая стимуляция, серые – неонатальное введение семакса. По оси ординат – число элементов поведения.

* – достоверное отличие ($p < 0.05$) от интактной группы.

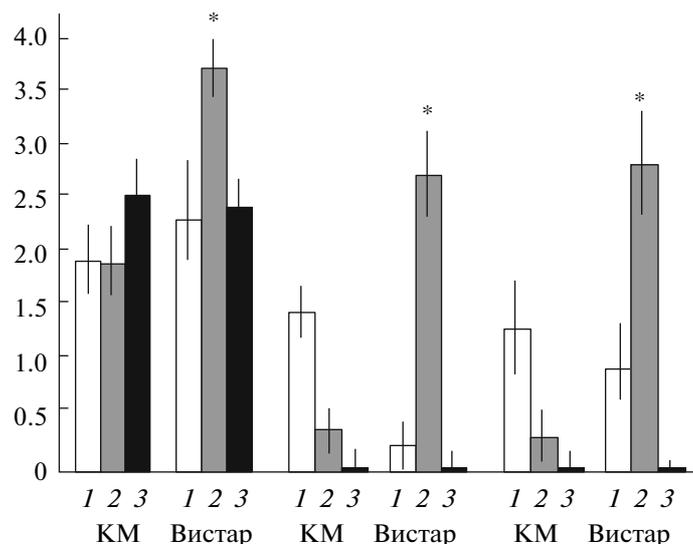


Рис. 3. Отдаленный эффект неонатального введения семакса и L-NAME самцам крысам двух линий. Тест “открытое поле”, двигательная активность крыс двух линий в центре поля за последовательные мин теста. Ось ординат — число квадратов, пересеченных в центре поля. 1 — интактная группа, 2 — введение семакса, 3 — введение L-NAME. * — достоверное отличие от интактной группы при $p < 0.05$.

В ряде случаев изменения числа поведенческих актов, характерных для исследовательского поведения (стойки, норковые реакции и др.) обнаруживались только в группах с неонатальной болевой стимуляцией (контрольного введения растворителя), тогда как между группами интактных мышей и после неонатального семакса достоверные различия нередко отсутствовали. Это позволяет предполагать, что неонатальное введение семакса (т.е. болевая стимуляция + семакс) “возвращало к норме” поведение, которое было бы изменено неонатальной болевой стимуляцией. Достоверных сдвигов поведения в ответ на неонатальные воздействия у мышей линии DBA/2 было больше, чем у CBA и гибридов этих линий, а у СЗН — больше, чем у 101/НУ. Направление этих изменений у мышей разных генотипов в ряде случаев было противоположным. Двигательная активность в центре “поля” изменилась только у мышей линии DBA/2, число заглядываний в отверстия изменилось только у мышей CBA, реакция замирания и чистка шерсти изменились у DBA/2 и СЗН. Известно, что у интактного животного усиление проявлений страха и тревоги сопровождается подавлением проявления инстинктивных движений (фиксированных комплексов действий), направленных на исследование среды. Однако в наших экспериментах при тестировании поведения взрослых животных после неонатальных воздействий иногда обнаруживалось *одновременное* усиление (или ослабление) как поведенческих актов, связанных с тревожностью (груминг), так и с исследовательским поведением (стойки и норковые реакции). Это заставляет предположить, что вмешательство в нормальное развитие ЦНС в не-

натальном периоде может изменить внутримозговые координации — основу врожденных двигательных координаций, нарушив характерные для нормы соотношения (Шилова и др., 2004).

Исследования на крысах. Неонатальное введение семакса и L-NAME (ингибитор NOS) крысам KM и Вистар также изменило целый ряд показателей поведения взрослых крыс в тесте ОП. Эти изменения затронули проявления исследовательского поведения, которые достоверно изменились в противоположном направлении у двух генотипов — снизились у KM и усилились у Вистар. Изменения уровня локомоции в центре арены (как “отрицательный” показатель тревожности) зависели и от генотипа, и от вводимого препарата, и от пола (рис. 3). При этом обнаруживалось также достоверное взаимодействие факторов “генотип” и “воздействие”. Последнее отражало тот факт, что неонатальное введение семакса почти не изменило этот показатель у взрослых крыс KM, но достоверно усилило его у Вистар. Крысы Вистар, в отличие от KM, после неонатального семакса обнаруживали ослабление проявлений страха. Поскольку оба вещества усиливали нейрогенез (см. ниже) у обеих линий, подобные расхождения в эффектах могут, возможно, означать различия в реакции развивающегося мозга крыс двух линий на усиление продукции новых клеток (а возможно и на снижение уровня NO).

Тест приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ)

Методика. Крестообразная платформа лабиринта приподнята над полом на 73 см (у него 2 от-

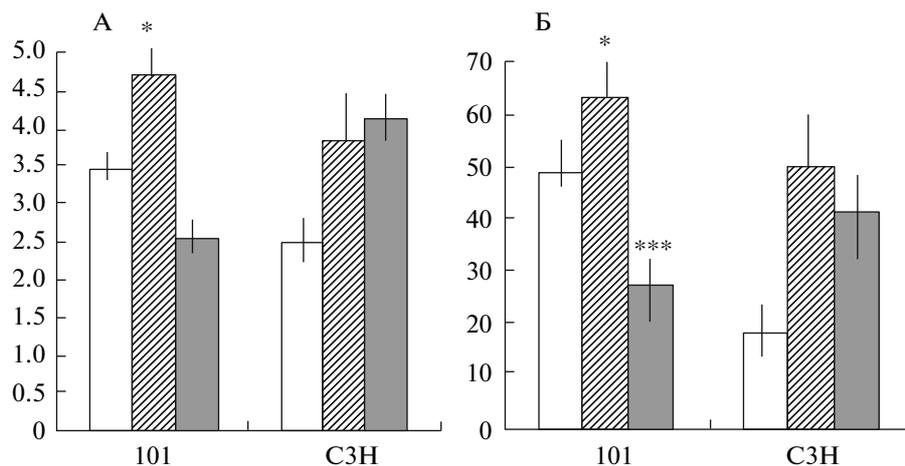


Рис. 4. Отдаленный эффект неонатального введения семакса мышам линий 101/НУ и СЗН. Тест ПКЛ. А — число выходов в светлые рукава лабиринта. Б — время пребывания в открытых рукавах. Белые столбики — интактные животные, штриховка — неонатальная болевая стимуляция, серые — введение семакса *,*** — достоверно отличается от показателей интактной группы, при $p < 0.01$, $p < 0.001$ соответственно.

крытых и 2 закрытых рукава, размер 50×10 см для крыс и 35×7 см для мышей, высота стенок 30 см). Длительность теста 3 мин. Определяли число выходов животного в светлые рукава и время, там проведенное, а также число “свешиваний” с открытых рукавов.

Исследования на мышах. Двухфакторный ANOVA выявил достоверное влияние фактора “воздействие” ($F = 4.41$, $p = 0.038$) на число выходов в открытые лучи лабиринта — один из показателей тревожности. У мышей линий 101/НУ и СЗН, неонатальное болевое раздражение снижало тревожность по этому показателю. Неонатальное введение семакса снижало число выходов в открытые рукава у мышей 101/НУ (т.е. усиливало тревожность), а также уменьшало время, проведенное в открытых рукавах ПКЛ (рис. 4). Этот эффект отсутствовал у мышей СЗН.

Исследования на крысах. Неонатальное введение семакса и L-NAME отчетливо снизили стремление крыс находиться на свету в период теста, и это снижение у крыс КМ было высоко достоверным ($p = 0.0049$ для семакса и $p = 0.0008$ для L-NAME). Время, проведенное в открытых рукавах, было максимальным у крыс интактных групп и достоверно ($p = 0.0164$) выше у линии КМ по сравнению с Вистар. Таким образом, у крыс КМ тревожность после неонатальных воздействий была достоверно выше, чем в контроле, а у Вистар отличия были недостоверными.

Межсамцовая агрессивность в тесте со “стандартным оппонентом”

Методика. Двух самцов 2 мес. возраста (тестируемой группы и “стандартного оппонента” — самца линии A/Sn) помещали одновременно в новую для них пластиковую клетку ($40 \times 25 \times 14$ см) и

наблюдали за их поведением (20 мин). Регистрировали проявления агрессивного поведения, в том числе прямые атаки партнера. Тест проводили ежедневно в течение 5 дней.

Буспирон, агонист 5HT-1A рецепторов, вводили в неонатальный период мышатам двух линий — RLB и RSB (см. выше). Это неонатальное воздействие вызвало у взрослых мышей противоположные по направлению изменения межсамцовой агрессивности. У агрессивных мышей RSB произошло усиление агрессивности, тогда как у низко агрессивных мышей линии RLB агрессивность ослабла. В то же время показано, что введение буспилона взрослым животным снижает их межсамцовую агрессивность (Sanchez, 1993). Уровни моноаминов (дофамина, серотонина и их метаболитов) у интактных мышей линий RLB и RSB были одинаковыми, но в группах после неонатального введения буспилона их величины отклонялись от контроля, причем часто в противоположных направлениях (см. Маркина и др., 2004).

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование возможных изменений морфологических характеристик ЦНС взрослых животных, как следствия неонатальных воздействий, проводилось по двум направлениям.

Исследования изменений количества катехоламинергических нейронов

Иммуногистохимическое окрашивание срезов мозга мышей на тирозин-гидроксилазу позволило обнаружить отдаленные эффекты неонатального введения АКТГ₄₋₁₀ и семакса (рис. 6). Подсчет нейронов, содержащих тирозингидроксилазу в zona inserta дорсального гипоталамуса взрослых мы-

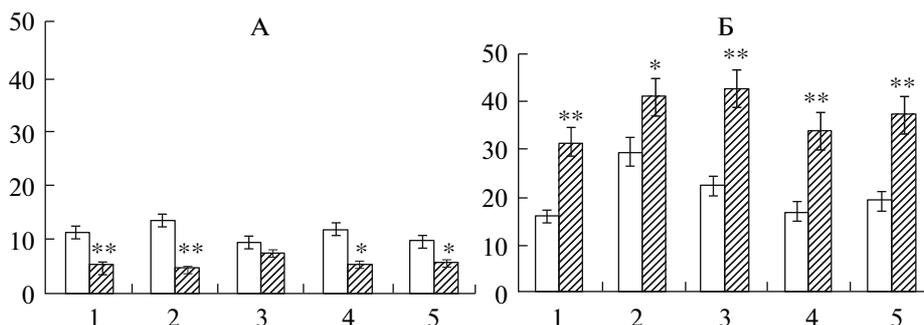


Рис. 5. Отдаленные эффекты неонатального введения буспирона мышам линий RSB и RLB на межсамцовую агрессивность (по оси ординат - число атак, по оси абсцисс - последовательные дни эксперимента) в тесте со стандартным оппонентом (самцы линии А/He). А - линия RLB, Б - линия RSB. Неонатальная болевая стимуляция не изменила показателей агрессивности у обеих линий и данные по двум контрольным группам были суммированы. Белые столбики - интактные мыши и мыши с неонатальной болевой стимуляцией, штрихованные - неонатальное введение буспирона. * - достоверно отличается от показателя контрольной группы при $p < 0.05$.

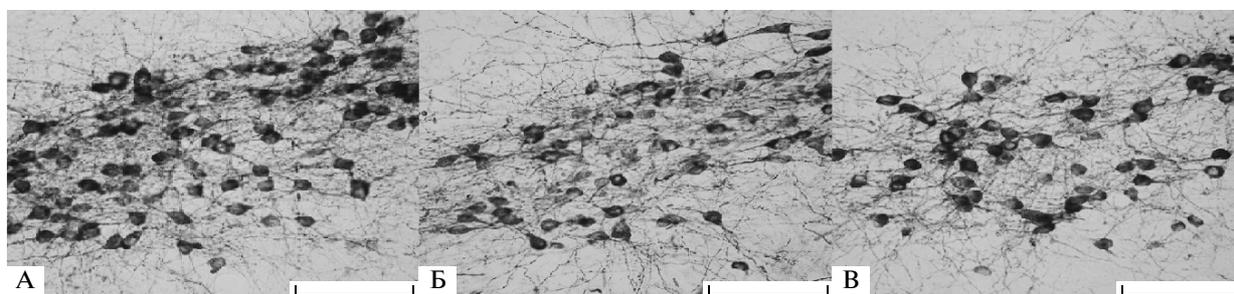


Рис. 6. Микрофотографии zona incerta промежуточного мозга взрослых мышей линии 101/HY: А - неонатальное введение АКТГ₄₋₁₀; Б - контроль; В - неонатальное введение семакса. Масштаб - 1 мм.

шей, проведенный методом оптического диссектора, показал генотип-зависимое увеличение их количества (рис. 7). Неонатальный АКТГ₄₋₁₀ (который вводили только мышам линии 101/HY) увеличил их число, а семакс (у линий 101/HY, СВА и DBA/2J), напротив, достоверно снизил (Бояршинова и др., 2004б). Следует отметить, что указанное влияние неонатального введения пептидов на число нейронов сказывается, по-видимому, лишь на катехоламинергические нейроны, поскольку иммуногистохимическая окраска на триптофангидроксилазу не выявила эффекта неонатальных воздействий - различий между интактными и в числе серотонинергических нейронов ядер шва (данные не приводятся) не было.

Исследования пролиферативной активности в зубчатой фасции гиппокампа

Используя иммуногистохимический метод окрашивания срезов мозга на маркер делящихся клеток Ki67, было показано, что неонатальное введение и семакса, и L-NAME детенышам мышей (линии 101/HY и СЗН) и крыс (КМ и Вистар) приводит к усилению нейрогенеза в пролиферативной зоне зубчатой фасции гиппокампа (рис. 8). На сре-

зах мозга мышей, получавших инъекции семакса, было обнаружено достоверное увеличение числа клеток, иммунопозитивных к Ki67, по сравнению с контрольными животными (табл. 3). В таблице приведены данные по нескольким сериям экспериментов, которые различались сроками введения семакса. За исключением серии 1 перфузия мозга производилась спустя 7-10 дней после окончания инъекций, из чего можно заключить, что стимулирующий деление клеток эффект семакса продолжался и после прекращения его введения. Кроме того, в мозге мышей СЗН (серия 3) оценили экспрессию даблкортина, белка, который экспрессируется в нейробластах. Подсчет клеток (табл. 3) показал, что введение семакса вызвало достоверное увеличение числа нейробластов, из чего следует, что введение семакса усиливает и собственно нейрогенез. Неонатальное введение L-NAME мышам обеих линий также увеличивало число делящихся клеточных элементов в этой зоне мозга, что можно было обнаружить спустя разные сроки после прекращения воздействий (данные не приводятся). Усиление пролиферативной активности в рамках проведенных экспериментов не обнаружило межлинейных различий в своей интенсивности.

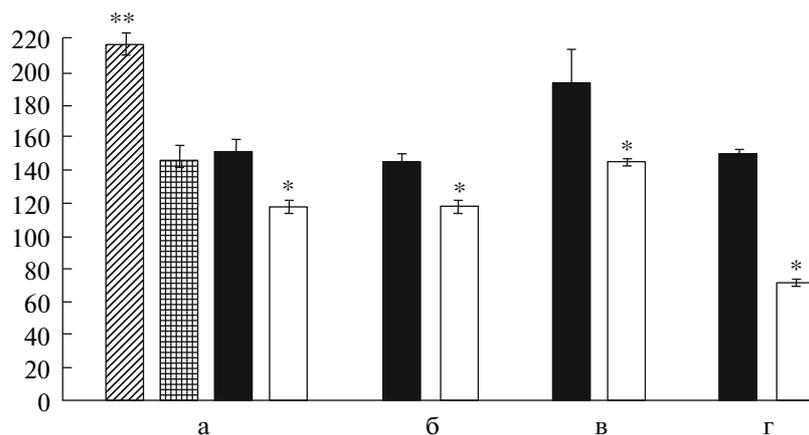


Рис. 7. Средние величины количества клеток, иммунопозитивных к тирозингидроксилазе, в *zona inserta* промежуточного мозга мышей (подсчет методом оптического дисектора). а – 4-мес. мыши линии 101/НУ; б – 3-нед. мыши линии DBA/2; в – 4-мес. мыши DBA/2; г – 4-мес. мыши линии СЗН. Черные столбики – контроль (неонатальные инъекции растворителя); двойная штриховка – контроль (хэндлинг); штриховка – неонатальное введение АКТГ₄₋₁₀; белые столбики – неонатальное введение семакса (см. подпись к рис. 1). *, ** – различия достоверны при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно. По оси ординат – число клеток, содержащих тирозин-гидроксилазу (Бояршинова и др., 2004).

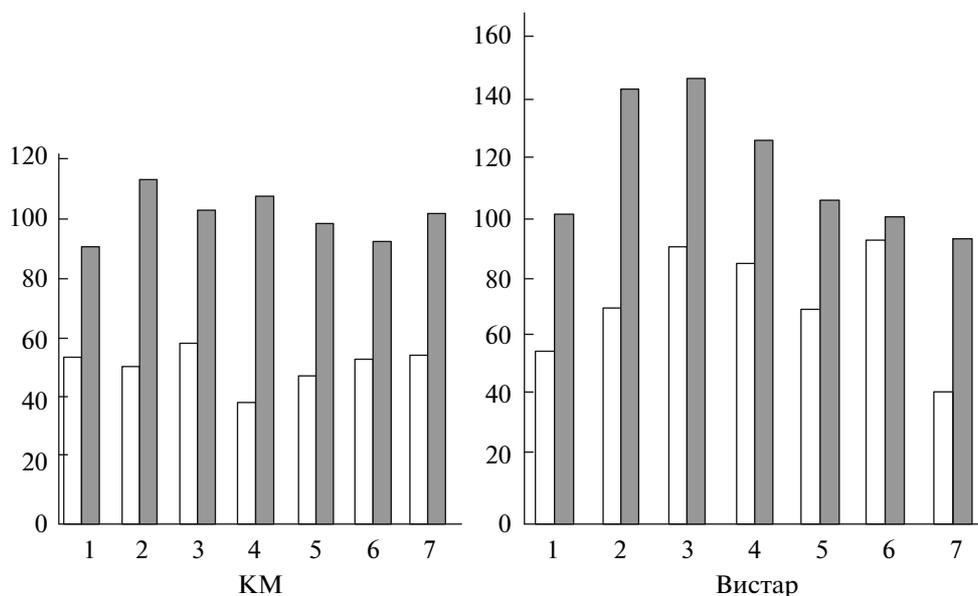


Рис. 8. Число клеток, иммунопозитивных к Ki67, в зубчатой фасции взрослых крыс линии KM и Вистар. Белые столбики – интактные животные, серые – неонатальное введение семакса. По оси ординат – число клеток, по оси абсцисс – данные по отдельным животным.

Введение семакса и L-NAME новорожденным крысам также усилило пролиферативную активность в субгранулярной зоне зубчатой фасции гиппокампа более поздние периоды жизни. Как и в опытах с мышами, у крыс обеих линий число новых клеток в данной области мозга было достоверно больше, чем в контрольной группе (рис. 8). Влияние введения этих препаратов (данные по L-NAME не приводятся) было отмечено и через 2 недели после окончания введения препаратов (Тимошенко и др., 2009б). Если активирующее пролиферацию влияние ингибитора NO-синтазы

было описано и ранее (Peunova et al., 2001), то такой же эффект семакса был получен впервые.

В наших экспериментах не было обнаружено существенных различий в уровне активирующего эффекта неонатального введения семакса на клеточную пролиферацию в зубчатой фасции гиппокампа между крысами линий KM и Вистар и между мышами линий 101/НУ и СЗН. Однако в эффекте увеличения числа катехоламинергических нейронов в *zona incerta* мозга мышей разных линий, также показанном в нашей работе, межлинейные различия были обнаружены.

Таблица 3. Число пролиферирующих клеток в субгранулярной зоне зубчатой фасции гиппокампа мышей линий 101/НУ и СЗН после неонатального введения семакса. Иммуногистохимическая окраска на антитела к Ki67 и на даблкортин (последняя строка), среднее число клеток на срезе по группе

Линия	№ серии, возраст инъекций (дни жизни)	Семакс	Контроль
101/НУ	1. 5 – 10	153.5 ± 13.6*	109.3 ± 2.7
	2. 7 – 11	35.8 ± 1*	26.2 ± 2.1
	3. 7 – 11	53.2 ± 0.5*	38.8 ± 2.8
	4. 11 – 15	30.1 ± 2**	11 ± 1.3
СЗН	1. 5 – 11	135.1 ± 5.4*	116.6 ± 1.6
	2. 7 – 11	47.7 ± 1.6*	32 ± 2.9
	3. 10 – 14	31.3 ± 2.5**	22.9 ± 0.9
	4. 16 – 20	50 ± 0.2*	35.8 ± 1
СЗН (DCX)	3. 10 – 14	36 ± 2.8*	21.8 ± 1.2

* – достоверно отличается от значений контрольной группы при $p < 0.05$; ** – при $p < 0.01$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование физиологических реакций и поведения мышей и крыс разных генотипов после неонатальных воздействий выявило различия как в знаке, так и в степени выраженности изменений, ими вызываемых. Это может означать, что непосредственной причиной изменений функций ЦНС во взрослом возрасте после неонатальных воздействий могут быть сложные по своим механизмам и зависящие от генетических особенностей особи изменения в созревании ЦНС. Подобные эффекты, как упоминалось выше, могут объясняться особенностями режима работы мембранных рецепторов ЦНС в ранние периоды развития (Slotkin, 1998).

Предрасположенность к аудиогенной эпилепсии, как у мышей, так и у крыс, определяется морфо-физиологической организацией нейронных сетей нижнего и верхнего двухолмия, черной субстанции и других структур ствола мозга. В реализации аудиогенного судорожного припадка важная роль принадлежит глутаматергической, ГАМК-ергической, также катехоламинергической систем (Faingold, 1999).

Разное участие пуринаргической системы в цепи процессов, определяющих генез АП (влияние неонатально введенного кофеина) у мышей двух генотипов указывает на возможное участие в них именно пуринаргического звена. Введение кофеина было испытанным методическим приемом усугубления тяжести АП у крыс линии КМ, причем, по предположению Л.В. Крушинского, это усиление связывали не с ослаблением тормозных “резервов” ЦНС, а с усилением процесса возбуждения (Семиохина и др., 2006). Однако это предположение, по-видимому, не может быть справедливым для аудиогенных припадков у мышей. В наших экспериментах неонатальное введение кофе-

ина вызвало отчетливое усиление тяжести припадка только у мышей линии 101/НУ, но мало изменило этот признак у линии DBA, хотя, животные этого генотипа находились на “пике” предрасположенности к аудиогенной эпилепсии. Пуринаргическая система мозга влияет на функционирование глутаматергических структур (Dall’Igna et al., 2003), участвующих в формировании аномальной реакции на звук у грызунов (Sakamoto et al., 2002), и дофаминергических структур, модулирующих аудиогенную эпилепсию (Dassesse et al., 1999). Эффекты агонистов и антагонистов аденозиновых рецепторов на аудиогенные судороги у мышей DBA при непосредственном введении были описаны подробно (Maxson et al., 1977). Так, например, введение ингибитора синтеза глюкокортикоидов – метопирона – предотвращает формирование предрасположенности к аудиогенным судорогам у мышей линии C57BL/, тогда как на мышей DBA данный препарат не влияет. Это свидетельствует о различии в механизмах аудиогенной эпилепсии у мышей разного генотипа.

Аудиогенная эпилепсия, как дискретный патологический признак, наиболее характерна для ЦНС грызунов, возможно, в силу особенностей организации периферического и центрального отделов их слуховой системы (Семиохина и др., 2006). Характерная для этих судорог фаза двигательного возбуждения, является, по всей видимости, проявлением и гипертрофированной реакции бегства в ответ на сильный стимул, так и начавшимся распространением судорожного разряда на нейронные сети, отвечающие за движения бега. Подтверждением такого предположения является отдаленный эффект неонатального введения противосудорожного агента леветирацитама, при котором у крыс в возрасте 1–1.5 мес. аудиогенных судорог в ответ на звук не формируется, однако

стартл-реакция (вздрагивание на акустический стимул) оказывается гипертрофированной.

Было показано (Chen et al., 1976), что аудиогенные судороги, вызванные у взрослых мышей процедурой “прайминга” (воздействию звука в раннем возрасте) оказались чувствительными к действию морфина и налоксона. Это позволило сопоставить особенности АП после неонатальных воздействий с развитием и модуляцией в онтогенезе болевой чувствительности.

Влияние антидепрессантов на поведение мышей, в том числе и на их агрессивность связано с функцией серотонинергической системы (Sanchez et al., 1993; Liang et al., 2003). Зависимые от генотипа эффекты неонатального введения антидепрессанта буспирона на уровень межсамцово́й агрессии у взрослых самцов, показанные в наших экспериментах, могут свидетельствовать о различиях в функции серотонинергической системы у использованных линий, или же о различиях в сроках их формирования.

Объяснение изменений в уровне болевой чувствительности взрослых животных после неонатальной болевой стимуляции и “компенсаторное” ее снижение, если в этом возрасте вводили семакс, следует искать на пути анализа формирования мозгового субстрата болевой чувствительности. Оно происходит с участием ряда нейротрансмиттерных систем, в частности опиоидной и ГАМК-ергической (Koch et al., 2008). Наши эксперименты показали, что проявление таких эффектов может зависеть как от генотипических особенностей, так и от пола, причем половые различия выявлены и у человека (Rasakham, Chen, 2011).

Существуют данные об участии дофаминергических структур таламуса и ствола мозга в модуляции болевой чувствительности (Gao et al., 2011). Они важны для интерпретации результатов, полученных в наших экспериментах, в которых показано, что после неонатального введения АКТГ4-10 уменьшается количество катехоламинергических нейронов в *zona incerta* (Шилова и др. 2000; Бояршинова и др., 2004б), являющемся частью ноцицептивной системы мозга (Murray et al., 2009). Недавно стало известно, что интенсивность постнатального нейрогенеза в области таламуса может модулироваться нейротрофинами (Mooney, Miller, 2011), что в свою очередь может, быть причиной показанного нами изменения числа нейронов в *zona incerta*.

Усиление пролиферативной активности после неонатальных инъекций семакса, показанное в наших исследованиях, может иметь общие причины с модуляцией некоторых реакций в тестах на исследовательское поведение и поведение, связанное со страхом и тревогой, чему имеются подтверждения в литературе (Vozdagi et al., 2008). Одной из таких причин может быть, например, изменения в продукции BDNF, как результата введения семакса (Shadrina et al., 2010).

Можно также полагать, что непосредственной мишенью влияний, вызванных вмешательством в ход развития ЦНС, является активность сигнальных путей в нейронах разной “эргичности” в период активной дифференцировки нейронов (см., напр., Wang et al., 2008). Это утверждение выглядит достаточно общим, однако сам факт модуляции поведения взрослых мышей и крыс как результат неонатальных инъекций биологически активных веществ разных категорий, заставляет предполагать, что ранний постнатальный онтогенез — это стадия развития ЦНС, в течение которой становление связей и эргичности нейронов может быть легко изменено (Crews, 2008).

Поскольку считается, что первая декада постнатального онтогенеза грызунов соответствует уровню развития плода человека на последнем триместре беременности, наши данные могут свидетельствовать о важности проблемы отдаленных последствий неонатальных воздействий для здоровья человека. Опасность воздействий на развивающийся плод человека, связанных, например, с приемом матерью фармакологических препаратов из групп наркотических средств и/или антидепрессантов, обсуждается клиницистами (Slotkin, 1998; Vorhees, 1994). При этом речь идет не о непосредственных токсических эффектах или тератогенности таких агентов. Данный феномен заслуживает особого внимания нейробиологов. Изменения функции ЦНС в период времени, достаточно отдаленный от неонатального, проявляются как отклонения в поведении, в изменениях болевой чувствительности и др. (Porter, 1999; Puchalski, Hummel, 2002).

Таким образом, мы можем утверждать, что неонатальное введение большого ряда биологически активных веществ, а также болевая стимуляция в неонатальный период, могут иметь отдаленные последствия, которые выражаются у взрослых животных в виде изменений физиологических реакций и поведения, а также морфологических характеристик мозга. И если в литературе имеется огромное количество свидетельств наличия подобных отдаленных эффектов, существование генетических особенностей их реализации достаточно подробно проиллюстрировано в нашей работе, начало которой было положено предположением, которое около 20 лет назад сделал Л.И. Корочкин. Механизмы этого феномена и его зависимость от генотипа следует искать на пути молекулярно-генетического анализа онтогенеза мозга.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 01-04-48289а, № 07-04-01287, № 09-04-00481а, 09-04-13868-офи_ц), грантом РГНФ № 06-06-00351а, а также Государственным контрактом П720 Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 год”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеев В.В., Кошелев В.Б., Ковалев Г.И., Полетаева И.И.* Влияние неонатальных воздействий на болевую и аудиогенную чувствительность и на содержание моноаминов в мозге взрослых крыс // *Онтогенез*. 2003а. Т. 34. № 6. С. 464–471.
- Алексеев В.В., Салонин Д.В., Федотова И.Б., Полетаева И.И.* Пороги болевой чувствительности у взрослых крыс трех генотипов после болевой стимуляции в неонатальный период жизни // *Бюлл. exper. биол. мед.* 2003б. Т. 135. № 4. С. 388–389.
- Бландова З.К., Душкин В.А., Малащенко А.М. и др.* Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. М.: Наука, 1983. С. 172.
- Бояришинова О.С., Шилова О.Б., Маркина Н.В. и др.* Генотип-зависимые изменения порогов болевой чувствительности у взрослых мышей после неонатальных воздействий // *Бюлл. exper. биол. мед.* 2004а. Т. 137. № 6. С. 532–535.
- Бояришинова О.С., Ревизиц А.В., Полетаева И.И., Корочкин Л.И.* Неонатальное введение АКТГ4-10 и его аналога Семакса детенышам лабораторной мыши модулирует число катехоламинергических нейронов в промежуточном мозге // *ДАН*. 2004б. Т. 396. С. 181–183.
- Бояришинова О.С., Перепелкина О.В., Маркина Н.В. и др.* Аудиогенная эпилепсия у молодых мышей разных линий после неонатального введения семакса // *Бюлл. exper. биол. мед.* 2008. Т. 145. № 7. С. 94–97.
- Дубынин В.А., Малиновская И.В., Ивлева Ю.А. и др.* Зависимость отставленных поведенческих эффектов бета-казоморфина-7 от возраста и пола детенышей белых крыс // *Бюлл. exper. биол. мед.* 2001. Т. 130. № 11. С. 488–492.
- Корогодина Ю.В., Сьяксте Т.Г.* Мыши линии 101/НУ – возможная модель болезней человека, связанных с хромосомной нестабильностью // *Генетика*. 1981. Т. 17. № 5. С. 915–919.
- Маркина Н.В., Шилова О.Б., Перепелкина О.В. и др.* Неонатальное введение буспилона изменяет межсамцовую агрессивность у взрослых мышей // *ДАН*. 2004. Т. 396. № 2. С. 1–3.
- Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Бизикоева Ф.З. и др.* Неонатальное введение буспилона изменяет межсамцовую агрессивность у взрослых мышей // *Журн. высш. нервн. деят.* 2006. Т. 56. № 4. С. 491–498.
- Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Полетаева И.И.* Отдаленные последствия неонатального введения кофеина и пирарцетама на предрасположенность к аудиогенной эпилепсии у мышей трех генотипов // *Журн. высш. нервн. деят.* 2006. Т. 58. № 3. С. 424–431.
- Полетаева И.И., Лильп И.Г., Ирисова О.А. и др.* Необычный тип локомоции у мышей линии 101/НУ // *Генетика*. 1992. Т. 28. № 12. С. 147–149.
- Полетаева И.И., Шилова О.Б., Корочкин Л.И.* Действие АКТГ₄₋₁₀ на поведение мышей различных инбредных линий // *Онтогенез*. 1996а. Т. 27. № 4. С. 294–299.
- Полетаева И.И., Лильп И.Г., Бизикоева Ф.З. и др.* Аудиогенная эпилепсия у мышей линии 101/НУ в разные периоды онтогенетического развития // *Онтогенез*. 1996б. Т. 27. № 3. С. 222–231.
- Савина Т.А., Федотова И.Б., Семиохина А.Ф. и др.* Отставленные эффекты раннего постнатального введения эпифизарного гормона мелатонина на аудиогенные судороги крыс линии Крушинского-Молодкиной // *Журн. высш. нервн. деят.* 2005. Т. 55. № 1. С. 117–125.
- Салонин Д.В., Перепелкина О.В., Маркина Н.В. и др.* Влияние неонатального введения кетамина на болевую чувствительность и аудиогенные судорожные припадки взрослых крыс // *Журн. высш. нервн. деят.* 2004. Т. 54. № 2. С. 277–282.
- Семиохина А.Ф., Федотова И.Б., Полетаева И.И.* Крысы линии Крушинского-Молодкиной: исследования аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения // *Журн. высш. нервн. деят.* 2006. Т. 56. № 2. С. 249–267.
- Тимошенко Т.В., Перепелкина О.В., Маркина Н.В. и др.* Аудиогенная эпилепсия у крыс разных генотипов после неонатальных воздействий, усиливающих нейрогенез в зубчатой фасции // *Бюлл. exper. биол. мед.* 2009а. Т. 147. № 4. С. 458–461.
- Тимошенко Т.В., Ревизиц А.В., Павлова Г.В. и др.* Влияние неонатального введения нейропептида семакса на пролиферативную активность клеток в зубчатой фасции гиппокампа крыс двух генотипов // *ДАН*. 2009б. Т. 424. С. 78–80.
- Тимошенко Т.В., Перепелкина О.В., Маркина Н.В. и др.* Аудиогенная эпилепсия у крыс разных генотипов после неонатальных воздействий, усиливающих нейрогенез в зубчатой фасции // *Бюлл. exper. биол. мед.* 2009а. Т. 147. № 4. С. 458–461.
- Шилова О.Б., Орлова Е.О., Ковалев Г.И. и др.* Неонатальное введение АКТГ4-10 вызывает зависимые от генотипа изменения уровней мозговых моноаминов, количества катехоламинергических нейронов в зона incerta гипоталамуса и аудиогенной чувствительности у взрослых мышей линий СВА И 101/НУ // *Генетика*. 2000. Т. 36. № 11. С. 1507–1514.
- Шилова О.Б., Маркина Н.В., Перепелкина О.В. и др.* Неонатальные инъекции препарата семакс и физиологического раствора вызывают изменения поведения взрослых мышей разных генотипов в тесте “открытое поле” // *Журн. высш. нервн. деят.* 2004. Т. 54. № 6. С. 785–794.
- Agrawal A.K., Shapiro B.H.* Neonatal phenobarbital imprints overexpression of cytochromes P450 with associated increase in tumorigenesis and reduced life span // *FASEB J*. 2005. V. 19. № 3. P. 470–472.
- Ammassari-Teule M., Fagioli S., Maritati M. et al.* Chronic administration of phosphatidylserine during ontogeny enhances subject-environment interactions and radial maze performance in C57BL/6 mice // *Physiol. Behav.* 1990. V. 47. № 4. P. 755–760.
- Anand K.J., Bhutta A.T.* Vulnerability of the developing brain. Neuronal mechanisms // *Clin. Perinatol.* 2002. V. 29. № 3. P. 357–372.
- Bozdagi O., Rich E., Tronel S., Sadahiro M. et al.* The neurotrophin-inducible gene Vgf regulates hippocampal function and behavior through a BDNF-dependent mechanism // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 39. P. 9857–9869.
- Brown R.W., Perna M.K., Schaefer T.L. et al.* The effects of adulthood nicotine treatment on D2-mediated behavior and neurotrophins of rats neonatally treated with quinpirole // *Synapse*. 2006. V. 59. № 5. P. 253–259.

- Chen C.S., Gates G.R., Reynoldson J.A. Effect of morphine and naloxone on priming-induced audiogenic seizures in BALB/c mice // *Br. J. Pharmacol.* 1976. V. 58. P. 517–520.
- Cohen M.A., Skelton M.R., Schaefer T.L. et al. Learning and memory after neonatal exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in rats: interaction with exposure in adulthood // *Synapse.* 2005. V. 57. P. 148–159.
- Costei A.M., Kozer E., Ho T. et al. Perinatal outcome following third trimester exposure to paroxetine // *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 2002. V. 156. P. 1129–1132.
- Counotte D.S., Spijker S., Van de Burgwal L.H. et al. Long-lasting cognitive deficits resulting from adolescent nicotine exposure in rats // *Neuropsychopharm.* 2009. V. 34. P. 299–306.
- Crews D. Epigenetics and its implications for behavioral neuroendocrinology // *Front Neuroendocrinol.* 2008. V. 29. № 3. P. 344–357.
- Dall'Igna O.P., Da Silva A.L., Dietrich M.O. et al. Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice // *Psychopharmacology.* 2003. V. 166. № 3. P. 258–263.
- D'Amato F.R., Mazzacane E., Capone F. et al. Effects of postnatal manipulation on nociception and morphine sensitivity in adult mice // *Physiol. Behav.* 2001. V. 66. № 4. P. 627–637.
- Dassesse D., Vanderwinden J.M., Goldberg I. et al. Caffeine-mediated induction of c-fos, zif-268 and arc expression through A1 receptors in the striatum: different interactions with the dopaminergic system // *Eur. J. Neurosci.* 1999. V. 11. № 9. P. 3101–3114.
- Faingold C.L. Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat // *Adv. Neurol.* 1999. V. 79. P. 311–321.
- File S.E., Tucker J.C. Prenatal treatment with clomipramine has an anxiolytic profile in the adolescent rat // *Physiol. Behav.* 1983. V. 31. № 1. P. 57–61.
- Fitzgerald M., Beggs S. The neurobiology of pain: developmental aspects // *Neurosci.* 2001. V. 7. № 3. P. 246–257.
- Gao H.-R., Shi T.-F., Yang C.-X. et al. The effect of dopamine on pain-related neurons in the parafascicular nucleus of rats // *J. Neur. Transmis.* 2010. V. 117. № 5. P. 585–591.
- Guillet R. Neonatal caffeine exposure alters seizure susceptibility in rats in an age-related manner // *Brain Res., Dev. Brain Res.* 1995. V. 89. № 1. P. 124–128.
- Grunau R. Early pain in preterm infants. A model of long-term effects // *Clin. Perinatol.* 2002. V. 29. № 3. P. 373–394.
- Henry K.R. Audiogenic seizure susceptibility induced in C57B1/6J mice by prior auditory exposure // *Science* 1967. V. 158. P. 938–940.
- Kaindl A.M., Ikonomidou C. Glutamate antagonists are neurotoxins for the developing brain // *Neurotox. Res.* 2007. V. 11. № 3–4. P. 203–218.
- Koch S.C., Fitzgerald M., Hathway G.J. Midazolam potentiates nociceptive behavior, sensitizes cutaneous reflexes, and is devoid of sedative action in neonatal rats // *Anesth.* 2008. V. 108. № 1. P. 122–129.
- Kuznetsova G.D., Petrova E.V., Coenen A.M. et al. Generalized absence epilepsy and catalepsy in rats // *Physiol. Behav.* 1996. V. 60. № 4. P. 1165–1169.
- Liang J., Wang X., Lu Y. et al. Effects of antidepressants on the exploration, spontaneous motor activity and isolation-induced aggressiveness in mice // *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2003. V. 35. № 1. P. 54–60.
- Loepke A.W., Istaphanous G.K., McAuliffe J.J. et al. The effects of neonatal isoflurane exposure in mice on brain cell viability, adult behavior, learning, and memory // *Intern. Anesth. Res. Soc.* 2009. V. 108. № 1. P. 90–104.
- Maxson S.C., Sze P.Y. Glucocorticoids and development of audiogenic seizure susceptibility in DBA/1B mice // *Behav. Genet.* 1977. V. 7. P. 323–326.
- McGivern R.F., Rose G., Berka C. et al. Neonatal exposure to a high level of ACTH4-10 impairs adult learning performance // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1987. V. 27. № 1. P. 133–142.
- Maguire J., Mody I. GABAAR plasticity during pregnancy: relevance to postpartum depression // *Neuron.* 2008. V. 59. P. 207–213.
- Maple A.M., Perna M.K., Joshua P. et al. Ontogenetic quinpirole treatment produces long-lasting decreases in the expression of Rgs9, but increases Rgs17 in the striatum, nucleus accumbens and frontal cortex // *Eur. J. Neurosci.* 2007. V. 26. № 9. P. 2532–2538.
- Maxson S.C., Sze P.Y. Glucocorticoids and development of audiogenic seizure susceptibility in DBA/1B mice // *Behav. Genet.* 1977. V. 7. № 4. P. 323–326.
- Mehta M., Ahmed Z., Fernando S.S. et al. Plasticity of 5-HT_{1A} receptor-mediated signaling during early postnatal brain development // *J. Neurochem.* 2007. V. 101. № 4. P. 918–928.
- Middaugh L.D., Boggan W.O., Shepherd C.L. Prenatal ethanol effects and dopamine systems of adult C57 male mice // *Neurotoxicol. Teratol.* 1994. V. 16. № 2. P. 207–212.
- Midzyanovskaya I.S., Kuznetsova G.D., Vinogradova L.V. et al. Mixed forms of epilepsy in a subpopulation of WAG/Rij rats // *Epilepsy Behav.* 2004. V. 5. № 5. P. 655–661.
- Mooney S.M., Miller M.W. Role of neurotrophins on postnatal neurogenesis in the thalamus: prenatal exposure to ethanol // *Neurosci.* 2011. Jan 25 [Epub ahead of print].
- Morford L.L., Inman-Wood S.L., Gudelsky G.A. et al. Impaired spatial and sequential learning in rats treated neonatally with D-fenfuramine // *Eur. J. Neurosci.* 2002. V. 16. P. 491–500.
- Mothes H.K., Opitz B., Werner R. et al. Effects of prenatal ethanol exposure and early experience on home-cage and open-field activity in mice // *Neurotoxicol. Teratol.* 1996. V. 18. № 1. P. 59–65.
- Murray P.D., Masri R., Keller A. Abnormal anterior pretectal nucleus activity contributes to central pain syndrome // *J. Neurophysiol.* 2009. V. 102. P. 181–191.
- Noorlander C.W., Ververs F.F.T., Nikkels P.G.J. et al. Modulation of serotonin transporter function during fetal development causes dilated heart cardiomyopathy and lifelong behavioral abnormalities // *PLoS ONE.* 2008. V. 3. № 7. P. e2782.
- Peters J.W., Schouw R., Anand K.J. et al. Does neonatal surgery lead to increased pain sensitivity in later childhood? // *Pain.* 2005. V. 114. № 3. P. 444–454.
- Peunova N., Scheinker V., Cline H. et al. Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in *Xenopus* brain // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 22. P. 8809–8818.
- Pick C.G., Cooperman M., Trombka D. et al. Hippocampal cholinergic alterations and related behavioral deficits after early exposure to ethanol // *Int. J. Dev. Neurosci.* 1993. V. 11. № 3. P. 379–385.

- Porter F.L., Grunau R.E., Anand K.J. Long-term effects of pain in infants // *J. Dev. Behav. Pediatr.* 1999. V. 20. № 4. P. 253–261.
- Puchalski M., Hummel P. The reality of neonatal pain // *Adv. Neon. Care.* 2002. V. 5. P. 233–244.
- Rasakham K., Liu-Chen L.Y. Sex differences in kappa opioid pharmacology // *Life Sci.* 2011. V. 88. № 1–2. P. 2–16.
- Sakamoto T., Mishina M., Niki H. Mutation of NMDA receptor subunit epsilon 1: effects on audiogenic-like seizures induced by electrical stimulation of the inferior colliculus in mice // *Mol. Brain Res.* 2002. V. 102. № 1–2. P. 113–117.
- Sánchez C., Arnt J., Hyttel J. et al. The role of serotonergic mechanisms in inhibition of isolation-induced aggression in male mice // *Psychopharm. (Berl.)* 1993. V. 110. № 1–2. P. 53–59.
- Shadrina M., Kolomin T., Agapova T. et al. Comparison of the temporary dynamics of NGF and BDNF gene expression in rat hippocampus, frontal cortex, and retina under Semax action // *J. Mol. Neurosci.* 2010. V. 41. № 1. P. 30–35.
- Shibuya T., Watanabe Y., Hill H.F. et al. Developmental alterations in maturing rats caused by chronic prenatal and postnatal diazepam treatments // *Jpn. J. Pharmacol.* 1986. V. 40. № 1. P. 21–29.
- Schroeder H., Humbert A.-C., Desor D. et al. Long-term consequences of neonatal exposure to diazepam on cerebral glucose utilization, learning, memory and anxiety // *Brain Res.* 1997. V. 766. № 1–2. P. 142–152.
- Slotkin T.A. Fetal nicotine or cocaine exposure: which one is worse? // *JPET.* 1998. V. 285. № 3. P. 931–945.
- Táira T., Porkka-Heiskanen T., Korpi E.R. Neonatal administration of a GABA-T inhibitor alters central GABAA receptor mechanisms and alcohol drinking in adult rats // *Psychopharm. (Berl.)* 1992. V. 109. № 1–2. P. 191–197.
- Táira T., Uusi-Oukari M., Korpi E.R. Early postnatal treatment with muscimol transiently alters brain GABA-A receptors and open-field behavior in rat // *Eur. J. Pharmacol.* 1993. V. 230. № 3. P. 307–312.
- Tchekalarova J., Kubová H., Mares P. Effects of postnatal caffeine exposure on seizure susceptibility in developing rats // *Brain Res.* 2007. V. 1150. P. 32–39.
- Wang C.Z., Yang S.F., Xia Y. et al. Postnatal phencyclidine administration selectively reduces adult cortical parvalbumin-containing interneurons // *Neuropsychopharm.* 2008. V. 33. P. 2442–2455.
- Williamsa M.T., Blankenmeyer T.L., Schaefera T.L. et al. Long-term effects of neonatal methamphetamine exposure in rats on spatial learning in the Barnes maze and on cliff avoidance, corticosterone release, and neurotoxicity in adulthood // *Dev. Brain Res.* 2003. V. 147. P. 163–175.
- Williamsa M.T., Moran M.S., Vorhees C.V. Behavioral and growth effects induced by low dose methamphetamine administration during the neonatal period in rats // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2004. V. 22. № 5–6. P. 273–283.
- Venerosi A., Calamandrei G., Alleva E. Animal models of anti-HIV drugs exposure during pregnancy: effects on neurobehavioral development // *Prog. Neuropsychopharm. Biol. Psych.* 2002. V. 26. № 4. P. 747–761.
- Venerosi A., Cutuli D., Colonnello V. et al. Neonatal exposure to chlorpyrifos affects maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood // *Neurotoxicol. Teratol.* 2008. V. 30. № 6. P. 468–474.
- Viggedal G., Hagberg B.S., Laegreid L. et al. Mental development in late infancy after prenatal exposure to benzodiazepines—a prospective study // *J. Child Psychol. Psych.* 1993. V. 34. № 3. P. 295–305.
- Vorhees C.V. Developmental neurotoxicity induced by therapeutic and illicit drugs // *Env. Health Persp.* 1994. V. 102. Suppl. 2. P. 145–153.
- Vorhees C.V., Schaefer T.L., Skelton M.R. et al. (+/–) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) dose-dependently impairs spatial learning in the Morris water maze after exposure of rats to different five-day intervals from birth to postnatal day twenty // *Dev. Neurosci.* 2009. V. 31. № 1–2. P. 107–120.

Neonatal Injections of Pharmacological Agents and Their Remote Genotype-Dependent Effects in Mice and Rats

I. I. Poletaeva^a, O. V. Perepelkina^a, O. S. Boyarshinova^a, I. G. Lil'p^a, N. V. Markina^a, T. V. Timoshenko^a, and A. V. Revishchin^b

^a Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

^b Institute for Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova street 34/5, Moscow, 119334 Russia

e-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Abstract—Experimental data were reviewed which demonstrated that the neonatal injection effects of certain biologically active drugs (ACTH_{4–10} fragment and its analogue Semax, piracetam, caffeine, levetiracetam, busperone, etc.) could be detected in adult animals as changes in physiological and behavioral reactions and in several morphological traits as well. Audiogenic seizures proneness, anxiety-fear and exploration behavior as well as pain sensitivity were analyzed. The remote effects discovered were either similar in direction to those applied to an adult organism, or opposite to it. Pharmacological treatments of such type presumably interfere the CNS development during early postnatal ontogeny and change the normal pattern of brain development. These modulatory influences could be due to changes in neurotransmitter system development and are presumably capable to induce CNS morphological deviations (numbers of neurons, adult neurogenesis).

Keywords: ontogeny, neonatal treatment, genotype, audiogenic epilepsy, pain sensitivity, anxiety, exploration behavior, mice, rats.

УДК 591

Н.К. КОЛЬЦОВ И ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭМБРИОЛОГИИ (К 140-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)

© 2012 г. М. А. Помелова

Институт истории естествознания и техники им. С.И. Вавилова Российской академии наук

109012 Москва, Старопанский пер., д. 1/5

E-mail: marialpom@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.06.12 г.

Окончательный вариант получен 03.07.12 г.

Общеизвестно, что большая часть исследований Н.К. Кольцова была посвящена изучению строения клетки методами физической химии и цитогенетики. В то же время Кольцов интересовался развитием различных областей экспериментальной биологии, в частности экспериментальной эмбриологии.

Ключевые слова: биология развития, экспериментальная эмбриология, Н.К. Кольцов, Институт экспериментальной биологии.

Одним из приоритетных направлений современной биологии является биология развития — дисциплина, сформировавшаяся на стыке биохимии, цитологии, генетики, эмбриологии и экспериментальной эмбриологии. Одной из предпосылок, способствовавших синтезу этих ранее обособленных дисциплин, были исследования по экспериментальной биологии, становление которой связано с именем выдающегося биолога XX века Николая Константиновича Кольцова (1872–1940) и организацией Института экспериментальной биологии (ИЭБ).

Период создания ИЭБ — это время расцвета описательной биологии и первых шагов экспериментальной биологии в нашей стране. Н.К. Кольцов в силу уникальной научной интуиции рано осознал значение метода эксперимента для развития биологических наук. Он пропагандировал применение этого метода во всех областях биологии, считая, что данные описательных дисциплин служат фундаментом для экспериментальных исследований. Важное место в биологическом эксперименте Н.К. Кольцов отводил методам физики и химии. По его мнению, для изучения жизненных явлений необходимо использовать весь комплекс физических и химических методов исследования [1]. Н.К. Кольцова беспокоила обособленность областей биологии, он считал, что в активно развивающихся экспериментальных дисциплинах (генетика, цитология, биохимия, физиология развития) оказались сильны тенденции к изоляции, и он вновь делает попытку показать, как важен синтез наук, что именно поэтому он дорожит “органи-

зацией своего Института экспериментальной биологии, где все эти научные течения объединены в единое целое” [2, с. 753].

За сравнительно короткий период времени ИЭБ стал центром, в котором получили развитие различные области биологии. В отчете о деятельности Института за 1924 г. Н.К. Кольцов отмечал: “В августе—сентябре 1924 г. работал на Неаполитанской биологической станции, а также принял участие в Съезде Международной евгенической комиссии и I-м итальянском евгеническом конгрессе в Милане. Мне пришлось неоднократно выступать на съезде, и я сделал большой доклад на итальянском языке о работе ИЭБ по генетике химических наследственных свойств крови. Все мои выступления, как единственного представителя русской науки, нашли на съезде в высшей степени сочувственный прием, и в прессе отмечалось, что перевернули сложившееся у итальянцев ложное представление о современном положении русской науки. В Берлине мною осмотрены родственные учреждения: Далемский Институт Экспериментальной биологии и Генетический Институт Сельскохозяйственной Академии. По личному опыту пришлось убедиться, что наши русские учреждения смело могут выдержать сравнение с лучшими европейскими учреждениями аналогичного типа, и что наша работа представляет для европейских научных Институтов не меньший интерес, чем их достижения для нас” [3].

В ИЭБ начал проводить исследования по механике развития Дмитрий Петрович Филатов (1876–1943) — основатель отечественной школы экспе-

риментальной эмбриологии (механики развития). В 1924 г. Кольцов пригласил Филатова в Институт экспериментальной биологии на должность старшего ассистента. Он возглавил отдел механики развития и руководил им до конца жизни. В первые годы деятельности этого отдела (с 1924 по 1930 г.) Филатов был единственным его сотрудником, в 1930 г. в качестве практикантки в отдел была зачислена Н.А. Мануйлова [4]. В 1933 г. в отдел пришли Г.В. Лопашов, А.А. Малиновский, Л.В. Полежаев, Г.А. Шмидт, студентка Т.А. Детлаф, зачисленная препаратором, аспиранты-ассистенты М.Н. Гостеева и А.М. Щербакова [5, 6].

Основными задачами отдела было изучение детерминации и исследование взаимодействия и свойств следующих пар закладок: нервной системы и хордомезодермы, глаза и хрусталика, слухового пузырька и скелетогенной мезенхимы. Г.В. Лопашов разрабатывал вопросы реактивной способности эктодермы [7, 8]. Также он пытался выяснить, когда и как появляется региональное расчленение осевого зачатка зародыша [9, 10]. Исследованием регенерации позвоночных животных занимался Л.В. Полежаев [11–13]. Г.А. Шмидт исследовал индукционные способности организационного центра зародышей амфибий [14]. Особенности формообразования нервной системы были детально изучены Т.А. Детлаф, защитившей под руководством Д.П. Филатова в 1937 году кандидатскую диссертацию на тему “Развитие нервной системы у Анига в связи с действием организатора” [15]. М.Н. Гостеева определила возраст туловищного эпителия зеленой лягушки, в котором он отвечает образованием линзы на действие глазной чашки, изучила влияние искусственного увеличения закладки глаза на скорость его развития [16] и видовые особенности образования линзы из туловищного эпителия у *Rana esculenta* (прудовая лягушка), *R. ridibunda* (озерная лягушка), *R. temporaria* (травяная лягушка) [17]. А.М. Щербакова исследовала экзогастроуляцию зародышей амфибий. Результаты ее опытов подтвердили данные о том, что формирование нервной системы связано с мезодермой [16].

С 1936 г. в отделе начали работать Б.Л. Астауров, Т.А. Беднякова, М.Н. Гостеева, И.В. Дубенский, а с 1937 г. — А.Г. Лапчинский. Именно с этого времени начала формироваться отечественная школа экспериментальной эмбриологии. “Этому способствовали не только ум, эрудиция и оригинальность мышления Филатова, но и его такт, доброта и скромность. Филатов никогда не стремился приспособить интересы своих сотрудников к своим собственным. Любое насилие было органически чуждо его натуре. Филатов поддерживал всякую новую мысль, даже если эта мысль уводила его в

сторону от его исследований: так, Б.Л. Астауров самостоятельно разработал вопросы, связанные с партеногенезом у тутового шелкопряда; Г.А. Шмидт проводил исследования в области экологической эмбриологии; А.А. Малиновский и А.Г. Лапчинский интересовались проблемой трансплантации органов; Л.В. Полежаев — регенерацией у позвоночных животных. Филатов щедро делился научными темами со своими учениками и даже, если его исследования выполнялись... под его непосредственным руководством, отказывался ставить фамилию под готовой работой”, — отмечал Д.В. Попов [18, с. 115].

Некоторые вопросы экспериментальной эмбриологии были изучены и Н.К. Кольцовым. Его первая печатная работа “Значение хрящевых центров при развитии таза наземных позвоночных” (1894) была посвящена органогенезу. В предисловии к книге [1] Н.К. Кольцов отметил, что этот вопрос он разработал с точки зрения начавшей развиваться и незнакомой ему тогда науки — механики развития. В 1930-х гг. Н.К. Кольцов вновь обратился к эмбриологии в статьях “Генетика и физиология развития” (1934) и “Роль гена в физиологии развития” (1935). В обеих публикациях Н.К. Кольцов рассмотрел индивидуальное развитие как комплексную проблему, исследование которой не должно замыкаться только в рамках экспериментальной эмбриологии, а использовать данные и методы цитологии, генетики и биохимии. Затрагивая, таким образом, вопросы междисциплинарного синтеза, автор отмечал, что физиологии развития (так Н.К. Кольцов называл механику развития) совершенно необходимо выйти из состояния изоляции, как, впрочем, и генетике: “Только объединение этих двух наук между собой, а также с цитологией и биохимией создаст единую науку, которая поможет разрешать общие биологические проблемы” [1, с. 648]. Кольцов полагал, что союз различных методик может помочь понять, каким образом к процессам эмбрионального развития применима и теория эпигенеза, и теория преформации и выяснить причинные связи процессов, происходящих при индивидуальном развитии, в частности, явлений, касающихся формоопределяющих веществ (действие таких веществ аналогично действию организатора) [2].

Детально разбирая процесс развития зародыша с точки зрения физиологии развития и генетики, Н.К. Кольцов предложил в качестве фактора, определяющего его организацию, применить понятие — “электрическое силовое поле”, “ориентированное согласно общему плану строения овцита, но детализирующее и закрепляющее этот план” [1, с. 549]. По его мнению, активированное яйцо представляет собой силовое поле, в различных

точках которого поддерживается определенная разница потенциалов, изменяющаяся в процессе развития. Эти потенциалы могут быть электрическими, капиллярными, диффузными, гравитационными, механическими, температурными и химическими [1, с. 559]. В некоторой степени, эти представления созвучны “организационным полям” Ч.М. Чайльда. Однако Н.К. Кольцов избегал обозначений “организационное поле”, так как в это понятие может быть вложен виталистический смысл, между тем как понятие “силовое поле” он употребляет в чисто физическом смысле, как, например, магнитное поле. По Н.К. Кольцову, в отличие от аналитической теории градиентов Ч.М. Чайльда, теория “силового поля” подчеркивает целостный характер развития яйца как “единого целого”, тогда как “чайльдовские градиенты” — это лишь элементы, из которых складывается “силовое поле” [1, с. 559]. По мере развития яйца “силовое поле” дифференцируется благодаря установлению межклеточных границ, в результате возникают центры с высокой разницей потенциалов: центры второй, третьей и *n*-й степени. При удалении отдельных центров, бластомеров и их групп, “силовое поле” способно восстановиться, но если это почему-либо невозможно, то развитие уклоняется от нормы и приводит к уродливому результату, тем не менее, сохраняющему целостный характер [1, с. 560]. Также Н.К. Кольцов считал, что верхняя губа бластопора, “главный” организатор Г. Шпемана — это “комплекс центров силового поля гастролы”, оказывающий доминирующее влияние на дальнейшее развитие в течение определенного периода [1, с. 560]. Помимо рассмотренных выше факторов в образовании “силового поля” участвуют нервные и гормональные воздействия, обеспечивающие целостность организма высших животных и обладающие определенными градиентами распространения [1].

Рассуждая о детерминации и индукции, Н.К. Кольцов подчеркивал, что судьба каждого бластомера, каждого зародышевого листка и зачатка, каждого органа зависит от двух моментов: от особенностей его химического состава, структуры и от места положения данного зачатка в силовом поле. Пересадка частей развивающегося организма ведет к воздействию нового силового поля на трансплантат [1, с. 583]. Анализируя обширный материал экспериментальной эмбриологии, рассуждая о целостности организма в процессе развития и о факторах, определяющих ее, Н.К. Кольцов пришел к выводу, что физиология развития может быть названа феногенетикой, так как в зависимости от влияния внешней среды при совершенно одинаковых генотипах, фенотипы оказываются резко различными [1].

Направление научных исследований, заданное Н.К. Кольцовым успешно развивалось в дальнейшем его учениками и коллегами. Круг его научных интересов поражает своей широтой, многие идеи опередили время, а результаты работ сохранили актуальность до наших дней. Как справедливо отмечает П.Ф. Рокицкий: “Мы нередко находимся в плену теперешних научных проблем и забываем, что настоящее теснейшими нитями связано с прошлым, что современная биология, в том числе и молекулярная, не родилась на пустом месте, а есть результат сложного развития, при этом часто по спирали, с возвратом к старым проблемам, но на новом уровне. Вот почему вновь и вновь надо обращаться к научному наследию Н.К. Кольцова, его статьям, докладам, в которых рассыпано множество интересных мыслей и идей” [19, с. 31].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Кольцов Н.К.* Организация клетки. М.—Л.: Биомедгиз, 1936. 652 с.
2. *Кольцов Н.К.* Роль гена в физиологии развития // Биологический журнал. Государственное изд-во биологической и медицинской литературы. 1935. Т. 4. № 5. С. 753—774.
3. АРАН. Ф. 570. Оп. 1. Д. 6. Л. 2.
4. АРАН. Ф. 570. Оп. 1. Д. 34. Л. 7.
5. *Детлаф Т.А.* Институт экспериментальной биологии // Онтогенез. 1988. Т. 19. Вып. 1. С. 94—112.
6. *Попов Д.В.* Жизнь Д.П. Филатова // Природа. 1977. № 2. С. 105—115.
7. *Лопашов Г.В.* Превращение презумптивной мезодермы в части мозга у зародышей тритона // Биологический журнал. 1934. Т. 3. № 2. С. 269—277.
8. *Лопашов Г.В.* Возрастные изменения потенциалов изолированной эктодермы гастролы тритона // ДАН СССР. 1935. Т. 9. № 1. С. 53—54.
9. *Лопашов Г.В.* Роль локальных различий обмена в процессах эмбрионального развития амфибий // Успехи современной биологии. 1934. Т. 3. Вып. 6. С. 741—742.
10. *Лопашов Г.В.* Об образовании региональных различий в мезодерме гастролы амфибий // Биологический журнал. 1935. Т. 4. № 3. С. 429—446.
11. *Полежаев Л.В.* О возобновлении регенерационной способности у бесхвостых амфибий // Биологический журнал. 1933а. Т. 2. Вып. 4—5. С. 357—367.
12. *Полежаев Л.В.* О регенерации из боковой поверхности голени тритона // Биологический журнал. 1933б. Т. 2. Вып. 6. С. 557—560.
13. *Полежаев Л.В.* О значении скелета в процессах регенерации органов // Зоологический журнал. 1934. Т. 13. Вып. 4. С. 593—615.
14. *Шмидт Г.А.* О различиях в индуцирующих свойствах организационного центра хвостатых и бесхвостых земноводных // ДАН СССР. 1936. Т. 4. № 9. С. 429—432.

15. *Васецкий С.Г., Гончаров Б.Ф.* Т.А. Детлаф (1912–2006) [некролог] // *Онтогенез*. 2007. Т. 38. № 4. С. 307–309.
16. Работы Института экспериментальной эмбриологии Наркомздрава // *Биологический журнал*. 1934. Т. 3. Вып. 3. № 1. С. 217–232.
17. *Гостеева М.* Видовые особенности образования линзы из туловищного эпителия у *Rana esculenta*, *R. ridibunda*, *R. temporaria* // *Биологический журнал*. 1935. Т. 4. № 3. С. 447–460.
19. *Понов Д.В.* Жизнь Д.П. Филатова // *Природа*. 1977. № 2. С. 105–115.
20. *Рокицкий П.Ф.* Роль Н.К. Кольцова в развитии общей и экспериментальной биологии у нас в стране // *Природа*. 1972. № 7. С. 24–31.

N.K. Kol'tsov and Experimental Embryology (Dedicated to the 140th Anniversary of His Birth)

M. A. Pomelova

*Vavilov Institute of History of Natural Sciences and Technology, Russian Academy of Sciences,
Staropanskii per. 1/5, Moscow, 109012 Russia
e-mail: marialpom@yandex.ru*

Abstract—It is common knowledge that the majority of N.K. Kol'tsov's studies investigated the structure of a cell through the methods of physical chemistry and cytogenetics. At the same time, Kol'tsov was also interested in the development of experimental biology, specifically experimental embryology.

Keywords: developmental biology, experimental embryology, N.K. Kol'tsov, Institute of Developmental Biology.

УДК 611.832:612.822

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ КАЛЬЦИТОНИН ГЕН РОДСТВЕННЫЙ ПЕПТИД В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА АФФЕРЕНТАЦИИ У КРЫСЫ

© 2012 г. В. В. Порсева, А. А. Стрелков, В. В. Шилкин, П. М. Маслоков

ГОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России

150000 Ярославль, ул. Революционная, д. 5

E-mail: vvporseva@mail.ru

Поступила в редакцию 24.06.11 г.

Окончательный вариант получен 02.12.11 г.

Морфологические особенности КГРП-иммунореактивных нейронов изучали в чувствительных узлах блуждающего и грудного спинномозгового нервов у крыс 3-, 10-, 20-, 30-, 60-, 90- и 180-дневных возрастов в условиях химической деафферентации. Результаты показали, что нейроны, содержащие кальцитонин ген родственный пептид выявлялись с момента рождения крысы в обоих узлах, количество которых с возрастом уменьшалось. Большая часть КГРП-иммунореактивных нейронов имела малые размеры (до 600 мкм²). Введение капсаицина изменяло возрастную динамику КГРП-иммунопозитивных нейронов, что проявлялось в уменьшении средней площади сечения клеток и значительном снижении их количества в узле грудного нерва, и в отсутствии выявляемости позитивных нейронов в узле блуждающего нерва.

Ключевые слова: нейрон, каудальный узел, спинномозговой узел, кальцитонин ген родственный пептид, капсаицин, онтогенез, крыса.

Изучение механизмов болевых ощущений ведется в течение многих десятилетий специалистами различного профиля, исследования которых свидетельствуют, что болевая чувствительность обеспечивается несколькими типами ноцицепторов — механо-молчащими, полимодальными, специфическими тепловыми, холодowymi. Перед нейробиологами стоит задача выявления специфичности восприятия болевых ощущений, сущность которых может быть сведена к раскрытию ионных каналов из семейства TRP-каналов (TRP, транзиторийный рецепторный потенциал). Наиболее известными представителями этой группы являются TRPV1 (ваниллоидные), чувствительные к капсаицину, теплу и низкому значению pH.

Установлено, что рецепторы капсаицина локализованы в С-волокнах и их ветвлениях, образованных нейронами чувствительных узлов, сигнализирующих о боли (Piper et al., 2000; Ma, 2002). Активация капсаицин-чувствительных терминалей заключается в повышении проводимости не-селективных катионных каналов (Szolcsanyi, 2004; Bucelli et al., 2008; Спиридонов и др., 2010), что приводит к усилению выделения вещества P (substance P) и кальцитонин ген родственного пептида (calcitonin gene-related peptide).

Настоящее исследование имеет цель выявить возрастные изменения характеристик нейронов, содержащих кальцитонин ген-родственный пеп-

тид в чувствительных узлах блуждающего и спинномозгового нервов на фоне дефицита афферентации, вызванной капсаицином.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 70 белых крысах-самках линии Вистар в возрасте 3, 10, 20, 30, 60, 90 и 180 суток после рождения с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Животные были разделены на две группы: контрольная ($n = 35$), опытная ($n = 35$). В опытной группе на вторые сутки жизни крыс моделировали деафферентацию путем однократного подкожного введения капсаицина (N-vanillylonamide, Sigma) 150 мг/кг в растворе, состоящем из 1 части 96% этилового спирта, 1 части Твин-80, 8 частей 0.9% раствора NaCl. Морфометрические характеристики нейронов, содержащих кальцитонин ген родственный пептид (КГРП) изучали в каудальном узле (нижний узел) блуждающего нерва (КУБН) и в чувствительном узле второго грудного спинномозгового нерва (ЧУГН). Эвтаназию животных осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг, внутривенно) путем транскардиальной перфузии физиологического раствора с гепарином (5 Ед/л), затем 4% раствора параформальдегда на 0.1 М фосфатном буфере. Выделенные узлы фиксировали в течение

Таблица 1. Относительное содержание КГРП-иммунореактивных нейронов в контроле и при химической деафферентации капсаицином ($x \pm s_x$)

Возраст (сутки)	КУБН		ЧУГН	
	контроль	опыт	контроль	опыт
3	20.0 ± 1.42	15.4 ± 1.48**	12.8 ± 0.62	10.5 ± 1.59**
10	14.6 ± 1.34*	—	29.2 ± 1.48*	9.6 ± 0.84**
20	7.3 ± 1.29*	—	27.3 ± 1.75*	7.5 ± 0.17*, **
30	6.4 ± 1.18*	—	27.9 ± 1.63*	8.5 ± 0.31**
60	7.0 ± 1.22*	—	27.6 ± 1.36*	7.2 ± 0.24*, **
90	6.6 ± 1.20*	—	26.3 ± 1.45*	7.6 ± 0.22*, **
180	7.1 ± 1.17*	—	27.2 ± 1.64*	7.4 ± 0.16*, **

* $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с 3-суточным крысенком;

** $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с контрольной группой.

2 часов в предыдущей смеси, после чего промывали трехкратно в физиологическом растворе на фосфатном буфере (PBS) в течение 30 минут и оставляли в 30% растворе сахарозы на 24 часа. Из фиксированного материала на криостате готовили срезы толщиной 20 мкм.

Выявление нейронов, содержащих КГРП, проводили при помощи меченых кроличьих антител Абкам (Abcam, Великобритания, разведение 1:1000), по методике описанной ранее (Masliukov et al., 2004; Маслюков и др., 2009). Вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромом FITC (Jackson, США), дающим зеленую флюоресценцию. Иммуногистохимическую окраску срезов проводили одновременно в контрольной и опытной группах. Для расчета процента иммунореактивных нейронов кроме меток к КГРП, производили мечение всей нейронной популяции при помощи флюорохрома Neuro Trace (Molecular Probes, США) с красной флюоресценцией.

Анализ препаратов проводили на флюоресцентном микроскопе ЛОМО Микмед 2, вариант 12 (Россия, Санкт-Петербург) с соответствующим набором светофильтров и CCD камеры ScoreTec MDC320 (Китай). На цифровых изображениях гистологических препаратов узлов при увеличении $\times 200$ по программе Image J (NIH, США) определяли площадь сечения нервных клеток с помощью квадратно-сетчатой вставки и проводили подсчет клеток на площади квадрата 100 мкм^2 . Долю иммунореактивных нейронов определяли как их отношение к общему числу нейронов, которое принимали за 100%. Для характеристики нейронов узлов по площади сечения использовали 5 размерных классов: до 300 мкм^2 (очень малые), $301\text{--}600 \text{ мкм}^2$ (малые), $601\text{--}900 \text{ мкм}^2$ (средние), $901\text{--}1200 \text{ мкм}^2$ (крупные), $1201\text{--}1500 \text{ мкм}^2$ (очень крупные). Анализу подлежали нервные клетки, срез которых прошел через

ядро с ядрышком, флюоресценция превышала фоновое свечение среза. Статистический анализ включал определение средней арифметической и ее стандартной ошибки. О значимости различий судили по величине t -критерия Стьюдента и считали их достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В контрольной группе животных в обоих чувствительных узлах выявлялись КГРП-иммунореактивные нейроны во всех исследуемых возрастах крысы (рис. 1). При этом большинство КГРП-иммунореактивных нейронов на срезе узлов было представлено клетками малых и средних размеров, выявлялись единичные клетки крупного размера. Вся популяция КГРП-содержащих нейронов имела зеленую флюоресценцию, интенсивность которой менялась с возрастом животного. Так, в 3- и 10-дневных возрастах крысы нейроплазма КГРП-иммунореактивных нейронов обладала ярким изумрудным свечением, в последующих возрастах интенсивность люминесценции уменьшилась до зеленого цвета. По распределению продукта реакции в цитоплазме клетки, всю популяцию КГРП-позитивных нейронов можно разделить на две субпопуляции клеток: меньшую, представленную нейроны малых размеров с диффузной интенсивной флюоресценцией; большую, состоящую из нейронов, в цитоплазме которых флюоресценцией обладали гранулы в виде зернистых включений. Во всех возрастах крыс на срезе обоих узлов отчетливо выявлялись флюоресцирующие волокна.

Подсчет нейронов показал (табл. 1), что количество КГРП-иммунореактивных нейронов в КУБН в 3-дневном возрасте было максимальным. Относительное содержание позитивных нейронов в узле в 10-дневном возрасте снизилось в 1.4 раза и в 20-дневном возрасте — в 2.7 раза по сравнению с 3-дневным возрастом крысы. В по-

Таблица 2. Средняя площадь сечения КГРП-иммунореактивных нейронов в контроле и при химической деафферентации капсаицином ($\bar{x} \pm s_x$, мкм²)

Возраст (сутки)	КУБН		ЧУГН	
	контроль	опыт	контроль	опыт
3	349.2 ± 15.02	320.9 ± 14.67	321.6 ± 12.73	312.7 ± 13.85
10	419.5 ± 14.62*	—	303.8 ± 9.39	287.8 ± 12.20*
20	501.1 ± 43.78*	—	356.4 ± 12.33*	264.7 ± 12.09*
30	657.4 ± 34.15*	—	373.8 ± 18.74*	290.3 ± 12.35* **
60	629.1 ± 15.73*	—	401.2 ± 14.12*	322.5 ± 9.17**
90	623.3 ± 33.97*	—	462.7 ± 23.09*	348.6 ± 22.42**
180	613.3 ± 16.97*	—	534.3 ± 25.98*	591.5 ± 23.37* **

* $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с 3-суточным крысенком;

** $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с контрольной группой.

следующих возрастах до конца наблюдения количество позитивных нейронов значимо не менялось. Количество КГРП-иммунореактивных нейронов в ЧУГН в 3-дневном возрасте было минимальным, в 10-дневном возрасте увеличилось в 2.1 раза по отношению к 3-дневному возрасту, незначительно снизилось в 20-дневном возрасте и оставалось, не меняясь, до шести месяцев жизни.

То., количественный состав популяции КГРП-иммунореактивных нейронов являлся различным для исследуемых чувствительных узлов, но становился стабильным с 20-дневного возраста и сохранялся до 180-дневного возраста крысы.

После введения капсаицина в опытной группе животных выявлялись КГРП-иммунореактивные нейроны только в 3-дневном возрасте крысы в КУБН и во всех исследуемых возрастах крысы в ЧУГН (табл. 1). Возрастная динамика количества КГРП-иммунореактивных нейронов в ЧУГН в опытной группе характеризовалась значимым снижением числа иммунопозитивных нейронов в 20-дневном возрасте по отношению к 3-дневному возрасту. В последующем, до конца исследования, количество КГРП-иммунореактивных нейронов в ЧУГН в опытной группе практически не менялось. Однако существенным являлось выраженное снижение по сравнению с контролем числа КГРП-иммунореактивных нейронов в ЧУГН во всех возрастных группах. Так, после введения капсаицина, в 3-дневном возрасте крысы количество позитивных нейронов в ЧУГН было меньше, чем в контроле в 1.2 раза, а в последующих возрастах — в 3–3.8 раза по сравнению с аналогичными возрастами контрольной группы. В КУБН в 3-дневном возрасте содержание позитивных нейронов в опыте было меньше в 1.3 раза по сравнению с контролем. В последующих возрастах нейроны, содержащие КГРП, в КУБН не выявлены. Характер флюоресценции в условиях опыта не изменился: сохранились клетки, как с гомоген-

ным интенсивным свечением, так и с гранулярностью, сохраняли флюоресценцию и волокна.

То., в условиях проводимой химической деафферентации происходило уменьшение популяции КГРП-иммунореактивных нейронов в 3-дневном возрасте крысы на 23% в КУБН и на 20% в ЧУГН, в последующих возрастах — на 67–73% в ЧУГН и отсутствии позитивных нейронов в КУБН.

В контрольной группе животных средняя площадь сечения КГРП-иммунореактивных нейронов в обоих узлах в течение всего периода наблюдения увеличилась с возрастом крысы в 1.7 раза (табл. 2). В КУБН с 3-дневного возраста средняя площадь сечения позитивных нейронов прогрессивно возрастала и достигла максимальных значений в 30 дневном возрасте крысы, с последующим постепенным снижением к концу наблюдения. В ЧУГН возрастные изменения средней площади сечения позитивных клеток имели иной характер. Так, с 3-дневного возраста показатель снижался и достиг минимальных значений в 10-дневном возрасте, после чего прогрессивно повышался до максимальных значений в 180-дневном возрасте крысы.

Анализ клеточного состава КГРП-иммунореактивных нейронов контрольной группы животных показал, что в КУБН в 3-дневном возрасте позитивные нейроны принадлежали только двум размерным классам: очень малые и малые клетки (табл. 3). В 10- и 20-дневных возрастах в КУБН присутствовали позитивные нейроны уже четырех размерных групп, при этом большую часть популяции составляли нейроны малых размеров. С 30- и до 90-дневного возраста спектр групп расширился до всех пяти классов, популяция КГРП-иммунореактивных нейронов по размерам приобрела максимальную гетерогенность. В этот временной интервал большая часть КГРП-иммунореактивных нейронов приходилась на клетки малых и средних размеров, меньшая часть — на

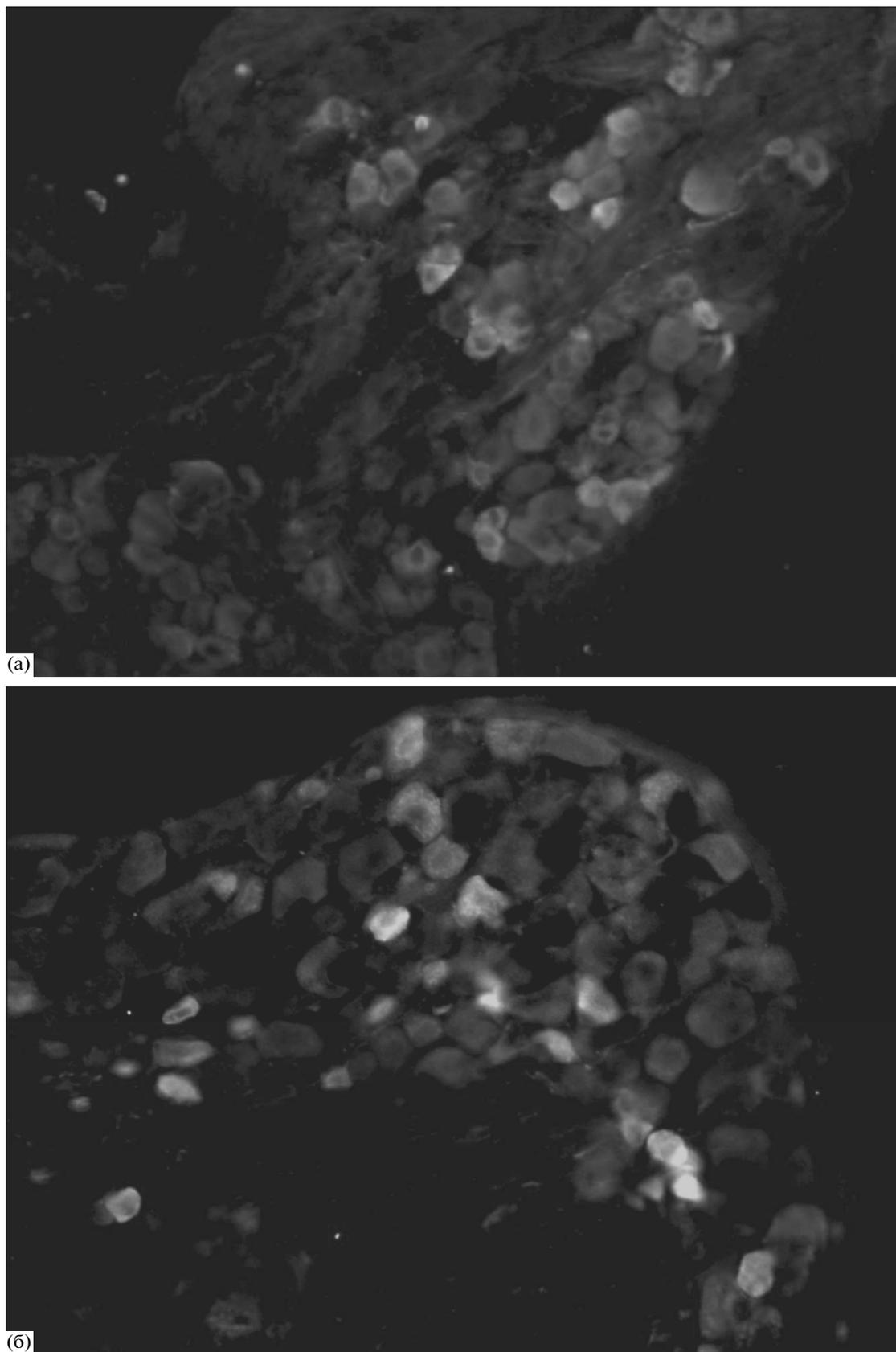


Рис. 1. КГРП-иммунореактивные нейроны каудального узла блуждающего нерва (а, в) и чувствительного узла грудного нерва (б, г) в 10 дневном возрасте крысы: а, б – контроль; в, г – опыт. Об. 20, ок. 7.

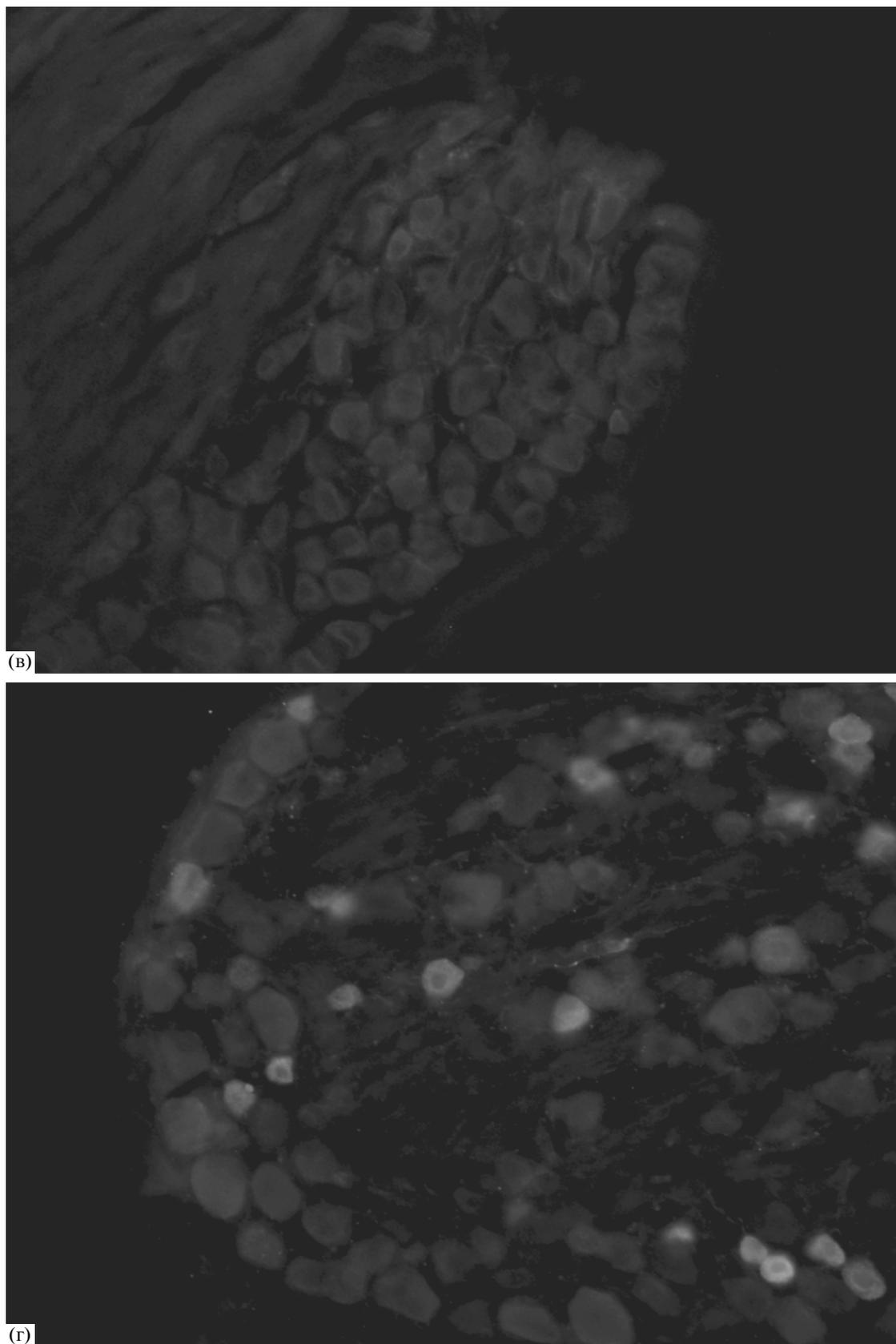


Рис. 1. Продолжение.

Таблица 3. Размерные классы КГРП-иммунореактивных нейронов КУБН в контроле и при химической деафферентации капсаицином

Возраст	Группа	До 300	301–600	601–900	901–1200	Более 1200
Т 3	Контроль	52.8 ± 1.07	47.2 ± 0.93			
	Опыт	55.4 ± 0.86	44.6 ± 0.86			
10	Контроль	17.9 ± 0.89	72.6 ± 1.03	7.4 ± 0.80	2.1 ± 0.58	
	Опыт	–	–	–	–	
20	Контроль	11.5 ± 0.51	57.7 ± 1.07	28.9 ± 0.58	1.9 ± 0.45	
	Опыт	–	–	–	–	
30	Контроль	6.1 ± 0.58	34.7 ± 0.93	44.9 ± 1.07	10.2 ± 0.66	4.1 ± 0.55
	Опыт	–	–	–	–	–
60	Контроль	4.5 ± 0.53	50.0 ± 1.12	35.9 ± 0.95	5.6 ± 0.86	4.0 ± 0.36
	Опыт	–	–	–	–	–
90	Контроль	4.4 ± 0.51	52.1 ± 1.16	34.8 ± 0.80	4.4 ± 0.68	4.3 ± 0.40
	Опыт	–	–	–	–	–
Т 180	Контроль	8.0 ± 0.71	68.0 ± 1.41	16.0 ± 0.55	8.0 ± 0.32	
	Опыт	–	–	–	–	

клетки очень малых и очень крупных размеров. В 180-дневном возрасте крысы в КУБН не выявлялись нейроны очень крупных размеров, более половины КГРП-иммунопозитивных нейронов было представлено клетками малых размеров, меньшую часть составляли клетки средних размеров и одинаково незначительную – клетки, как очень малых, так и крупных размеров. Как видно, увеличение средней площади сечения позитивных нейронов в КУБН к 30-дневному возрасту отражает разнородность этих нейронов по мерным параметрам, которая сохраняется до трех месячного возраста крысы.

В ЧУГН также в 3-дневном возрасте КГРП-иммунореактивные нейроны имели очень малые и малые размеры (табл. 4). В 10-, 20- и 30-дневных возрастах размерное распределение сохранилось: практически вся популяция имела очень малые и малые размеры. Процент нейронов средних размеров нарастал с возрастом крысы. В 60-дневном возрасте добавились крупные нейроны, которых в 90- и 180-дневных возрастах становилось значительно больше. В эти же возраста появились единичные нейроны очень крупных размеров.

Общим в распределении позитивных нейронов по размерным группам в двух, трех и шести месячных возрастах явилось значительное присутствие клеток малых размеров (более 50%). Прогрессивное увеличение средней площади сечения КГРП-иммунореактивных нейронов связано с появлением в этой группе клеток всех пяти размерных классов. Однако большую часть иммунопозитивной популяции во всех возрастных

группах составляли нейроны малых размеров (исключение – 10-дневный возраст).

В опытной группе животных средняя площадь сечения КГРП-иммунореактивных нейронов в 3-дневном возрасте существенно не отличалась от контрольных значений в обоих чувствительных узлах (табл. 2).

В ЧУГН возрастное изменение средней площади сечения позитивных нейронов после введения капсаицина имело иную динамику: с 3-дневного возраста значения показателя постепенно уменьшались, достигая минимума в 30-дневном возрасте, после чего прогрессивно увеличивались, достигая максимума в 180-дневном возрасте.

Анализ средней площади сечения позитивных нейронов ЧУГН в опытной группе показал: в течение трех месяцев жизни крысы средняя площадь сечения нейронов имела меньшие размеры по сравнению с таковыми контрольной группы наблюдения, в 180-дневном возрасте этот показатель в опыте превышал контрольные значения. В целом в условиях дефицита афферентации средняя площадь сечения КГРП-иммунореактивных нейронов в ЧУГН увеличилась в 1.9 раза.

После введения капсаицина анализ клеточного состава показал, что в ЧУГН в 3-, 10-, 20- и 30-дневных возрастах более половины КГРП-иммунореактивных нейронов имели очень малые размеры (табл. 4). В 60- и 90-дневных возрастах в группе позитивных нейронов появилось незначительное количество (менее 10%) клеток средних размеров. В 180-дневном возрасте характер распределения изменился, что проявилось в отсут-

Таблица 4. Размерные классы КГРП-иммунореактивных нейронов ЧУГН в контроле и при химической деафферентации капсаицином

Возраст	Группа	До 300	301–600	601–900	901–1200	Более 1200
3	Контроль	44.8 ± 1.36	55.2 ± 0.71			
	Опыт	53.7 ± 0.93	46.3 ± 0.86			
10	Контроль	58.0 ± 0.86	40.6 ± 1.03	1.4 ± 0.37		
	Опыт	55.5 ± 0.71	44.5 ± 0.71	–		
20	Контроль	44.0 ± 1.08	54.0 ± 0.86	2.0 ± 0.51		
	Опыт	57.7 ± 0.66	42.3 ± 0.75	–		
30	Контроль	40.0 ± 1.02	52.0 ± 0.93	8.0 ± 1.02		
	Опыт	59.2 ± 0.66	40.8 ± 0.81	–		
60	Контроль	30.0 ± 1.03	55.4 ± 0.66	9.3 ± 1.02	5.3 ± 0.66	
	Опыт	52.1 ± 1.17	43.9 ± 0.66	4.0 ± 0.66	–	
90	Контроль	16.5 ± 0.66	57.8 ± 1.23	8.2 ± 1.02	15.3 ± 0.66	2.2 ± 0.51
	Опыт	41.4 ± 1.17	51.0 ± 1.48	7.6 ± 0.63	–	–
180	Контроль	14.7 ± 0.66	61.8 ± 1.17	5.9 ± 0.63	14.7 ± 0.66	2.9 ± 0.63
	Опыт	–	50.0 ± 1.11	37.5 ± 0.95	12.5 ± 0.58	–

ствии в популяции клеток очень малых размеров: большая часть выявленных нервных клеток приходилась на малые и средние нейроны. Как видно, проведенная химическая деафферентация изменила распределение размерных групп в ЧУГН: в отличие от контроля в течение первого месяца постнатальной жизни в популяции отсутствовали нейроны средних размеров, в течение второго и третьего месяцев не встречались нейроны крупных размеров, а в шести месячном возрасте крысы не было как очень малых, так и очень крупных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Результаты проведенного исследования показали, что лишь небольшая часть нейронов каудального узла блуждающего нерва (6.4–20.0%) и чувствительного узла грудного нерва (12.8–29.2%) содержала кальцитонин ген родственный пептид. Тем не менее, с возрастом процент КГРП-иммунореактивных нейронов в КУБН и ЧУГН менялся разнонаправлено. Так, до 20-дневного возраста в КУБН количества КГРП-иммунореактивных нейронов уменьшалось, тогда как в ЧУГН, увеличивалось. Затем их число составило около 10% в КУБН и около 27% в ЧУГН и сохранялось до шести месяцев жизни крысы. Эти цифры близки к исследованиям, полученным на взрослых животных (Poynier et al., 2002; Yasuchika et al., 2005). Общим для обоих узлов явилось то, что с 20-дневного возраста количественный состав популяции КГРП-иммунореактивных нейронов не менялся вплоть до 6 месяца жизни крысы. При этом имму-

нопозитивностью обладала не только нейроплазма, но и волокна нейронов, что совпадает с данными других исследований (Xu et al., 2005; Price et al., 2007). Популяция КГРП-иммунореактивных нейронов являлась гетерогенной по размерным характеристикам и содержала у взрослых крыс клетки всех размерных классов (от очень малых до очень крупных), однако большая часть этой популяции (более 50%) приходилась на клетки малых размеров, что являлось характерным для обоих узлов (Poynier et al., 2002; Xu et al., 2005; Price et al., 2007). При этом нейроны КУБН имели большую площадь сечения, чем нейроны ЧУГН, что согласуется с данными о нейронном составе узлов (Yasuchika et al., 2005; Bucelli et al., 2008).

Анализ ряда исследований показал, что после введения капсаицина в чувствительных узлах происходит массовая гибель нейроцитов независимо от их размеров (Torsney et al., 2000), либо погибает только популяция нейроцитов мелких размеров, которые являются чувствительными к капсаицину (Piper et al., 2000; Ma, 2002). Проведенное исследование показало, что после химической деафферентации капсаицином в каудальном узле блуждающего нерва КГРП-иммунореактивные нейроны не выявлены, а в чувствительном узле грудного спинномозгового нерва уменьшилась доля популяции нейронов уже в 3-дневном возрасте крысы на 20%, а в последующих возрастах – на 70%. При этом в сохранившихся позитивных нейронах преобладала гранулярность в нейроплазме. Популяция выявляемых при капсаициновой деафферентации КГРП-им-

мунореактивных нейронов по размерным параметрам являлась более однородной: большая часть этих нейронов до двух месячного возраста была представлена клетками очень малых размеров, а в трех и шести месячном возрасте — клетками малых размеров, т.е. средняя площадь сечения нейронов после введения капсаицина была ниже контрольных значений.

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют, что КГРП-иммунореактивные нейроны каудального и спинномозгового узлов обладают различными функциональными свойствами и в частности чувствительностью к капсаицину. Полученные данные расширяют представления о ноцицептивных механизмах и, в частности, о возрастных изменениях систем восприятия и проведения боли.

Работа поддержана грантами президента РФ для поддержки молодых ученых; ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009–2013 годы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Маслюков П.М., Корзина М.Б., Емануйлов А.И. и др.* Нейромедиаторный состав нейронов краниального шейного и чревного симпатических узлов в постнатальном онтогенезе // Журн. Морфология. 2009. Т. 135. № 1. С. 30–34.
- Спиридонов В.К., Толочко З.С.* Капсаицин-чувствительные нервы и кислительный стресс // Журн. Бюллетень СО РАМН. 2010. Т. 30. № 4. С. 76–81.
- Bucelli R.C., Gonsiorek E.A., Kim Woo-Yang et al.* Statins decrease expression of the proinflammatory neuropeptides calcitonin gene-related peptide and substance P in sensory neurons // The J. of Pharmacol and Experim Therap. 2008. V. 324. № 3. P. 1172–1180.
- Ma Q.P.* Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats // J. Neurosci. Lett. 2002. V. 319. P. 87–90.
- Masliukov P.M., Timmermans J.-P.* Immunocytochemical properties of stellate ganglion neurons during early postnatal development // J. Histochem. Cell Biol. 2004. V. 122. P. 201–209.
- Piper A.S., Docherty R.J.* One-way cross-desensitization between P2X purinoceptors and vanilloid receptors in adult rat dorsal root ganglion neurons // J. Physiol. 2000. V. 15. № 523. P. 685–696.
- Price T.J., Flores C.M.* Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse // The J. of Pain. 2007. V. 8. № 3. P. 263–272.
- Poyner D.R., Sexton P.M., Marshall I. et al.* The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors // J. Pharmacol Rev. 2002. V. 54. № 2. P. 233–246.
- Szolcsanyi J.* Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology // J. Neuropeptides. 2004. V. 38. № 6. P. 377–384.
- Torsney C., Meredith-Middleton J., Fitzgerald M.* Neonatal capsaicin treatment prevents the normal postnatal withdrawal of A fibres from lamina II without affecting fos responses to innocuous peripheral stimulation // J. Brain Res. Dev. Brain Res. 2000. V. 11. № 121(1). P. 55–65.
- Xu P., Slambrouck C.V., Berti-Mattera L. et al.* Activin induces Tactile allodynia and increases calcitonin gene-related peptide after peripheral inflammation // The J. of Neurosci. 2005. V. 25. P. 9227–9235.
- Yasuchika A., Seiji O., Kazuhisa T. et al.* Expression and co-expression of VR1, CGRP, and IB4-binding glycoprotein in dorsal root ganglion neurons in rats: differences between the disc afferents and the cutaneous afferents // J. Spine. 2005. V. 30. № 13. P. 1496–1500.

Age-Related Changes in Sensory Neurons Containing Calcitonin Gene-Related Peptide under Conditions of Afferentation Deficit in Rats

V. V. Porseva, A. A. Strelkov, V. V. Shilkin, and P. M. Maslyukov

*Yaroslavl State Medical Academy, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation,
ul. Revolyutsionnaya 5, Yaroslavl, 150000 Russia*

e-mail: vvporseva@mail.ru

Abstract—Morphological features of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive neurons were studied in the sensory ganglia of the vagus and thoracic nerves in 3-, 10-, 20-, 30-, 60-, 90-, and 120-day-old rats under conditions of chemically-induced deafferentation. We found that, in rats, CGRP-containing neurons appeared in both ganglia immediately after they were born and their number decreased with aging. Most of CGRP-immunoreactive neurons were small in size, i.e., up to 600 μm^2 . Administration of capsaicin modified age-related changes in the number of CGRP-immunopositive neurons. In the thoracic nerve ganglion, the mean square of these cells and their number substantially decreased, whereas, in the vagus nerve ganglion, positive cells were not observed.

Keywords: neuron, caudal ganglion, dorsal root ganglion, calcitonin gene-related peptide, capsaicin, ontogeny, rat.

УДК 581.1

ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСПОРТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТОННЫХ НАСОСОВ КЛЕТОК КОЛЕОПТИЛЕЙ НА РАННИХ ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

© 2012 г. М. Ф. Шишова*, О. В. Танкелюн*, Е. Л. Рудашевская, В. В. Емельянов, Н. В. Шахова, А. А. Кирпичникова

Санкт-Петербургский государственный университет,
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9
E-mail: mshishova@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.11 г.
Окончательный вариант получен 01.04.12 г.

Проведен сравнительный анализ транспортной активности протонных насосов (H^+ -АТФазы плазмалеммы, H^+ -АТФазы вакуолярного типа и H^+ -пирофосфатазы вакуолярного типа) в мембранных препаратах из клеток колеоптилей этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays* L.). Показано, что начальные этапы развития колеоптиля при инициации роста растяжением характеризуются наиболее высокой активностью вакуолярной пирофосфатазы. В процессе дальнейшего роста все больший вклад в транспорт ионов водорода вносят АТФазные насосы как тонопласта, так и плазмалеммы с преобладающей активностью последней. При остановке роста активность протонных помп значительно снижается. Тем не менее, их субстратная специфичность и чувствительность к ингибиторам не изменяются, что может свидетельствовать о сохранении физиологического значения насосов в поддержании гомеостаза клетки.

Ключевые слова: *Zea mays*, колеоптиль, H^+ -АТФазы Р-типа и V-типа, H^+ -пирофосфатаза V-типа, транспорт протонов, везикулы.

ВВЕДЕНИЕ

Универсальным свойством живых клеток является активное поддержание внутриклеточного гомеостаза, в первую очередь постоянного уровня рН цитозоля. Тем не менее, как показывают многочисленные исследования, концентрация протонов в цитоплазме не является величиной строго постоянной. Изменение внутриклеточного рН может служить признаком перехода клеток к новой стадии онтогенеза, что свойственно как для животных, так и для растительных клеток (Busa, Niccители, 1984; Aerts et al., 1985; Галкина и др., 1991). Примером могут служить изменения рН цитозоля растительных клеток при поляризации яйцеклеток водорослей (Gibbon, Kropf, 1993), а также при завершении клеточного цикла, при переходе клетки к программируемой клеточной смерти (Drew et al., 2000). Кратковременные и пролонгированные (в ряде случаев осцилляцион-

ного характера) изменения рН возникают и в результате действия широкого спектра внешних и внутренних факторов. Резкие сдвиги рН цитозоля регистрируются при изменении состава и интенсивности освещенности (Felle, Bertl, 1986), снижении уровня кислорода (Felle, 2005), при недостатке воды (Wilkinson, 1999) и действия патогенов (Mathieu et al., 1996). Кроме того, способностью индуцировать изменения рН обладают фитогормоны. Так, закисление цитозоля регистрируется при действии ауксина (Felle, 1988; Shishova, Lindberg, 1999), а защелачивание при обработке абсцизовой кислотой (Gering et al., 1990; Blatt, Armstrong, 1993). Участие протонов в развитии широкого спектра физиологических реакций позволяет рассматривать их в качестве компонентов протонной сигнальной системы (Полевой, 1986; Felle, 2001; Тарчевский, 2002), использующей ионы водорода в качестве вторичных посредников.

Хорошо известно, что ионы H^+ выполняют в живой клетке важную регуляторную функцию. Изменение рН водных растворов приводит к изменению соотношения протонированных и непротонированных кислотных и основных групп биологически активных молекул, а, следовательно, модифицирует такие их свойства, как, например, поверхностный заряд, сродство к лиганду и т.д. Даже кратковременные сдвиги концентрации ионов H^+ в цитозоле могут привести к изме-

* Авторы внесли равноценный вклад в данную работу.
Сокращения: АО – акридиновый оранжевый, DCCD – дициклогексил карбодимид, FCCP – карбонилцианид 4-(трифлуорометокси)фенилгидразон, FITC – флуоресцеин изо-тио-цианат.

Адрес для корреспонденции: Мария Федоровна Шишова. 199034 Санкт-Петербург. Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербургский государственный университет, биолого-почвенный факультет, кафедра физиологии и биохимии растений. Факс: 007 (812) 328-44-32; e-mail: mshishova@mail.ru.

нению активности целого ряда ферментов (в связи с различиями в рН-оптимумах, изменения сродства к субстрату, связывания с регуляторными белками, в первую очередь на уровне белок-белковых взаимодействий, и т.д.). Кроме того, протон-зависимые сигнальные каскады могут быть тесно сопряжены с другой важнейшей сигнальной системой – кальциевой, так как связывание Ca^{2+} с регуляторными белками (такими как, кальмодулин) зависит от концентрации свободных протонов.

Возвращение системы к первоначальному состоянию может осуществляться с помощью различных механизмов, включающих ряд метаболических реакций, потребляющих или продуцирующих протоны, а также процессов трансмембранного транспорта ионов H^+ между цитоплазмой, внутриклеточными компартментами и апопластом. Активную транслокацию протонов в растительных клетках обеспечивают такие H^+ -насосы, как H^+ -АТФазы плазмалеммы и тонопласта, а также H^+ -пирофосфатаза вакуолярного типа.

H^+ -АТФаза плазмалеммы, характерная для клеток растений и грибов, относится к АТФазам Р-типа, т.е. фосфорилируется при катализе реакции расщепления АТФ, (ЕС 3.6.3.6.), является Mg^{2+} -зависимой и K^+ -стимулируемой, играет важную биоэнергетическую и регуляторную роль в физиологии клеток (Полевой, 1986; Gaxiola et al., 2007). За счет энергии гидролиза АТФ фермент переносит протоны из цитоплазмы через плазматическую мембрану клетки, создавая электрохимический градиент протонов, который необходим для поддержания живого состояния клетки в целом, так как обеспечивает движущую силу для вторичного транспорта веществ через плазмалемму. H^+ -АТФаза участвует в развитии ответных реакций клеток на различные воздействия внешней и внутренней среды, такие как свет, грибные токсины, регуляторы роста (Serrano, 1989; Palmgren, 1991). Одним из важных физиологических процессов, в которых принимает участие H^+ -АТФаза плазмалеммы, является активируемый ауксином специфичный для растительных клеток рост растяжением (Rayle, 1973; Полевой, 1986; Nager, 2003). Активность H^+ -АТФазы одновременно создает условия для двух процессов необходимых для роста клеток: поступления осмотических веществ в клетку и, следовательно, увеличения ее объема, а также увеличения растяжимости клеточной стенки (Serrano, 1993).

H^+ -АТРаза вакуолярного типа (V-типа; ЕС 3.6.1.3) – широко распространенный у эукариотических клеток протонный насос внутриклеточных мембран. Она организована как мультисубъединичный комплекс, образованный надмембранным каталитическим и трансмембранным H^+ -проводящим доменами общей молеку-

лярной массой около 750 кДа (Merzendorfer et al., 1997; Ratajczak, 2000). По строению V-АТФаза эволюционно родственна АТФ-синтазам F-типа (Gruber et al., 2001; Kluge et al., 2003), но присутствует в мембранах, ограничивающих различные внутриклеточные компартменты с более кислым, чем цитоплазма содержанием. В клетках растений основным местом локализации V-АТРаза является вакуолярная мембрана. Кислые значения рН содер-жимого литических вакуолей и секреторных везикул, поддерживаемые H^+ -АТФазами, требуются для активности гидролитических ферментов. Экспериментально установлено участие V-АТФаз в процессах эндо- и экзоцитоза (Dettmer et al., 2006; Schumacher, 2006). Исследования последних лет показали, что V-АТФаза играет важную роль в регуляции эмбрионального развития и роста растяжением (Strompen et al., 2005).

H^+ -пирофосфатаза вакуолярного типа (ЕС 3.6.1.1.) обнаружена в клетках высших растений, некоторых зеленых водорослей и одноклеточных паразитических организмов, родственной ей формой считают обратимую пирофосфат-синтазу несерных пурпурных бактерий (Rea, Poole, 1993; Maeshima, 2000). кДНК V-пирофосфатазы, клонированные из ряда растений, бактерий и некоторых протист обладали очень высокой степенью гомологии (86–91%) (Lin et al., 2005; Van et al., 2005). Она представляет собой гомодимерный белок, с молекулярной массой субъединицы 75–81 кДа и 14 трансмембранными доменами. H^+ -пирофосфатаза V-типа локализована в вакуолярной мембране, в мембранах аппарата Гольджи, у некоторых объектов – в плазматической мембране (Baltscheffsky et al., 1999). Установлено, что помимо регуляции рН вакуоли, она играет важную роль в регуляции интенсивности везикулярного транспорта, и тем самым оказывает влияние на количество ряда физиологически значимых белков, таких как H^+ -АТФаза и переносчики ауксина PIN1 на плазмалемме (Li et al., 2005).

Таким образом, все рассмотренные протонные насосы играют огромную роль в обеспечении жизнедеятельности растительной клетки, а также в ее способности воспринять сигнал и сформировать адаптивный физиологический ответ. Не вызывает сомнения, что они служат наиважнейшим звеном такого процесса, как рост растяжением, заключающегося в многократном увеличении размеров клетки и ее вакуолизации. Тем не менее, остается дискуссионным вопрос о вкладе каждого из трех протонных насосов в этот процесс и о возможном перераспределении их ролей в ходе развития. Проведенное ранее исследование свойств H^+ -АТФазы плазмалеммы выявило изменение гидролитической активности фермента в ходе онтогенеза клетки (Рудашевская и др., 2005, 2009). В связи с этим цель настоящего исследования заключалась в сравнительном анализе протон-

транспортирующей активности H^+ -АТФазы плазмалеммы, а также протонных насосов тонопласта в процессе роста растяжением.

В качестве модельного объекта в исследовании роста клеток растяжением часто используют колеоптили злаков, которые представляют собой быстро развивающиеся органы ювенильного проростка: за несколько суток они проходят период быстрого роста и переход к завершению своей физиологической функции. У кукурузы при выращивании проростков при 26–27°C в темноте все клетки колеоптиля переходят от деления к росту растяжением на третьи сутки развития проростка (Москалева, Полевой, 1987). К пятым суткам, когда настоящий лист выходит наружу из-под защиты колеоптиля, происходит значительное снижение активности роста клеток колеоптиля и снижается чувствительность ростовой реакции к ауксину (Рудашевская и др., 2002). В настоящем исследовании нами оценивалось изменение транспортной активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны, а также H^+ -АТразы и H^+ -пирофосфатазы эндомембран из колеоптилей 3-, 4- и 5-суточных проростков кукурузы, клетки которых находятся на разных стадиях роста растяжением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 3-, 4- и 5-суточные проростки кукурузы (*Zea mays* L.), выращенные в темноте (с кратковременной засветкой не более 5 мин в сутки для синхронизации роста колеоптилей) при 27°C на разбавленном в 10 раз питательном растворе Чеснокова. Проростки гибрида ЗПТК-196 и Нарт-150 имели синхронное развитие, характеризующиеся средней длиной колеоптилей 24.0 ± 1.5 мм, 44.9 ± 2.4 мм, 51.3 ± 3.7 мм для 3-, 4- и 5-суточных проростков соответственно.

Для выделения фракции плазмалеммы использовали декапитуированные на 4 мм колеоптили проростков кукурузы (гибрид ЗПТК-196). Везикулярную фракцию плазмалеммы получали дифференциальным центрифугированием с очисткой в градиенте плотности сахарозы, как описано ранее (Рудашевская и др., 2005). По данным биохимического анализа маркерных ферментов, полученная фракция обогащена плазмалеммой. Везикулы загружали с использованием осмотического шока (при 10-кратном понижении концентрации сахарозы) средой следующего состава: 150 мМ K_2SO_4 , 1 мМ Трис-MES, 150 мМ сахарозы, pH 6.8–7.0 (в зависимости от величины pH везикулярной фракции), и пересаждали при 99500 g 1 ч. При необходимости введения флуоресцентного зонда в везикулы их загружали средой того же состава с добавлением pH-зависимого

зонда FITC-декстран (остаток декстрана обеспечивал внутривезикулярную локализацию зонда).

АТФ-зависимый транспорт протонов через мембрану везикул плазмалеммы оценивали с использованием флуоресцентных зондов diS-C₃-(5) (0.7 мкМ) (по изменению трансмембранного потенциала) и FITC-декстран (0.8 мг/мл) (по изменению pH внутри везикулярной среды), на спектрофлуориметре при длине волны возб./фл. 580/665 нм и 480/520 нм соответственно. Объем инкубационной смеси 300 мкл. Везикулы (1–5 мкг белка) инкубировали в среде – 150 мМ Na_2SO_4 , 1 мМ Трис-MES, 150 мМ сахарозы, pH 6.8–7.0 (в зависимости от величины pH везикулярной фракции во избежание исходного градиента pH на мембранах везикул). Реакцию запускали введением $MgCl_2 + Na_2ATP$ в конечной концентрации 3 мМ. Активность транспорта протонов через мембрану везикул в случае использования потенциал-зависимого зонда diS-C₃-(5) выражали в % от величины трансмембранного потенциала, генерируемого в данной системе при внесении K^+ -ионофора валиномицина (0.03 мкМ), и рассчитывали на единицу белка фракции мембран. Валиномицин-зависимое изменение флуоресценции зонда нами рассматривалось в качестве калибровочного стандарта. Расчеты показывают, что в используемой нами модельной системе добавление K^+ -каналоформера приводит к генерации K^+ диффузионного потенциала, равного по величине –110 мВ (Батов и др., 1995). Интенсивность тушения зонда при внесении валиномицина несколько варьирует, отражая свойства мембранного препарата, поэтому эта величина была использована в качестве внутреннего стандарта для каждого эксперимента. При работе с pH-чувствительным зондом FITC-декстран, загруженным в везикулы, определяли изменение pH среды внутри везикул и также относили его на содержание белка. Калибрование зонда, загруженного в везикулы, проводили, изменяя величину pH инкубационной среды, содержащей везикулярную фракцию и протонофор.

Для выделения фракций внутриклеточных мембран использовали гибрид F1 Нарт-150. Расщепленные ткани (отрезки колеоптилей без 4 мм верхушки, длиной 10–15 мм) гомогенизировали в среде, содержащей 0.4 М сахарозы, 50 мМ Трис-HCl (pH 7.8), 5 мМ ЭДТА, 2.5 мМ дитиотрейтола (ДТТ), 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 0.1% бычьего сывороточного альбумина (в отношении 3 мл среды на 1 г ткани для 3-суточных проростков и 2 мл/1 г для 4- и 5-суточных проростков). Гомогенат фильтровали через нейлон и центрифугировали при 3400 g 10 мин. Супернатант наносили на градиент плотности сахарозы, состоящий из слоев с плотностью 1.055 и 1.12 г/см³ (14 и 28% сахарозы), приготовленных на растворе 5 мМ Трис-MES (pH 7.3), 1 мМ ДТТ, 0.1 мМ ЭДТА. После

центрифугирования при 96000 g 2 ч фракцию на границе слоев отбирали, разбавляли в буферной смеси, содержащей 0.2 М сахарозу, 5 мМ Трис-MES, 1 мМ ДТТ, 0.1 мМ ЭДТА, и осаждали при 96000 g 1 ч. По данным анализа активности маркерных ферментов, фракция содержала преимущественно мембраны вакуолей и эндоплазматического ретикула (ЭР). Отделения ЭР от тонопласта не производили в связи с тем, что у 3-суточных проростков кукурузы, в отличие от 4–5-суточных, клетки колеоптилей находятся в основном в начальной стадии растяжения и формирования вакуолей, при этом комплексы АТФазы V-типа могут быть локализованы и в тонопласте и в ЭР (как это показано для клеток кончика корня овса (Herman et al., 1994)).

АТФ- и пиродифосфат-зависимый транспорт ионов H^+ в мембранные везикулы фракции внутриклеточных мембран оценивали по снижению поглощения моноаминного оптического зонда акридинового оранжевого (АО) на спектрофотометре СФ-46 при 495 нм. Инкубационная смесь объемом 800 мкл включала 10 мкМ АО, 5 мМ Трис-MES (рН 7.0), 0.2 М сахарозу, 1 мМ $MgSO_4$, 50 мМ KCl, 1 мМ ДТТ, 0.1 мМ ЭДТА, везикулярный препарат (10–30 мкг мембранного белка). Измерения начинали с добавления 1 мМ Na_2ATP или 0.5 мМ $Na_4P_2O_7$. Определяли начальную скорость изменения поглощения АО и значение ΔA_{495} при достижении реакцией состояния равновесия, соответствующее максимальному градиенту рН, создаваемому при работе H^+ -насосов. Проницаемость мембран для протонов оценивали по росту поглощения АО (при выходе протонов из везикул) после остановки реакции добавлением 2 мМ ЭДТА. Определяли отношение между изменениями поглощения АО при выходе H^+ и при АТФ/пиродифосфат-зависимом входе H^+ в везикулы: $\Delta A_{495 out} / \Delta A_{495 in}$.

Содержание белка в мембранных препаратах определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

В работе представлены средние арифметические значения и ошибки среднего, полученные по результатам экспериментов, проведенных в 3–7 биологических повторностях.

В работе использовали: Трис (“Reanal”, Венгрия; “Sigma”, США); Mes, Трис, ДТТ, АТФ, валиномицин, DCCD, FCCP (“Sigma”, США); ЭДТА (Fluka, Германия); FITC-декстран (Molecular Probes) остальные реактивы – отечественного производства (хч).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ активности H^+ -АТФазы плазмалеммы

При центрифугировании в градиенте плотности сахарозы на границе слоев с плотностью 34 и 45% получали фракцию мембран, которая по дан-

ным ингибиторного анализа биохимических маркеров обогащена плазмалеммой (Рудашевская и др., 2005). В этой фракции обнаруживалась высокая Mg^{2+} -зависимая K^+ -стимулируемая АТФазная гидролитическая активность, ингибируемая ванадатом, что характерно для АТФаз Р-типа, к которым относится H^+ -АТФазы плазмалеммы.

В наших экспериментах с использованием фракции, обогащенной плазмалеммой из клеток колеоптилей кукурузы, показана АТФ-зависимая генерация электрохимического потенциала ионов H^+ . Величину протонного градиента, генерируемого на мембранах везикул плазмалеммы, анализировали по сдвигу рН внутри везикул, который оценивался по изменению флуоресценции зонда FITC. Внутривезикулярная локализация зонда во время эксперимента обеспечивалась остатком высокомолекулярного декстрана (мол. м. 40000), структурно соединенного с молекулой FITC и препятствующего транспорту зонда из везикул. Выявлено изменение интенсивности флуоресценции зонда при введении комплекса Mg -АТФ в среду инкубации, что свидетельствует об изменении значения рН среды внутри везикул (рис. 1а). Введение АТФ активирует только инвертированные везикулы с обращенным в инкубационную среду активным центром фермента и индуцирует транспорт протона внутрь везикул, что приводит к понижению рН в везикулах и соответствующему изменению флуоресценции зонда. Наблюдаемый эффект специфичен для АТФ по отношению к АМФ, добавление которого приводит лишь к незначительному изменению флуоресценции (рис. 1а). Ванадат, специфичный ингибитор H^+ -АТФазы плазмалеммы, снижал амплитуду АТФ-индуцируемого изменения флуоресценции (рис. 1б), что доказывает участие H^+ -АТФазы плазмалеммы в изменении рН внутри везикул. Предварительное внесение валиномицина к везикулам приводило к более сильному и быстрому АТФ-зависимому изменению флуоресценции (рис. 1в). Наблюдаемый эффект активации, создаваемый валиномицином, согласуется с тем, что H^+ -АТФаза плазмалеммы активируется деполяризацией плазмалеммы, а также ионами K^+ со стороны активного центра фермента.

Как видно из рис. 1, АТФ-зависимая генерация электрохимического потенциала ионов водорода развивается быстро и достигает максимума менее, чем за 5 мин. Сравнительный анализ амплитуды генерируемого потенциала везикулярными фракциями плазмалеммы, полученными из клеток колеоптилей проростков разного возраста, выявил изменение транспортной активности фермента в онтогенезе проростка. При использовании рН-зависимого зонда FITC наибольшая H^+ -транспортирующая активность H^+ -АТФазы плазмалеммы была показана для фракции 4-су-

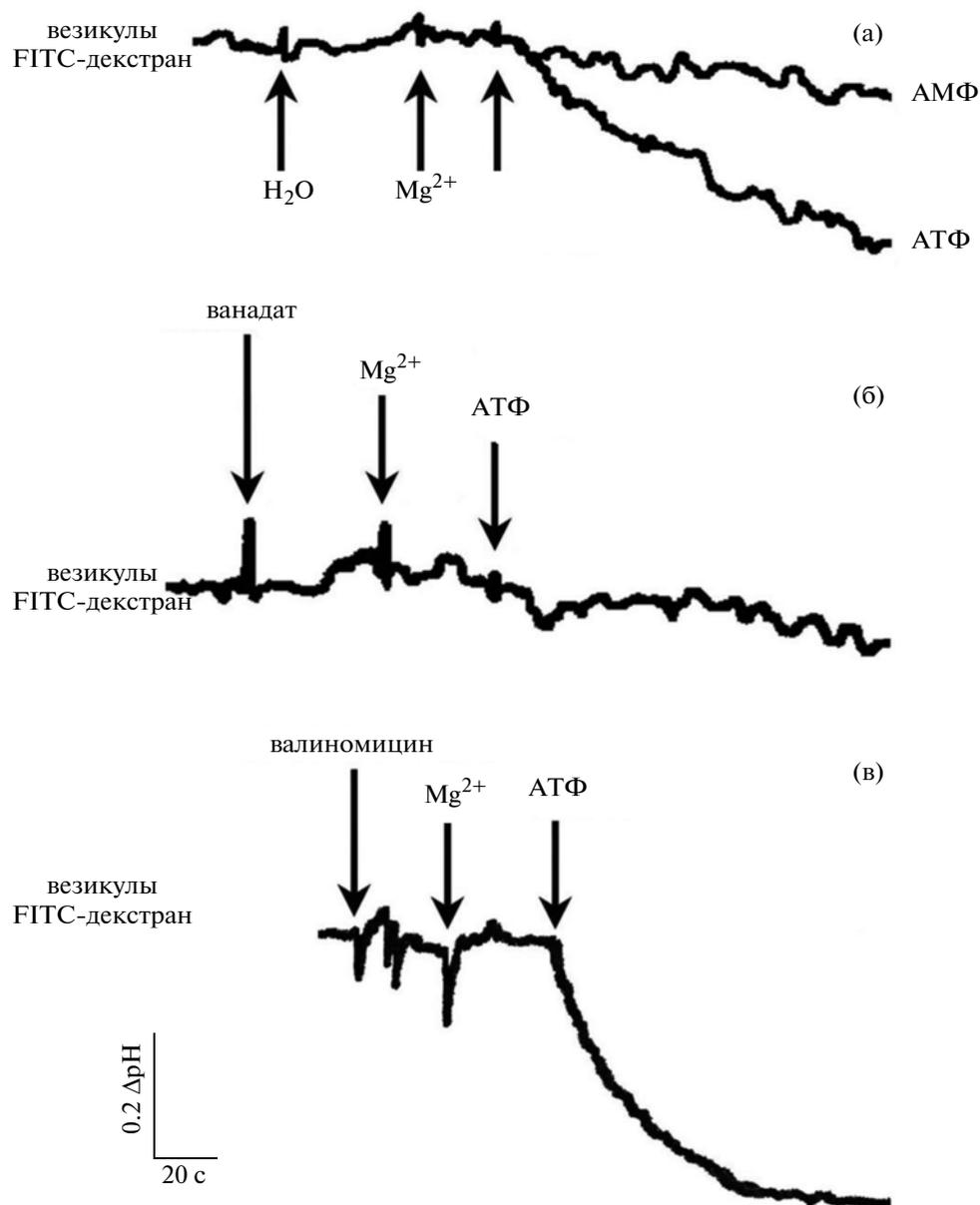


Рис. 1. АТФ-индуцируемое изменение интенсивности флуоресценции рН-зависимого зонда FITC-декстран в препаратах везикул плазмалеммы клеток coleoptiles кукурузы.

а – АТФ- и АМФ-зависимое изменение флуоресценции зонда FITC-декстран.

б – Влияние ванадата на величину АТФ-зависимого изменения флуоресценции зонда FITC-декстран.

в – Влияние валиномицина (0.03 мкМ) на величину АТФ-зависимого изменения флуоресценции зонда FITC-декстран.

точных проростков, которая значительно превышала активность фермента на 3 и 5 сутки развития (рис. 2а). Аналогичная зависимость была выявлена и при определении электрической составляющей генерируемого протонного градиента, которая регистрировалась по изменению интенсивности флуоресценции потенциал-зависимого зонда diS-C₃-(5). Максимальное изменение было характерно для мембран, полученных из клеток ко-

леоптилей 4-суточных этиолированных проростков (рис. 2б).

Для всех исследуемых этапов развития использование АМФ в качестве аналога АТФ вызывало лишь очень незначительное изменение свечения зонда diS-C₃-(5), которое можно считать неспецифичным (рис. 2). Применение ингибитора DCCD (1.7 мкМ) во всех проведенных экспериментах снижало регистрируемую FITC активность фракции плазмалеммы на 50, 60 и 67% у

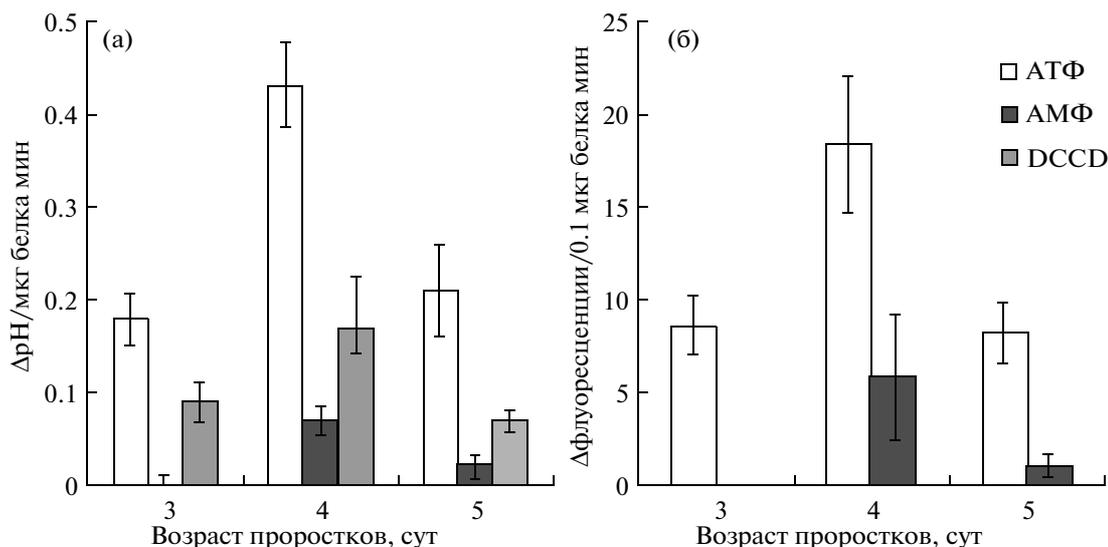


Рис. 2. Изменение АТФ-зависимой H^+ -транспортирующей активности везикулярной фракции плазмалеммы из клеток coleoptилей проростков кукурузы разного возраста.

а – Активность транспорта протона оценивали с использованием FITC-декстран и выразили в изменении значения рН внутривезикулярной среды.

б – Активность транспорта протонов оценивали с использованием diS-C₃-(5) и выразили в процентах от величины потенциала, генерируемого в данной системе валиномицином.

На диаграмме (а, б): белые столбики – в инкубационную среду, содержащую везикулы и ионы Mg, вносили АТФ; серые столбики – АМФ; заштрихованные столбики – при оценке АТФ-зависимого транспорта фракцию мембран предварительно инкубировали с DCCD (1.7 мкМ).

фракций, полученных из 3-, 4- и 5-суточных проростков, соответственно (рис. 2а).

Анализ активности вакуолярных пирогосфатазы и H^+ -АТФазы

Фракция мембран, выделяемая из гомогената клеток coleoptилей кукурузы на границе слоев градиента плотности сахарозы 14 и 28%, по данным анализа биохимических маркеров обогащена фрагментами тонопласта и эндоплазматического ретикулума. В ней обнаруживалась значительная нитрат-ингибируемая АТФазная активность, присущая АТФазе вакуолярного (V) типа, пирогосфатазная активность с высоким уровнем стимуляции KCl, характерная для пирогосфатазы V-типа, азид-нечувствительная НАДН-цитохром С-редуктазная активность (маркер ЭР), а также незначительная ванадат-чувствительная АТФазная активность.

В исследуемой фракции, обозначенной как фракция эндомембран, показан АТФ- и пирогосфат-зависимый транспорт H^+ , который регистрировали спектрофотометрически по снижению поглощения проникающего моноаминного зонда акридинового оранжевого (рис. 3). Величина адсорбции АО возвращалась на исходный уровень после добавления протонофора FCCP (5 мкМ), а также тритона X-100 (0.01%) и NH_4Cl (15 мМ), что свидетельствует о рассеивании протонного градиента. АТФ-зависимое накачивание H^+ в вези-

кулы эндомембран осуществлялось за счет работы АТФазы V-типа, так как оно полностью подавлялась бафиломицином А1 (5 нМ) и на 80% ингибировалось KNO_3 (50 мМ) и не обнаруживало чувствительности к ванадату.

Сравнительный анализ активности АТФ- и пирогосфат-зависимого транспорта ионов H^+ в везикулы препаратов эндомембран клеток проростков разного возраста показал, что АТФ-зависимое снижение поглощения АО имело наибольшую начальную скорость у растущих растяжением coleoptилей 4-суточных проростков (рис. 4а), тогда как в присутствии пирогосфата эта величина была максимальной у 3-суточных проростков, клетки которых находятся в начале фазы растяжения (рис. 4б). Сходные изменения наблюдались, когда H^+ -транспортирующую активность выражали как максимальный градиент рН между внутренней средой везикул и инкубационной средой, достигаемый в ходе реакции ($\Delta A_{495}/\text{мг белка}$).

Уровень регистрируемого снижения поглощения АО зависит не только от активности H^+ -насосов, обеспечивающих вход H^+ в везикулы, но и от выхода H^+ в инкубационный раствор, который, возможно, связан с наличием каналов и котранспортеров для протонов и других ионов или молекул (в данной системе Cl^-) и неспецифической проницаемостью мембран, зависящей от свойств липидно-белкового матрикса мембран, температуры и состояния мембран после их выделения. Чтобы оценить проницаемость мембран к прото-

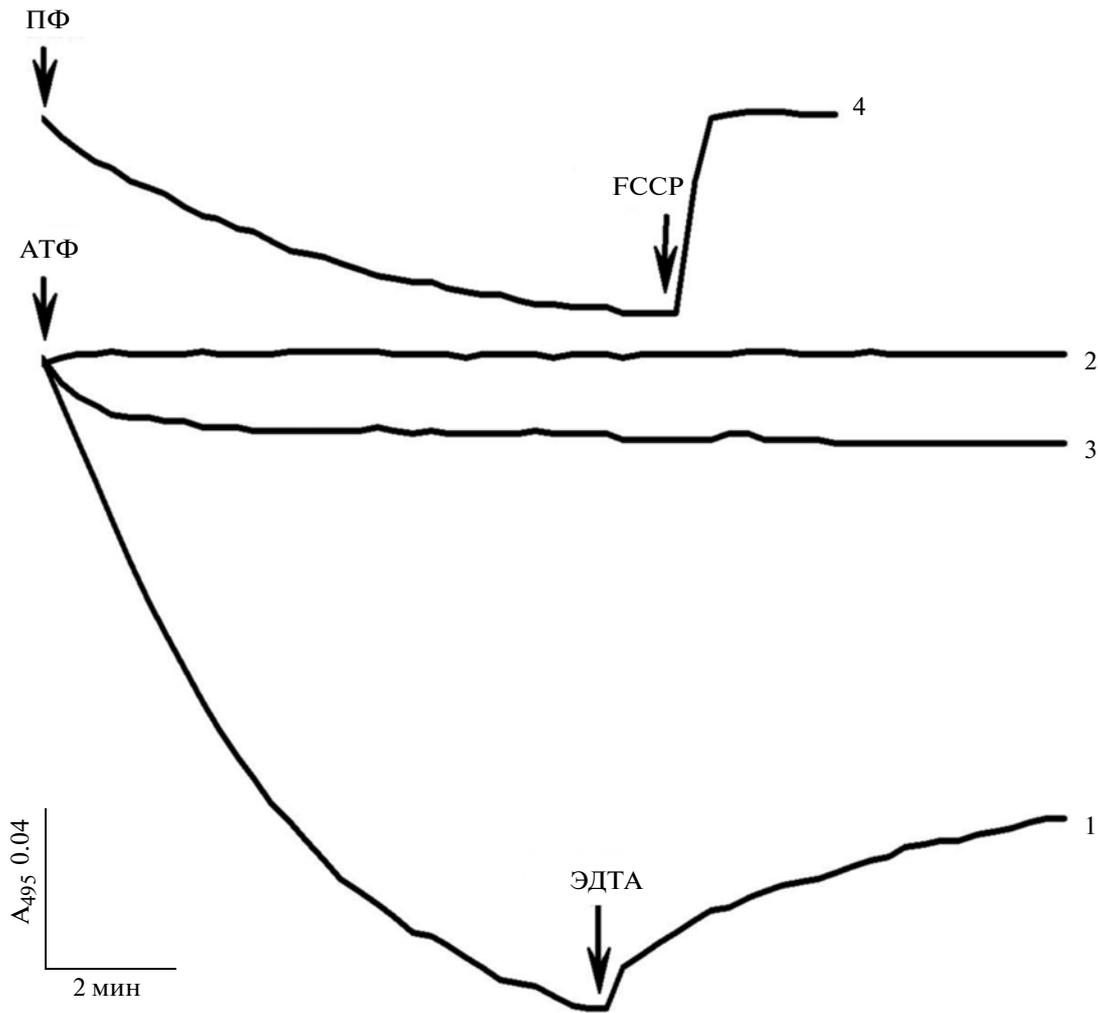


Рис. 3. АТФ-зависимое (1, 2, 3) и пирофосфат-зависимое (4) снижение поглощения акридинового оранжевого в препаратах эндомембран, выделенных из клеток колеоптилей 4-суточных проростков кукурузы. Бафиломицин А₁ (2 нМ) (2), КНО₃ (50 мМ) (3) добавлены перед началом АТФ-зависимой реакции, FCCP (5 мкМ), ЭДТА (2 мМ) – как указано стрелками.

нам после достижения равновесного уровня ΔpH , при котором вход и выход H^+ уравновешены, в среду реакции добавляли ЭДТА (2 мМ) для остановки реакции и анализировали выделение H^+ (рис. 3). Было установлено, что величина повышения поглощения АО после добавления ЭДТА существенно не различалась для препаратов мембран из проростков разного возраста (рис. 5а). Однако при расчете процентного отношения величины возврата поглощения АО на его исходный уровень ΔA_{495} (выход H^+) к величине АТФ-зависимого снижения поглощения АО ΔA_{495} (вход H^+) было выявлен наиболее низкий “процент возврата” в препаратах мембран из 4-суточных проростков кукурузы (рис. 5б). Это свойство мембранного транспорта у 4-суточных проростков отсутствовало при анализе пирофосфат-зависимого закисления везикул (данные не приводятся).

Можно предположить, что различия в проницаемости мембран к ионам H^+ связаны непосредственно с состоянием АТФазы вакуолярного типа и/или сопряженными с ней транспортными механизмами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рост растяжением представляет собой универсальное свойство растительных клеток, хорошо идентифицируемое как у многоклеточных водорослей, так и у высших растений. Возникнув на ранних этапах эволюции, данный процесс обеспечивает при минимальных энергетических затратах достижение максимального объема, что является основополагающим критерием растительного организма – максимальное соприкосновение с окружающей средой в целях получения наилучшего доступа к источникам питания (По-

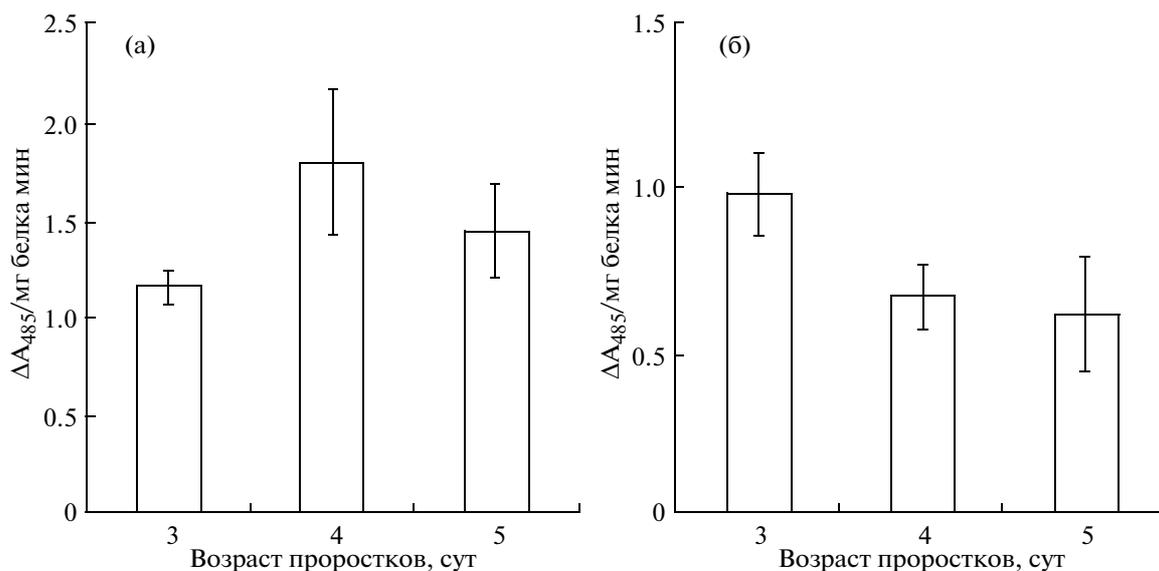


Рис. 4. H^+ -транспортующая активность АТФазы (а) и пирофосфатазы (б) эндомембран из клеток coleoptилей кукурузы, выраженная как начальная скорость снижения поглощения акридинового оранжевого в расчете на мг мембранного белка.

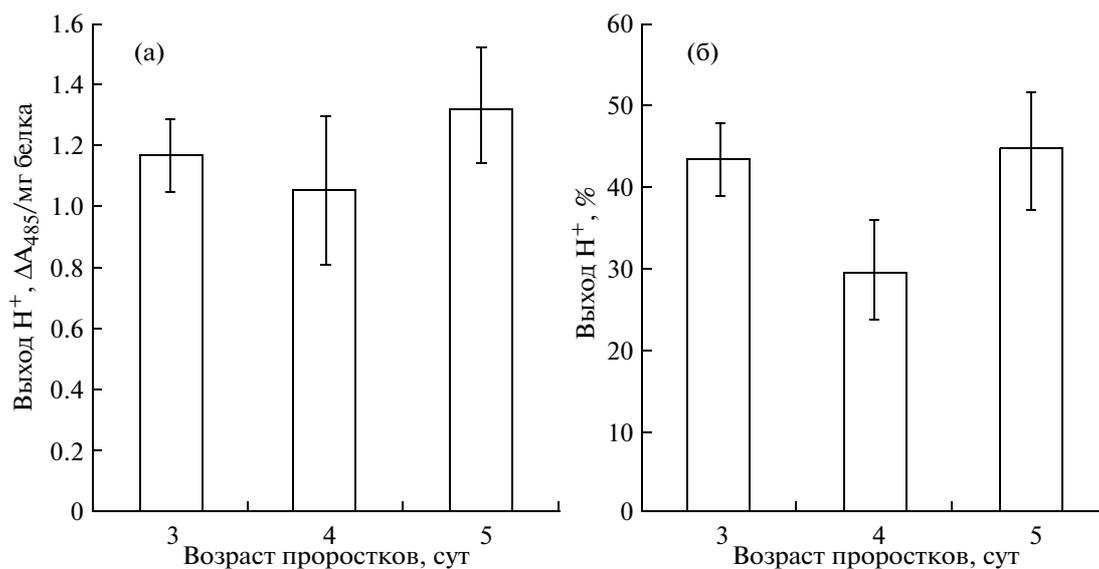


Рис. 5. Уровень выхода ионов H^+ из везикул эндомембран на фоне АТФ-зависимого градиента рН после остановки АТФазной реакции ЭДТА (2 мМ).

а – Выход H^+ , выраженный как изменение поглощения АО в расчете на мг мембранного белка.

б – Отношение роста поглощения АО при выходе H^+ к снижению поглощения АО при АТФ-зависимом переносе H^+ в везикулы, в процентах.

левой, 1986). Хорошо известно, что данный процесс находится под контролем фитогормона ауксина. Предложенная в 70-х годах теория “кислого роста” предполагает, что ауксин вызывает целый каскад событий, одним из элементов которого является активация H^+ -АТФазы плазмалеммы (Cleland et al., 1971; Hager et al., 1971; Полевой, 1986). Процесс роста растяжением включает в себя интенсивную вакуолизацию клетки, следовательно, можно предположить активное участие и ряда ва-

куолярных транспортных систем, в первую очередь вакуолярных H^+ -АТФазы и пирофосфатазы.

В клетках coleoptилей кукурузы, все три типа H^+ -насосов проявляют значительную гидролитическую и транспортную активность. Тем не менее, полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что интенсивность транспорта протонов варьирует в ходе развития клеток ювенильного органа проростка. Так, у 3-суточных проростков в мембранах везикул тонопласта и эндо-

плазматического ретикулума наиболее высокий уровень имеет активность H^+ -пирофосфатазы. В ходе дальнейшего развития, характеризующегося постепенным замедлением ростовых процессов, транспортная функция данного фермента постепенно снижается. Динамика активности H^+ -АТФаз как плазмалеммы, так и тонопласта была иной. Максимальный уровень транспорта протонов обе АТФазы обнаруживали на 4-е сутки развития проростка, т.е. при ослаблении интенсивности роста. У 5-суточных проростков, на этапе завершения физиологической функции колептиля (первый настоящий лист выходит за пределы колептиля) и полной остановке роста, основные протон-транспортирующие насосы, тем не менее, сохраняли свою активность, чувствительность к ингибиторам и субстратную специфичность.

Таким образом, в фазе завершения деления и перехода клеток колептиля к растяжению наибольший вклад в энергизацию внутриклеточных компартментов вносит V-пирофосфатаза. На стадии поддержания интенсивности роста растяжением возрастает значение АТФаз в энергизации мембран растительной клетки и регуляции ее метаболизма.

Эти результаты согласуются с литературными данными для других растительных объектов. В гипокотылях маша наибольшая пирофосфатазная активность, высокий уровень мРНК и молекул фермента обнаруживался в зоне делящихся клеток. Напротив, в зонах интенсивного роста растяжением и, особенно, дифференцированных клеток возрастала активность АТФазы V-типа (Maeshima et al., 1996; Nacaniishi, Maeshima, 1998). В созревающих плодах груши также на начальных этапах развития, характеризующихся увеличением размера клеток, преобладала активность пирофосфатазы. На поздних этапах созревания основным H^+ -насосом тонопласта становилась АТФаза (Shiratake et al., 1997). Ряд исследований свидетельствует о нелинейном изменении активности H^+ -АТФазы плазмалеммы. Так временное увеличение активности работы протонной помпы плазмалеммы характеризовало инициацию прорастания семян кукурузы (Sanchez-Nieto et al., 1998), индукцию развития почек персика (Aue et al., 1999), а также период инициации цветения растений табака (Santoni et al., 1991).

Можно отметить некоторые особенности физиологии клеток в фазе деления, которые обеспечивают приоритетную роль H^+ -пирофосфатазы на ранних этапах онтогенеза. Молодые клетки растений до перехода к растяжению малы, подобно клеткам животных, они имеют более низкую интенсивность дыхания, а внутренние клетки мериستم могут находиться в состоянии частичного анаэробноза (Саламатова, 1983). Это сочетается с пониженным уровнем АТФ и увеличивает значе-

ние пирофосфата как источника энергии и субстрата для транспорта H^+ . Преобладание анаболических реакций над катаболическими характерно для клеток в фазе деления. Многие биосинтетические процессы, в том числе синтезы нуклеиновых и жирных кислот, белков и полисахаридов, сопровождаются образованием пирофосфата. Одна из функций H^+ -пирофосфатазы состоит в утилизации пирофосфата, что обеспечивает направленность обратимых реакций в сторону биосинтезов (Rea, Poole, 1993; Maeshima et al., 1996). Показана также возможность использования создаваемого в результате работы H^+ -пирофосфатазы $\Delta\mu H^+$ для синтеза АТФ в результате сопряженной работы вакуолярной H^+ -АТФазы с обращением ее энергетической функции (Fasaha, de Meis, 1998), что может иметь важное значение для снабжения клеток дополнительной энергией в форме АТФ.

При переходе клеток к росту растяжением возрастает интенсивность дыхания, накапливаются низкомолекулярные вещества, увеличивается содержание АТФ, которое поддерживается на миллимолярном уровне, как и у дифференцированных клеток (Саламатова, 1983). Содержание пирофосфата у большинства видов на порядок ниже (Rea, Poole, 1993). Тем самым создаются благоприятные условия для активации работы H^+ -АТФаз как плазмалеммы, так и тонопласта.

Перераспределение функций между АТФазами в фазе роста растяжением может находиться под контролем целого ряда факторов. Регуляторное значение могут иметь в первую очередь временные изменения кислотности цитоплазмы. H^+ -АТФазы имеют отличающиеся оптимумы рН (Hager, Biber, 1984). Для вакуолярной H^+ -АТФазы оптимум рН – около 7.0 и, как правило, сглажен, а для фермента плазмалеммы он гораздо более узок с максимумом равном 6.5. Следовательно, факторы, приводящие к закислению рН цитозоля, будут инициировать активацию работы в первую очередь H^+ -АТФазы плазмалеммы. Рассматривая рост растяжением, следует отметить, что индолилуксусная кислота (природный ауксин), индуцирующая данный тип роста, вызывает именно закисление цитоплазмы (Felle, 1988; Gering et al., 1990; Shishova, Lindberg, 1999). Кроме того показано, что ауксин обладает способностью усиливать экспрессию одной из изоформ H^+ -АТФазы плазмалеммы кукурузы МНА2, в непроводящих тканях (Frias et al., 1996), а, следовательно, не имеющей прямого отношения к транспорту метаболитов. Данный факт свидетельствует о том, что в процессе инициации и поддержания роста растяжением число ферментативных единиц H^+ -АТФазы плазмалеммы может увеличиваться, что подтверждается в работах А. Hager (Hager et al., 1991; Hager, 2003). Кроме того, фермент может быть орга-

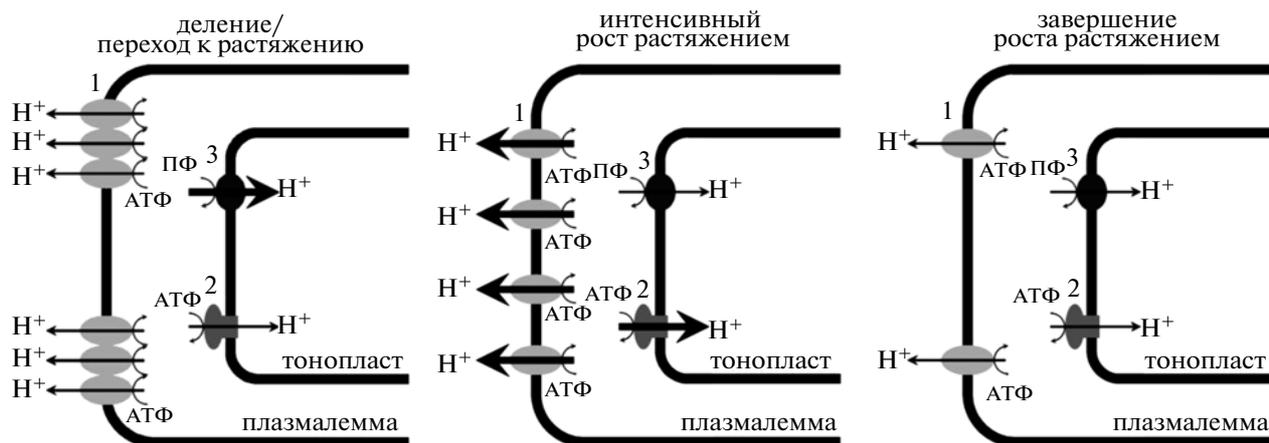


Рис. 6. Гипотетическая модель перераспределения функций между основными протон-транспортирующими насосами растительной клетки в процессе роста растяжением. 1 – H^+ -АТФаза плазмалеммы, 2 – H^+ -АТФаза тонопласта, 3 – H^+ -пирофосфатаза тонопласта.

низован в мембране в виде димера и даже олигомера (Sondergaard et al., 2004), что также может отражаться на активности фермента или сопряжении его гидролитической и транспортной функций. Следовательно, при переходе от деления к росту растяжением и особенно на этапе поддержания роста будет возрастать роль именно H^+ -АТФазы плазмалеммы. И действительно, по нашим результатам более чем 2-кратное усиление транспортной активности H^+ -АТФазы плазмалеммы характеризует 4 сутки развития проростка кукурузы. Усиление транспортной функции АТФазы ПМ, выявленное в представленной работе, полностью соответствует повышению (более чем в 2 раза) ее гидролитической активности на данном этапе развития проростка (Рудашевская и др., 2005, Shishova et al., 2007). Результаты, полученные с использованием везикулярной фракции плазмалеммы, подтверждаются цитохимическим исследованием, проведенным на том же объекте – колеоптилях разновозрастных проростков кукурузы (Рудашевская и др., 2009). Показано, что наибольшей АТФ-гидролизующей способностью отличаются клетки 4-суточных проростков. Данные электронной микроскопии позволяют предположить, что фермент у наиболее молодых клеток (3-суточные проростки) организован в форме мультимерного комплекса, тогда как к 4 суткам значительно возрастает число мономеров фермента.

Особо следует отметить возможность существования и гораздо более сложных механизмов кросс-регуляции активности H^+ -насосов в процессе роста. Так показано, что H^+ -пирофосфатаза может участвовать в процессе регуляции роста за счет изменения интенсивности полярного транспорта ауксина в результате перераспределения транспортеров PIN1 (Li et al., 2005). Известно, что белок PIN1 находится в постоянном «движении»

между плазмалеммой и эндомембранами. Усиление активности H^+ -пирофосфатазы интенсифицирует везикулярный транспорт между эндомембранами и плазмалеммой, что увеличивает число переносчиков ауксина в составе плазмалеммы, и сказывается на ауксин-зависимых процессах развития, в том числе росте растяжением. В связи с этим следует подчеркнуть, что еще одним белком плазмалеммы, осуществляющим достаточно быстрый обмен с эндомембранами является H^+ -АТФаза Р-типа. Следовательно, усиление работы H^+ -пирофосфатазы тонопласта может непосредственно регулировать активность транспорта протонов через плазмалемму за счет увеличения числа молекул фермента H^+ -АТФазы в составе плазматической мембраны.

Суммируя данные опубликованные в литературе и полученные нами можно высказать предположение о том, что на этапах деления и инициации роста растяжением в клетках колеоптилей кукурузы преобладающее значение имеет вакуолярная H^+ -пирофосфатаза (рис. 6). В силу ряда регуляторных механизмов постепенно все большее значение приобретают H^+ -АТФазы как тонопласта, так и плазмалеммы с преобладающей функцией последней, что обеспечивает протекание наиболее интенсивной фазы клеточного роста. На этапе завершения физиологической функции ювенильного органа, характеризующемся практически полной неспособностью клеток, как к эндогенному, так и ауксин-индуцированному росту, активность всех трех H^+ -транспортеров снижается, тем не менее, они продолжают осуществлять функцию поддержания гомеостаза клетки о чем свидетельствует их субстратная специфичность и чувствительность к ингибиторам.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского Фонда Фундаменталь-

ных Исследований (гранты №№ 03-04-48167, 07-04-01056, 10-04-01035).

Авторы выражают глубокую признательность член-корр. РАН А.Г. Габирову за помощь в начале работы с зондом FITC-декстран, а также Н.И. Инге-Вечтомовой за многолетнюю поддержку и помощь в освоении методов получения мембранных фракций и работы с флуоресцентными зондами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батов А.Ю., Юрконе С.В., Маркова И.В. и др. Определение содержания ионов кальция с помощью флуоресцентного зонда Индо-1 в везикулах плазмалеммы, выделенных из растительных клеток // Физиология растений. 1995. Т. 42. С. 144–148.
- Галкина С.И., Будунова И.В., Судьина Г.Ф. и др. Внутриклеточная сигнализация и межклеточные контакты // Биологические мембраны. 1991. Т. 8. С. 1151–1152.
- Москалева О.В., Полевой В.В. Влияние фитогормонов на митотическую активность органов проростков кукурузы // Вестник Ленингр. ун-та. Сер. 3. 1987. Вып. 2 (№ 10). С. 118–121.
- Полевой В.В. Роль ауксина в системах регуляции у растений. Л.: Наука, 1986. 80 с.
- Рудаевская Е.Л., Емельянов В.В., Кирпичникова А.А. и др. Зависимость возрастных изменений ростовой активности колеоптилей и мезокотилей кукурузы от содержания индоллил-3-уксусной кислоты // Вестник СПб ун-та. Сер. 3. 2002. Вып. 3 (№ 19). С. 99–106.
- Рудаевская Е.Л., Кирпичникова А.А., Шишова М.Ф. Активность H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток колеоптилей в процессе развития проростка кукурузы // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 1–7.
- Рудаевская Е.Л., Яковлев А.Ю., Яковлева О.В., Шишова М.Ф. Цитохимическое выявление активности H^+ -АТФазы плазмалеммы и ее изменения у клеток колеоптилей проростков кукурузы разного возраста // Цитология. 2009. Т. 51. С. 149–154.
- Саламатова Т.С. Физиология растительной клетки. Л.: изд. ЛГУ, 1983. 232 с.
- Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с. 123–126.
- Aerts R.J., Durston A.J., Moolenaar W.H. Cytoplasmic pH and the regulation of dictyostellium cell cycle // Cell. 1985. V. 43. P. 653.
- Aue H.-L., Lecomte I., Gendraud M., Petel G. Change in plasma membrane ATPase activity during dormancy release of vegetative peach-tree buds // Physiol. Plant. 1999. V. 106. P. 41–46.
- Baltscheffsky M., Schultz A., Baltscheffsky H. H^+ -PPases: a tightly membrane-bound family // FEBS Lett. 1999. V. 457. P. 527–533.
- Blatt M.R., Armstrong F. K^+ -channels of stomatal guard cells: abscisic acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmic pH // Planta. 1993. V. 191. P. 330–341.
- Bradford M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 115–143.
- Busa W.B., Niccители R. Metabolic regulation via intracellular pH // Amer. J. Physiol. 1984. V. 246. P. 409–438.
- Cleland R.E. Cell wall extension // Annu. Rev. Plant Physiol. 1971. V. 22. P. 197–222.
- Dettmer J., Hong-Hermesdorf A., Stierhof Y.-D., Schumacher K. Vacuolar H^+ -ATPase activity is regulated for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 715–730.
- Drew M.C., He C.J., Morgan P.W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. P. 123–127.
- Facanha A.R., de Meis L. Reversibility of H^+ -ATPase and H^+ -pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds // Plant Physiol. 1998. V. 166. P. 1487–1495.
- Felle H. Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles // Planta. 1988. V. 174. P. 495–99.
- Felle H. pH Regulation in anoxic plants // Ann. Bot. 2005. V. 96. P. 519–532.
- Felle H. pH: Signal and messenger in plant cells // Plant Biol. 2001. V. 3. P. 577–591.
- Felle H., Bertl A. Light induced cytoplasmic pH changes and their interrelation to the activity of the electrogenic proton pump in *Riccia fluitans* // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 848. P. 176–182.
- Frias I., Caldeira M.T., Perez-Castineira J.R. et al. Major isoform of the maize plasma membrane H^+ -ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles // Plant Cell. 1996. V. 8. P. 1533–1544.
- Gaxiola R.A., Palmgren M.G., Schumacher K. Plant proton pumps // FEBS Lett. 2007. V. 581. P. 2204–2214.
- Gering C.A., Irving H.R., Parish R.W. Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 9645–9649.
- Gibbon B.C., Kropf D.L. Intracellular pH and its regulation in pelvetia zygotes // Developmental Biology. 1993. P. 259–268.
- Gruber G., Wiczorek H., Harvey W.R., Muller V. Structure-function relationship of A-, F- and V-ATPases // J. Exp. Biol. 2001. V. 204. P. 2597–2605.
- Hager A. Role of the plasma membrane H^+ -ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects // J. Plant Res. 2003. V. 116. P. 483–505.
- Hager A., Biber W. Functional and regulatory properties of H^+ pumps at the tonoplast and plasma membranes of *Zea mays* coleoptiles // Z. Naturforsch. 1984. V. 39. P. 927–937.
- Hager A., Debus G., Edel H.-G. et al. Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of plasma-membrane H^+ -ATPase // Planta. 1991. V. 185. P. 527–537.
- Hager A., Menzel H., Krauss A. Versuche und hypothese zur primarwirkung des auxins beim streckungswachstum // Planta. 1971. V. 100. P. 47–75.
- Herman H.M., Li X., Su R.T. et al. Vacuolar-type H^+ -ATPases are associated with the endoplasmic reticulum and provacuoles of root tip cells // Plant Physiol. 1994. V. 106. P. 1313–1324.
- Kluge C., Lahr J., Hanitzsch M. et al. New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H^+ -ATPase // J. Bioenerget. Biomembr. 2003. V. 35. P. 377–388.

- Li J., Yang H., Peer W.A. et al. Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development // *Science*. 2005. V. 310. P. 121–125.
- Lin H.H., Pan Y.J., Hsu S.H. et al. Deletion mutation analysis on C-terminal domain of plant vacuolar H⁺-pyrophosphatase // *Arch. Biochem. Biophys.* 2005. V. 442. P. 206–213.
- Maeshima M. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1465. P. 37–51.
- Maeshima M., Nacanishi L., Matsuura-Endo Ch., Tanaka Y. Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells // *J. Plant Res.* 1996. V. 109. P. 119–125.
- Mathieu Y., Lapous D., Thomine S.C., Guern J. Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors // *Planta*. 1996. V. 199. P. 416–424.
- Merzendorfer H., Gräf R., Huss M. et al. Regulation of proton translocating V-ATPases // *J. Exp. Biol.* 1997. V. 200. P. 225–235.
- Nacanishi Y., Maeshima M. Molecular cloning of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean // *Plant Physiol.* 1998. V. 116. P. 589–597.
- Palmgren M.G. Regulation of plant plasma membrane H⁺-ATPase // *Physiol. Plant.* 1991. V. 83. P. 314–323.
- Ratajczak R. Structure, Function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1465. P. 17–36.
- Rayle D.L. Auxin induced hydrogen-ion excretion in *avena* coleoptiles and its implications // *Planta*. 1973. V. 114. P. 63–73.
- Rea P.A., Poole R.J. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 1993. V. 44. P. 157–180.
- Sanchez-Nieto S., de Gomez-Puyou M.T., Rodriguez-Sortes R. et al. Comparison of plasma membrane H⁺-ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. V. 1414. P. 175–187.
- Santoni V., Vansuyt G., Rossignol M. The changing sensitivity to auxin of the plasma membrane H⁺-ATPase: relationship between plant development and ATPase content of membranes // *Planta*. 1991. V. 185. P. 227–232.
- Schumacher K. Endomembrane proton pumps: connecting membrane and vesicle transport // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006. V. 9. P. 595–600.
- Serrano R. Structure and function of plasma membrane ATPase // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1989. V. 40. P. 61–94.
- Serrano R. Structure, function and regulation of plasma membrane ATPase // *FEBS Lett.* 1993. V. 325. P. 108–111.
- Shiratake K., Kanayama Y., Maeshima M., Yamaki Sh. Changes in H⁺-pumps and tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit // *Plant Cell Physiol.* 1997. V. 38. P. 1039–1045.
- Shishova M., Lindberg S. Auxin-induced cytosol acidification in wheat leaf protoplasts depends on external concentration of Ca²⁺ // *J. Plant Physiol.* 1999. V. 155. P. 190–196.
- Shishova M., Yemelyanov V., Rudashevskaya E., Lindberg S. A shift in sensitivity to auxin within development of maize seedlings // *J. Plant Physiol.* 2007. V. 164. P. 1323–1330.
- Sondergaard T.E., Schulz A., Palmgren M.G. Energization of transport processes in plants. roles of the plasma membrane H⁺-ATPase // *Plant Physiol.* 2004. V. 136. P. 2475–2482.
- Strompen G., Dettmer J., Stierhof Y.-D. et al. Arabidopsis vacuolar H⁺-ATPase subunit e isoform is required for golgi organization and vacuole function in embryogenesis // *Plant J.* 2005. V. 41. P. 125–132.
- Van R.C., Pan Y.J., Hsu S.H. et al. Role of transmembrane segment 5 of the plant vacuolar H⁺-pyrophosphatase // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1709. P. 84–94.
- Wilkinson S. pH as a stress signal // *Plant Growth Regul.* 1999. V. 29. P. 87–89.

Alteration of Transport Activity of Proton Pumps in Coleoptile Cells during Early Development Stages of Maize Seedlings

M. F. Shishova, O. V. Tankelyun, E. L. Rudashevskaya, V. V. Yemelyanov, N. V. Shakhova, and A. A. Kirpichnikova

St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

e-mail: mshishova@mail.ru

Abstract—Comparative analysis of the transport activity of proton pumps (plasmalemma H⁺-ATPase, vacuolar H⁺-ATPase, and vacuolar H⁺-pyrophosphatase) in the membrane preparations obtained from coleoptile cells of etiolated maize seedlings (*Zea mays* L.) was carried out. The highest level of vacuolar pyrophosphatase activity was observed during the early development of coleoptile cells under growth intensification through the elongation. The role of ATPase pumps of tonoplast and plasmalemma in the transport of hydrogen ions increases during further development. The plasmalemma activity in this process is higher. When the growth stops, the activity of proton pumps becomes significantly lower. Nevertheless, their substrate specificity and sensitivity to proton pump inhibitors do not change, which can be an evidence of physiological significance of pumps in the maintenance of cell homeostasis.

Keywords: *Zea mays*, coleoptile, P-type and V-type H⁺-ATPases, V-type H⁺-pyrophosphatase, proton transport, vesicles.

УДК 582.475.2:581.3:58.085

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ *in vitro* ТРЕХ ВИДОВ ЛИСТВЕННИЦЫ

© 2012 г. И. Н. Третьякова, А. В. Барсукова

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, 660036 Красноярск, Академгородок, стр. 50

E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 21.04.11 г.

Окончательный вариант получен 30.01.12 г.

Формирование эмбрионного каллуса у видов лиственницы, произрастающих в Сибири (*Larix sibirica*, *L. gmelinii*, *L. sukaczewii*) происходило на среде MSGm под действием регуляторов роста (2.4Д и БАП) по одной схеме: вытягивание соматических клеток, их асинхронное деление с образованием инициали эмбрио и клетки трубки. Клетки инициали претерпевали последовательные деления и формировали эмбриональные глобулы, ведущие к формированию соматических зародышей. При добавлении в среду АБК и ПЭГ происходило вызревание соматических зародышей и затем последующее их прорастание. У лиственницы Сукачева и ее гибрида с лиственницей сибирской получены длительно пролиферирующие эмбрионные клеточные линии и растения регенеранты. Успех соматического эмбриогенеза зависел от генотипа дерева донора.

Ключевые слова: соматический эмбриогенез, культура *in vitro*, лиственница сибирская, лиственница Гмелина, лиственница Сукачева.

Важной жизненной стратегией растительных организмов является тотипотентность их клеток. Реализация этой стратегии ярко проявляется в культуре *in vitro* и особенно через соматический эмбриогенез.

Соматический эмбриогенез – асексуальный способ размножения у голосеменных растений – был открыт 26 лет назад у *Picea abies* (Chalupa, 1985; Накман et al., 1985). В настоящее время с помощью соматического эмбриогенеза осуществляется изучение морфогенетических программ, таких как детерминация, дифференцировка, дедифференцировка и компетентность, а также проводится массовое тиражирование высокопродуктивных, устойчивых к фитопатогенам генетически улучшенных форм хвойных растений (Lelu et al., 1994; Lelu-Walter et al., 2008; Park, 2002, 2006; Klimaszewska et al., 2001).

Среди хвойных, представители рода *Larix* являются наиболее распространенными лесообразующими древесными видами на территории России. Они различаются по морфологическим признакам, лесоводственным характеристикам, ритмам сезонного развития и морфогенеза вегетативных и генеративных органов, а так же характеризуются быстрым ростом, энергичной ассимиляцией, транспирацией и высокой продуктив-

ностью (Дылис, 1947; Рожков и др., 1991; Ирошников, 2004).

Занимая обширный ареал, виды рода *Larix* обладают чрезвычайно высокой пластичностью, отличающей ее от других представителей семейства *Pinaceae* (Третьякова и др., 2006). Этот признак связан с периодическим сбрасыванием хвои, переключением брахибластов на генеративный путь развития и, наоборот, генеративных структур на спорофитный путь развития, наличием толстой оболочки, окружающей пыльцевое зерно, не позволяющей пыльце прорасти при неблагоприятных условиях, отсутствием органического покоя у генеративных и вегетативных органов в зимний период, и, в целом, большим морфогенетическим потенциалом, позволяющим видам лиственницы адаптироваться к неблагоприятным экологическим факторам (Третьякова и др., 2006).

Вместе с тем, виды лиственницы характеризуются неравномерностью урожаев в многолетнем цикле и низким качеством семян. Наиболее сильно этот феномен проявляется у лиственницы сибирской, у которой урожаи семян значительно ниже (а в отдельные годы вообще отсутствуют) по сравнению с другими представителями рода *Larix* (Тренин, 1986; Милютин, 2003; Ирошников, 2004). Кроме того, деревья лиственницы сибирской очень сильно поражаются лиственничной почковой галлицей, оказывающей сильное негативное влияние на урожай лиственничных лесов.

Сокращения: 2.4-Д – дихлорфеноуксусная кислота, БАП – 6-бензил аминопурин, АБК – абсцизовая кислота, ПЭГ – полиэтиленгликоль, ИМК – инолилмасляная кислота, Gelrite – желирующий агент, ЭМ – эмбриональная масса.

Для решения проблемы лесовосстановления видов лиственниц за рубежом разрабатываются программы с использованием современных биотехнологий микрочлониального размножения, таких как соматический эмбриогенез (Park, 2002, 2006).

Для рода *Larix* соматический эмбриогенез был получен у *L. decidua* (von Aderkas et al., 1990), *L. kaempferi* (Lelu-Walter, Pagues, 2009) и гибридов *L. x occidentalis* (Thompson, von Aderkas, 1992), *L. x eurolepis* (*L. decidua* x *L. kaempferi*) (Klimaszwska, 1989; von Aderkas et al., 1990; Lelu, 1994), *L. x marscinlinsii* (*L. kaempferi* x *L. decidua*) (Lelu et al., 1994; Lelu-Walter, Pagues, 2009). Первая работа по инициации соматического эмбриогенеза у лиственницы сибирской была опубликована нами в 2008 году (Белоруссова, Третьякова, 2008). В ней впервые было показано становление соматических клеток зародыша под влиянием гормонов на путь эмбриогенеза при инициации и пролиферации морфогенного каллуса.

Однако, несмотря на активные исследования по соматическому эмбриогенезу у лиственницы сибирской, регенерация растений путем соматического эмбриогенеза все еще остается не решенной для данного вида. Критическим моментом явился процесс вызревания соматических зародышей, на котором эмбриональное развитие у лиственницы сибирской останавливалось.

Цель настоящей работы заключалась в разработке биотехнологии соматического эмбриогенеза у видов лиственницы, произрастающих на территории Сибири, с подбором минеральных сред, концентраций гормонов и желирующих агентов на процессы образования и вызревания соматических зародышей и получения растений регенерантов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследований служили 25 деревьев лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), 10 деревьев лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) и 4 дерева лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dylis), произрастающих на территории дендрария Института леса СО РАН (г. Красноярск). Возраст деревьев 35–40 лет. На дереве (генотип С_{нп1}) лиственницы Сукачева проводилось контролируемое опыление макростробилов пылью лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина.

В качестве материала для индукции соматического эмбриогенеза были взяты изолированные зиготические зародыши на стадии глобулярного зародыша, инициации и развития семядолей. Сбор посадочного материала осуществляли с июля по август в 2007–2010 гг. Семена очищали от покровных чешуй, поверхностно стерилизовали

5% спиртовым раствором йода в течение 3 минут. После 3-кратной промывки в стерильной дистиллированной воде, мегагаметофиты обрабатывали перекисью водорода в течение 5–10 минут. Зародыши извлекали из мегагаметофитов в стерильных условиях, помещали на увлажненную фильтровальную бумагу в чашках Петри и затем переносили на питательную среду.

Индукция каллуса. Для индукции каллуса у видов лиственницы использовали минеральные основы базовых сред: 1/2 MS (Murashige, Skoog, 1962), MSG (Vecvar et al., 1990) и модифицированную нами среду MSGm с увеличенным содержанием некоторых микроэлементов по сравнению с исходной прописью MSG и изменным составом макроэлементов (из среды исключен KCl) (табл. 1). В качестве регуляторов роста использовали 2.4-Д (2 мг/л) и БАП (1 мг/л). В среду добавляли агар – 7 г/л; pH среды приводили к 5.8 до автоклавирования, которое проводили при 121°C в течение 20 мин. В охлажденную питательную среду после автоклавирования добавляли L-глутамин. В каждой чашке Петри культивировали 5 зародышей на 20 мл индукционной среды в темноте при 25°C ± 1°C.

Пролиферация эмбриональной массы. Для пролиферации каллуса и образования эмбриональной массы (ЭМ) применяли указанные базовые среды, содержащие 2.4-Д (2 мг/л), БАП (0.5 мг/л) и сахарозу (20 г/л). Режим культивирования такой же как при индукции каллуса. Пересадки на свежую питательную среду проводили каждые 2 нед. За 7 дней до перевода каллусов на безгормональную среду (предвызревание соматических зародышей) их помещали в жидкую питательную среду MSGm (без агара) и подвергали встряхиванию на круговой качалке.

Предозревание соматических зародышей. Кусочки активно растущей эмбриональной массы, весом 100–300 мг переносили на безгормональную базовую (MSGm) среду с активированным углем (10 г/л) и повышенным содержанием сахарозы (34 г/л), для остановки пролиферации и перехода соматических зародышей к вызреванию. Экспланты культивировали в течение одной недели на свету малой интенсивности (10 мкмоль м⁻² с⁻¹) при 16-часовом фотопериоде.

Созревание соматических зародышей Эксперименты по созреванию соматических зародышей трех видов лиственницы выполняли на базовой среде MSGm, содержащей сахарозу (40–60 г/л), АБК (16–32 мг/л), ИМК (0.2 мг/л) и ПЭГ (5–10%) в различных вариациях (табл. 2). В качестве желирующего агента использовали Gelrite (3–4 г/л). Культивирование осуществляли на свету малой интенсивности (20 мкмоль м⁻² с⁻¹) при 16-часовом фотопериоде, при 24°C ± 1°C. Регуляторы роста растений (АБК и ИМК) и L-глутамин

Таблица 1. Состав базовых питательных сред MS, MSG, MSGm, используемых в экспериментах по культуре *in vitro* у листовницы

Компоненты среды	Концентрация компонентов в среде, мг/л		
	MS	MSGm	MSG
Макроэлементы:			
NH ₄ NO ₃	1650	—	—
KNO ₃	1900	100	100
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	440	440
MgSO ₄ · H ₂ O	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170
KCl	—	—	745
Микроэлементы:			
KI	0.83	0.83	0.83
H ₃ BO ₃	0.62	3.15	0.62
MnSO ₄ · H ₂ O	22.3	22.3	22.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	8.6	8.6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.375	0.25
CuSO ₄ · 6H ₂ O	0.025	0.125	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.050	0.025
Железо:			
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
Na ₂ · ЭДТА	37.3	37.3	37.3
Витамины и органические вещества:			
Мезоинозит	100	500	100
Тиамин	0.1	0.1	0.1
Глицин	2.0	—	—
Пиридоксин	0.5	0.5	0.5
Никотиновая кислота	0.5	0.5	0.5
Глутамин	500	500	500
Гидролизат казеин	1000	1000	1000
pH	5.8	5.8	5.8

стерилизовали фильтрованием и добавляли в охлажденную питательную среду после автоклавирования.

Прорастание соматических зародышей. Для прорастания соматических зародышей листовницы использовали базовую питательную среду MSGm свободную от растительных регуляторов роста, дополненную активированным углем (1 г/л). Соматические зародыши считали проросшими, как только наблюдалось появление корешка. Полученные растения-регенеранты помещали в увлажненную эпокочву (песок : вермикулит : торф = 1 : 1 : 1).

Цитологический анализ. Для проведения цитологического анализа использовали давленные препараты. Для приготовления давленных препаратов экспланты помещали на предметное стек-

ло и 1–2 мин выдерживали в красителе (сафранин с добавлением метиленового синего). Далее добавляли глицерин, и накрывали препарат покровным стеклом.

Просмотр микроскопических образцов осуществляли на микроскопе МБИ-6. Замеры клеток и эмбриональных структур проводили при помощи окуляр-микрометра с последующим переводом полученных единиц в мкм. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам при помощи Microsoft Excel. Для оценки достоверности полученных данных использовался однофакторный дисперсионный анализ. Морфологические изменения фиксировались цифровой камерой Fujifilm FinePix S7000 (Япония).

Таблица 2. Созревание соматических зародышей лиственницы Сукачева на питательной среде MSGm

Вариант среды	АБК, мг/л	ПЭГ, %	Сахароза, г/л	Gelrite, г/л	ИМК, мг/л	Зрелые соматические зародыши, шт./500 мг ЭМ
1	16	5	40	4	0.2	0
2	16	7.5	40	4	0.2	0
3	16	10	40	4	0.2	1
4	24	5	40	4	0.2	0
5	24	7.5	40	4	0.2	0
6	24	10	40	4	0.2	2
7	32	5	40	4	0.2	0
8	32	7.5	40	4	0.2	4
9	32	10	40	4	0.2	30 ± 3.6
10	32	0	60	8	0.2	0
11	16	10	40	4	0	1
12	16	0	60	7	0	0

РЕЗУЛЬТАТЫ

Индукция каллуса

Формирование каллуса у видов лиственницы, произрастающих на территории Сибири, зависело от стадии развития экспланта при введении его в культуру *in vitro*. Наилучший отклик был получен на стадии инициации семядолей (III стадия развития). На индукцию каллусообразования большое влияние оказал состав питательной среды. Более активная стимуляция образования каллуса наблюдалась при использовании среды MSGm (рис. 1). При этом образование каллуса у лиственницы Сукачева происходило на всех используемых питательных средах с высоким процентом отклика эксплантов — 98%, у лиственницы сибирской 53–93%, у лиственницы Гмелина 50–81%.

Морфологические наблюдения за формированием каллуса показали, что его индукция происходила на 8–14-е сутки культивирования. Образование каллуса шло по всей поверхности экспланта или было сосредоточено в области между корешком и гипокотилем. Каллус имел белый цвет и рыхлую или либо твердую структуру.

Пролиферация эмбриональной массы (ЭМ). Образование эмбриональной массы в каллусе происходило на 25–35 сутки культивирования у всех видов лиственницы на среде MSGm с уменьшенным содержанием цитокининов (БАП 0.5 мг/л). Однако, через три-пять месяцев культивирования развитие каллуса останавливалось и дальнейшее формирование эмбриональной массы шло только у лиственницы Сукачева на среде MSGm в 18% случаев (неокрашенный столбик, рис. 1B).

Высокая пролиферационная активность ЭМ была отмечена у генотипа С_{нп1} лиственницы Сука-

чева, у которого было получено пять клеточных линий — четыре в результате свободного опыления, а пятая в результате контролируемого опыления с лиственницей сибирской. Ниже приводим описание клеточных линий:

клеточная линия 1 (08-03-00-01) — получена в 2008 году на среде MSGm; экспланты от свободного опыления лиственницы Сукачева (С_{нп1});

клеточные линии 2 (09-03-00-02), 3 (09-03-00-03) и 4 (09-03-00-04) — получены в 2009 году на среде MSGm; экспланты от свободного опыления лиственницы Сукачева (С_{нп1});

клеточная линия 5 получена в 2009 г. на среде MSGm; экспланты от опыления лиственницы Сукачева пыльцой лиственницы сибирской.

Полученные в результате индукции клеточные линии лиственницы Сукачева отличались между собой по пролиферационной активности, а также по количеству незрелых соматических зародышей внутри эмбриональной массы. Рост эмбриональной массы был отмечен через 2 недели культивирования на пролиферационной среде в конце пассажа (рис. 2A). За шесть недель культивирования суммарный вес ЭМ от одного экспланта у разных клеточных линий лиственницы Сукачева составил от 24 до 80 г, а у лиственницы Гмелина только 0.316 ± 0.05 г; у лиственницы сибирской 0.467 ± 0.06 г, (данные не приведены). За 10 недель культивирования вес эмбриональной массы у клеточной линии 5 (гибрид лиственницы Сукачева и лиственницы сибирской) составил 570 г (на рис. 2A), у клеточных линий 1–4 он составил меньшую величину — 130–300 г. Спада пролиферационной активности ЭМ у клеточных линий лиственницы Сукачева в течение двух-

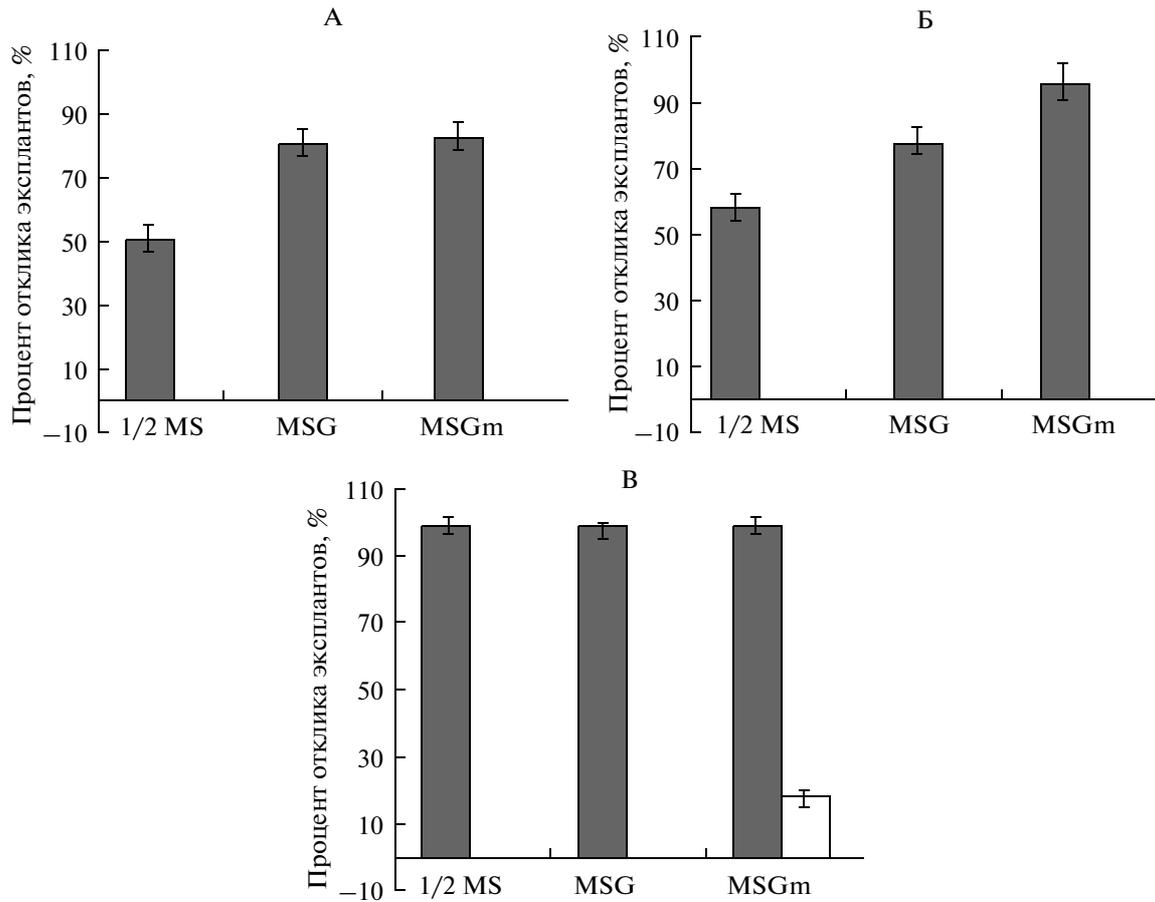


Рис. 1. Индукция каллуса и пролиферация эмбриональной массы у лиственницы Гмелина (А), лиственницы сибирской (Б) и лиственницы Сукачева (В) в зависимости от состава питательной среды (2 мес. культивирования). Неокрашенный столбик – уровень пролиферации для лиственницы Сукачева.

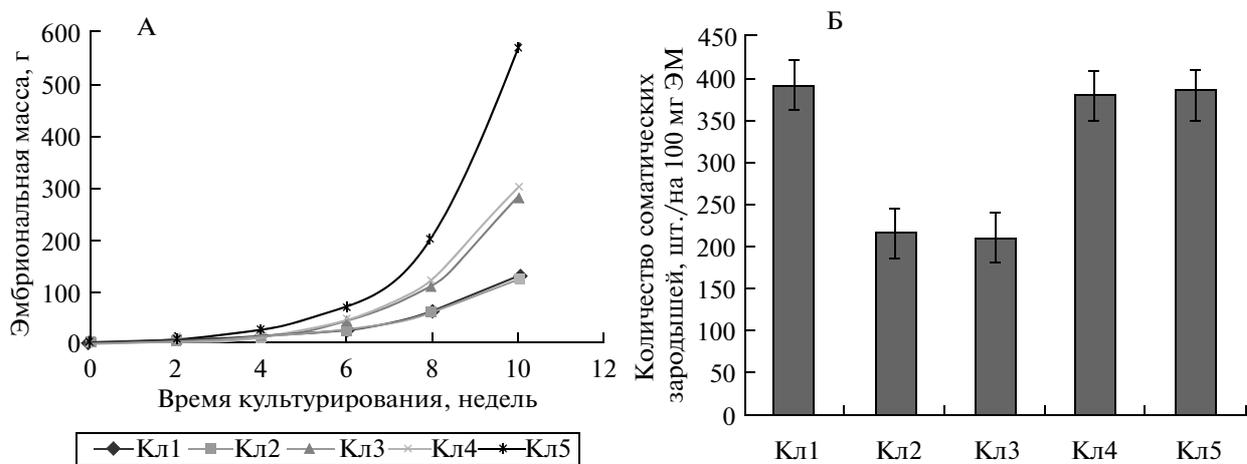


Рис. 2. Пролiferация эмбриональной массы лиственницы Сукачева (А) и число соматических зародышей в 500 мг пролиферирующей ЭМ (Б) у разных клеточных линий (Кл) лиственницы Сукачева.

трех лет культивирования не происходило. Опыты продолжаются.

Число соматических зародышей в пролиферирующей ЭМ у лиственницы Сукачева варьировало от 210 шт. в 100 мг ЭМ (Кл3) до 390 шт. в 100 мг ЭМ (Кл1) (рис. 2Б). Количество соматических зародышей в эмбриональной массе у лиственницы сибирской было значительно ниже (в 4–5 раз; 75 ± 5.6 г), чем у лиственницы Сукачева что совпадает с предыдущими исследованиями данного вида (Белорусова, Третьякова, 2008). Для лиственницы Гмелина этот показатель оказался ниже в 185 раз (1.6 ± 0.6 г).

Цитоэмбриологический контроль соматического эмбриогенеза

Цитоэмбриологический контроль соматического эмбриогенеза показал, что формирование ЭМ, у всех исследуемых видов лиственницы идет одинаково и начинается с удлинения клеток экспланта и их неравного деления, аналогично описанному для лиственницы сибирской (Белорусова, Третьякова, 2008; Третьякова и др., 2007). Именно неравное деление клеток является ключевым моментом, запускающим весь процесс соматического эмбриогенеза. В результате, происходит образование эмбриональных трубок с прилегающей на другом конце эмбриональной инициальной. Подобно зиготическому эмбриогенезу, эмбриональная инициальная претерпевала последовательные деления в обеих плоскостях, в результате чего происходило формирование 8-клеточной и затем 16-клеточной структуры зародыша. Такой зародыш состоит из эмбриональных (меристематических клеток округлой формы) и суспензорных (сильно вытянутых) клеток. Через 30–40 дней в ЭМ каллусов исследуемых видов лиственницы Гмелина, лиственницы сибирской и лиственницы Сукачева обнаруживались соматические зародыши на ранних стадиях эмбрионального развития (глобулярные зародыши) (рис. 3А–Г). Торпедообразные соматические зародыши (следующая стадия развития) были получены только у лиственницы Сукачева на среде MSGm (рис. 3 Д, Е).

Созревание соматических зародышей

Введение каллусов с ЭМ лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина на питательные среды для созревания соматических зародышей не привело к формированию зрелых зародышей. Использование среды с небольшой концентрацией

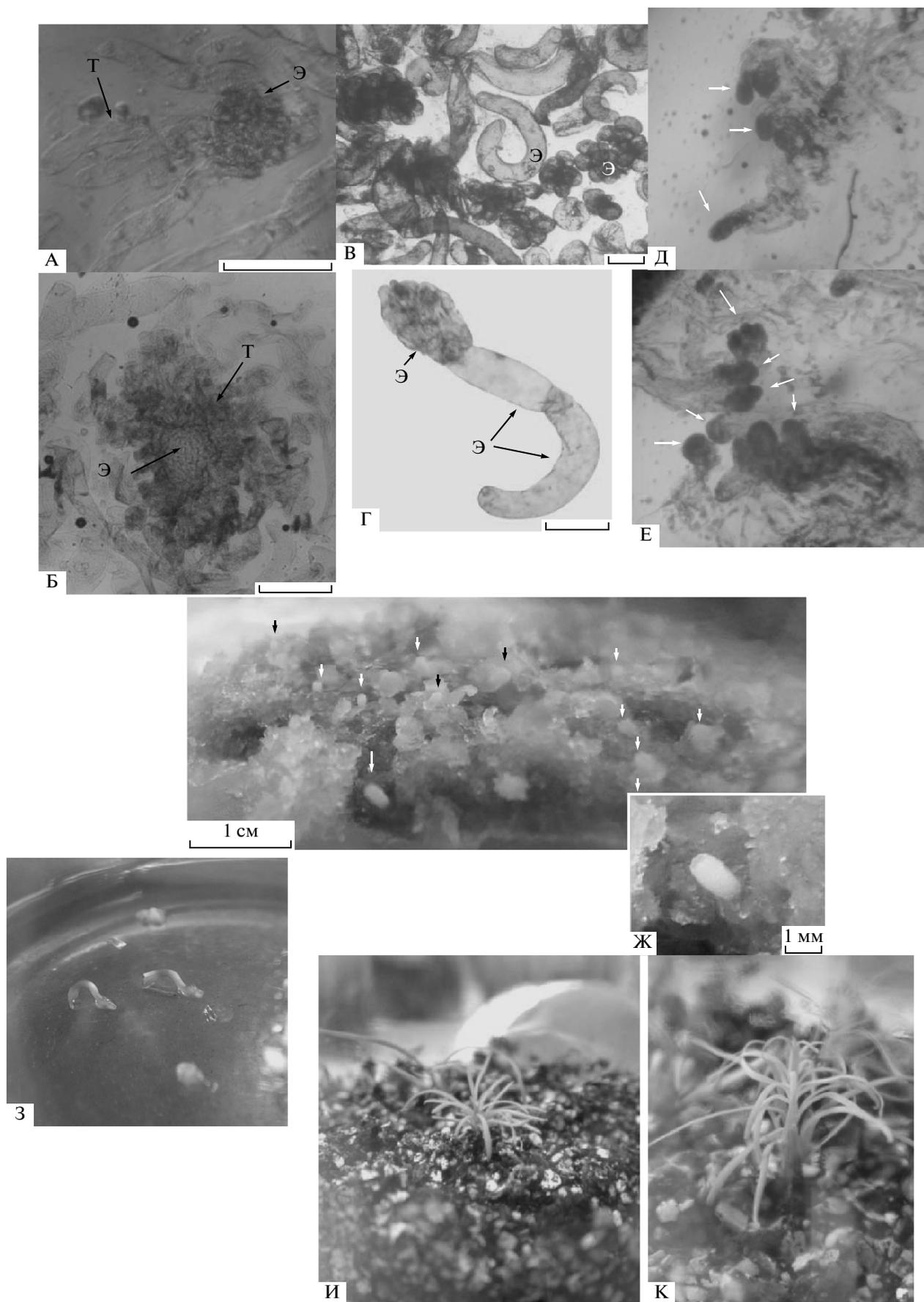
АБК (5.3 мг/л), способствовало потере эмбриогенной активности и каллусы приобретали зеленую окраску. На питательных средах с более высокими концентрациями АБК (15–24 мг/л), созревания соматических зародышей так же не происходило. Каллусы через две недели культивирования имели коричневую окраску, соматические зародыши внутри ЭМ распались на отдельные клетки.

Таким образом, формирования зрелых соматических зародышей, способных к развитию растений у лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина на используемых средах, рекомендуемых зарубежными авторами для созревания соматических зародышей лиственницы европейской и ее гибридов (Lelu-Walter et al., 2006, 2008), не происходило.

Созревание соматических зародышей лиственницы Сукачева проводили на среде MSGm с использованием различных концентраций АБК, ПЭГ, Gelrite и сахарозы. При этом на среде, содержащей АБК (24 мг/л), повышенное содержание сахарозы (60 г/л) и желирующего агента (7 г/л Gelrite), развитие соматических зародышей не происходило (табл. 2). Наблюдалось иссушение ЭМ, соматические зародыши не переходили к созреванию и погибали. Применение в качестве осмотического агента ПЭГ, оказалось более продуктивным. Однако низкие его концентрации (5–7.5%) все же были мало пригодными для достижения созревания соматических зародышей, в этом случае наблюдались обводнение и деградация ЭМ, соматические зародыши распались на отдельные клетки.

Оптимальной для развития соматических зародышей оказалась среда, содержащая 32 мг/л АБК, 10% ПЭГ, 40 г/л сахарозы и 4 г/л Gelrite (табл. 2). На данной среде уже через три-четыре недели культивирования происходило формирование семядольных соматических зародышей. Эмбриональная масса к этому времени уже состояла из глобулярных зародышей, а также зародышей на стадии торпедо, длина которых достигала 400 мкм (рис. 3Д, Е). Через две недели культивирования соматические зародыши увеличивались в размерах. Длина их составила 0.7, ширина 0.4 мм. Происходили закладка и формирование семядольного кольца. На 50 сутки культивирования на среде для созревания соматические зародыши достигали размера 1.1–1.5 мм, имели хорошо выраженную биполярную структуру тела зародыша и полностью сформированные семядоли.

Рис. 3. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у видов лиственниц, произрастающих в Сибири: А, Б – эмбриональные глобулы и эмбриональные трубки у лиственницы Гмелина; В, Г – эмбриональные глобулы и эмбриональные трубки лиственницы сибирской; Д, Е – торпедообразные соматические зародыши лиственницы Сукачева; Ж – вызревание соматических зародышей лиственницы Сукачева; З – прорастание соматических зародышей лиственницы Сукачева; И, К – соматические проростки лиственницы Сукачева в почвенной культуре.



Для перехода соматических зародышей клеточных линий лиственницы Сукачева к созреванию использовали предобработку ЭМ в жидкой питательной среде. После такой обработки даже спустя 14–30 месяцев активной пролиферации у Кл1 удалось получить зрелые соматические зародыши. При данной технологии также происходило более массовое формирование зрелых соматических зародышей. Созревание соматических зародышей клеточных линий лиственницы Сукачева проходило в течении 40–60 дней.

Проращение соматических зародышей

Соматические зародыши с хорошо развитыми семядолями переносили на среду для проращения (MSGm базового состава, без растительных регуляторов роста, с добавлением активированного угля (10 мг/л)). Через 7–10 дней культивирования происходило удлинение гипокотилия и развитие семядолей (рис. 33). Еще через несколько дней наблюдалось развитие корешка (на свету гипокотиль и корешок приобретали красный оттенок). Однако в 90% случаев нормального развития растений не происходило — гипокотиль изгибался или утолщался, а вместо корня формировался каллус. Такие регенеранты были нежизнеспособными и погибали.

Снижение концентрации макро-, микроэлементов и железа (в два раза), а также исключение источников органического азота и витаминов из среды положительно сказывались на проращении соматических зародышей — в 70% происходило нормальное развитие соматических зародышей в проростки. На пятые–седьмые сутки культивирования отмечены удлинение гипокотилия и появление корешка. Появление эпикотилия происходило через две–три недели культивирования на среде для проращения. Соматические зародыши с хорошо развитым корешком и эпикотилем мы считали полноценными растениями и переносили в экопочву (рис. 3И, К).

Таким образом, впервые были получены четыре клеточные эмбриогенные линии лиственницы Сукачева и одна клеточная линия гибрида лиственницы Сукачева и лиственницы сибирской, способные продуцировать массовые соматические зародыши и растения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Образование эмбриогенного каллуса и развитие соматических зародышей у видов лиственницы в основном идет по схеме, описанной для других видов хвойных (von Arnold, Hakman, 1988; Lelu et al., 1994; Klimaszewska et al., 2001; Stasolla, Yeung, 2003; Lelu-Walter, Pagues, 2009). Соматические зародыши проходят фазу инициации, пролиферации, созревания и проращения.

Необходимым условием для запуска соматического эмбриогенеза видов лиственницы, также как и у других видов хвойных, является растяжение соматических клеток зиготического зародыша и их асимметричное деление, которое идет под действием ауксина (2,4-Д) и цитокинина (6 БАП) (von Arnold, Hakman, 1988; Stasolla et al., 2003; Белорусова, Третьякова, 2008). Точно такое же асимметричное деление лежит в основе зиготического эмбриогенеза всех видов растений (Батыгина, 1999). Асимметричное деление заложено уже в первом делении зиготы, которое приводит к образованию двух неравных клеток: маленькой терминальной, которая дает начало зародышу и большой базальной клетке, дающей начало гипофизу и суспензору. При этом полярность, заложенная в зиготе, в результате ее деления поддерживается и передается дочерним клеткам. Таким образом, асимметричное деление и полярность являются, по-видимому, одними из основных критериев, определяющих переход клеток на путь эмбриогенеза: соматического или зиготического.

При зиготическом эмбриогенезе первое и, следом за ним идущее, второе деление зиготы происходят в центре архегония с образованием четырех одинаковых свободных ядер проэмбрио, которые двигаются к основанию архегония, где формируются шестнадцатиклеточное проэмбрио, состоящее из одинаковых клеток, расположенных в четыре этажа (по четыре клетки в каждом). Через 7–10 дней после оплодотворения четыре клетки предпоследнего ряда начинают интенсивно растягиваться до 200–300 мкм и выталкивать клетки нижнего этажа в коррозионную полость женского гаметофита (эндосперма). Таким образом, формируется четыре первичных суспензора и четыре инициали эмбрио. Растяжение клеток суспензора идет с неодинаковой скоростью и инициальные клетки разобщаются. Происходит кливаж (Третьякова, 1990). Именно с данной стадии зиготического эмбриогенеза начинается соматический эмбриогенез, при котором выпадает стадия оплодотворения и образования проэмбрио.

При соматическом эмбриогенезе у лиственниц происходит растягивание соматических клеток зародыша по всей длине гипокотилия до 200–300 мкм и затем их асимметричное деление с образованием эмбриональных трубок — первичного суспензора и инициалей эмбрио (Белорусова, Третьякова, 2008). Процесс соматического эмбриогенеза, наблюдаемый нами у лиственницы Сукачева, идет однообразно, также как и у других видов хвойных: формируется глобула зародыша, затем образуется ось зародыша (стадия торпедо) — идет активный гистогенез тканей зародыша и его вызревание с последующим проращением (von Arnold, Hakman, 1988; Lelu et al., 1994; Klimaszewska et al., 2001; Stasolla, Yeung, 2003; Lelu-Walter, Pagues, 2009). Развитие соматических зародышей происходит внутри

эмбриональной массы, состоящей из зародышево-подобных структур и эмбриональных трубок, выполняющих функцию суспензора. Эмбриональная масса может пролиферировать длительный период времени (2 года и более) и подвергаться криоконсервации (Lelu-Walter et al., 2006), а также может быть использована в экспериментах, направленных на вызревание соматических зародышей. В эмбриональной массе ряд ученых выделяют несколько этапов развития глобулярных зародышей (РЕМ I, РЕМ II и РЕМ III), от завершения которых зависит важный этап соматического эмбриогенеза — созревание соматических зародышей (Filonova et al., 2000; Stasolla, Yeung, 2003; Lelu-Walter et al., 2008). Применительно к сибирским видам лиственниц было отмечено, что эмбриогенный каллус лиственницы Гмелина и лиственницы сибирской соответствовал начальным стадиям развития — РЕМ I и РЕМ II, перехода к стадии РЕМ III не происходило, в то время как для лиственницы Сукачева данный этап развития эмбриональной массы наблюдался.

Морфогенетическая программа развития зародыша регулируется фитогормонами. Запуск асимметричного деления идет под действием ауксина и цитокинина в определенных концентрациях и разном их соотношении друг с другом. При формировании глобулярных зародышей концентрация цитокининов уменьшается в 2 раза. Переход к стадии дифференциации и запрограммированной клеточной смерти суспензора идет на безгормональной среде (Filonova et al., 2000). Переход соматических зародышей хвойных в стадию созревания зависит от присутствия АБК в питательной среде, а также снижения осмотического потенциала питательной среды, которое обычно достигается путем повышения концентрации сахарозы или желирующего агента, или применением полиэтиленгликоля (Stasolla, Yeung, 2003; Stasolla et al., 2003). АБК играет большую роль в формировании биполярной структуры зиготического зародыша. У зиготических зародышей основным источником АБК являются мегагаметофиты (Kong et al., 1999). Поэтому, для созревания и роста соматических зародышей, АБК добавляется в питательную среду в определенной концентрации в зависимости от вида растения (Stasolla et al., 2002; Vales et al., 2006). Оптимальная концентрация АБК для европейских видов *Larix* 40–60 μM (Lelu-Walter et al., 2006), *Pinus* — 60–120 μM (Klimaszewska et al., 2001), *Picea* — 12–60 μM (Stasolla, Yeung, 2003). Для созревания соматических зародышей видов лиственницы, произрастающих на территории Сибири нами были использованы более высокие концентрации АБК (120 μM), что соответствует 32 мг/л.

Кроме того, важным моментом в созревании соматических зародышей является создание осмотического стресса. Выявлено, что с увеличением концентрации Gelrite (до 8 г/л) и сахарозы (до

60 г/л) количество соматических зародышей у видов сосны, ели и лиственницы и последующее их прорастание увеличивается (von Arnold, Hakman, 1988; Lelu et al., 1994, 2006; Klimaszewska et al., 2001; Lelu-Walter et al., 2006; Lelu-Walter, Paques, 2009). Однако, у лиственницы Сукачева с увеличением концентрации Gelrite и сахарозы происходило обезвоживание среды и гибель соматических зародышей. Положительное влияние на созревание соматических зародышей лиственницы Сукачева оказал полиэтиленгликоль. Ранее аналогичные результаты были получены у соматических зародышей *Picea glauca*, у которых применение ПЭГ в комбинации с АБК ускоряло процесс созревания зародышей, вызывая у них длительный водный стресс (Stasolla et al., 2002, 2003).

Хорошо известно, что генотип растения донора оказывает большое влияние на рост эмбриональной массы и образование соматических зародышей. Только определенные генотипы деревьев, обнаруженные у ряда видов хвойных, продуцировали соматические зародыши. Высокая частота индукции эмбриогенного каллуса (до 65%) была описана у гибрида *L. eurolepis* (Lelu-Walter, Paques, 2009), у которого почти все введенные в культуру экспланты (94%) формировали ЭМ. Под строгим генетическим контролем шла инициация эмбриогенного каллуса у *Picea glauca* (Stasolla, Yeung, 2003), *Pinus strobus* (Klimaszewska et al., 2001), *Pinus taeda* (MacKay et al., 2006; Vales et al., 2007), *Pinus sylvestris* (Niskanen et al., 2004), *Pinus pinea* (Carneros et al., 2009). Показано, что при контролируемом опылении наиболее перспективным является использование материнских деревьев доноров, экспланты которых способны формировать эмбриогенный каллус и соматические зародыши (MacKay et al., 2006). Часто отмечается также, что не все генотипы, активно формирующие эмбриональную массу, способны к пролиферации эмбриогенных культур и созреванию соматических зародышей. Так, из эксплантов генотипов, образующих каллусы с ЭМ, только в единичных случаях формируется активно пролиферирующая ЭМ (von Arnold, Hakman, 1988; Klimaszewska, Cyr, 2002; Stasolla, Yeung, 2003; Carneros et al., 2009).

В проведенных нами исследованиях способностью к формированию ЭМ обладали 3% генотипов лиственницы Сукачева. Влияние генотипа также наблюдалось при переходе к созреванию соматических зародышей. В наших экспериментах у полученных клеточных линий лиственницы Сукачева и ее гибрида с лиственницей сибирской соматические зародыши активно созревали, формируя полноценные растения. Таким образом, эмбриогенные культуры можно получить только с ограниченного числа деревьев.

Таким образом, в России нами впервые был получен соматический эмбриогенез у лиственницы

сибирской (Белоруссова, Третьякова, 2008) и пролиферирующие клеточные линии и растения-регенеранты у лиственницы Сукачева и ее гибрида с лиственницей сибирской. Процесс созревания соматических зародышей успешно шел у лиственницы Сукачева на среде MSGm дополненной АБК, ИМК, ПЭГ и Gelrite.

Работа выполнена при поддержке гранта: РФФИ (грант №11-04-00281) и интеграционным проектом № 53 "Генофонд хвойных..."

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 884–898.
- Белоруссова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 2. С. 1–10.
- Дылис Н.В. Лиственница сибирская. Материалы к систематике, географии и истории. М.: МОИП, 1947. 137 с.
- Ирошников А.И. Лиственницы России. Биоразнообразие и селекция. М.: ВНИИЛМ, 2004. 182 с.
- Милютин Л.И. Биоразнообразие лиственниц России // Хвойные бореальной зоны. 2003. Вып. 1. С. 6–9.
- Рождков А.С., Хлиманкова Е.С., Степанчук Е.С. Восстановительные процессы у хвойных при дефолиации. Новосибирск.: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 88 с.
- Тренин В.В. Цитоэмбриология лиственницы. Л.: Наука, 1986. 88 с.
- Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. Новосибирск: Наука, 1990. 157 с.
- Третьякова И.Н., Баранчиков Н., Буглова Л.В., Белоруссова А.С., Романова Л.И. Особенности формирования генеративных органов лиственницы сибирской и их морфогенетический потенциал // Успехи современной биологии 2006. Т. 126. № 5. С. 472–480.
- Becwar M.R., Nagmani R., Wann S.R. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) // Can. J. For. Res. 1990. V. 20. P. 810–817.
- Carneros E., Celestino C., Klimaszewska K., Park Y.-S., Toribio M., Bonga J.M. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2009. V. 98. P. 165–178.
- Chalupa W. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) // Karst. Com. Inst. For. Cech. 1985. V. 14. P. 57–63.
- Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) // Plant Sci. 1985. V. 38. P. 53–59.
- Filonova L.H., Bozhkov P.V., Brukhin V.B., Daniel G., Zhivotovsky B., von Arnold S. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce // Cell Sci. 2000. V. 113. P. 4399–4411.
- Klimaszewska K. Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis // Plant Sci. 1989. V. 63. P. 95–103.
- Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // Dendrobiology. 2002. V. 48. P. 31–39.
- Klimaszewska K., Park Y.S., Overton C., MacEacheron I., Bonga J.M. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. // In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2001. V. 37. P. 392–399.
- Kong L., Attree S.M., Evans D.E., Binarova P., Yeung E.C., Fowke L.C. Somatic embryogenesis in white spruce: studies of embryo development and cell biology // In: Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J., eds. Somatic embryogenesis in woody plants. V. 4. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1999. P. 1–28.
- Lelu M.A., Klimaszewska K., Charest P.J. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix* // Can. J. For. Res. 1994. V. 24. № 1. P. 100–106.
- Lelu-Walter M.-A., Bernier-Cardon M., Klimaszewska K. Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* // Plant Cell Rep. 2006. V. 25. P. 767–776.
- Lelu-Walter M.-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 2008. V. 92. P. 31–45.
- Lelu-Walter M.-A., Pâques L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinsii*). Perspectives for breeding // Ann. For. Sci. 2009. V. 66 P. 104–114.
- MacKay J.J., Becwar M.E., Park Y.-S., Corderro L.P., Pullman G.S. // Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding // Tree Genet. Genomes. 2006. V. 2. P. 1–9.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. № 4. P. 473–497.
- Niskanen A.-M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., Von Weissenberg K., Pappinen A. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*) // Tree Physiology. 2004. V. 24. P. 1259–1265.
- Park Y.S. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations // Ann. For. Sci. 2002. V. 59. P. 651–656.
- Park Y.S., Lelu-Walter M.A., Harvengt L., Trontin J.F., MacEacheron I., Klimaszewska K., Bonga J.M. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 2006. V. 86. P. 87–101.
- Stasolla C., Kong L., Yeung E.C., Thorpe T.A. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2002. V. 38. P. 93–105.

- Stasolla C., Yeung E.C.* Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 2003. V. 74. P. 15–35.
- Stasolla C., van Zyl L., Egertsdotter D.W., Sederoff R.* The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos // *Plant physiology.* 2003. V. 131. P. 49–60.
- Vales T., Feng X., Ge L., Xu N., Cairney J., Pullman G., Peter G.* Improved somatic embryo maturation in loblolly pine by monitoring ABA-responsive gene expression // *Plant Cell Rep.* 2007. V. 26. P. 133–143.
- Von Arnold S., Hakman I.* Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA) // *Plant Physiol.* 1988. V. 132. P. 164–169.

Somatic Embryogenesis in *in vitro* Culture of Three Larch Species

I. N. Tret'yakova and A. V. Barsukova

Sukachev Institute of Forestry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia
e-mail: culture@ksc.krasn.ru

Abstract—Embryogenic callus formation in different larch species from Siberia (*Larix sibirica*, *L. gmelinii*, and *L. sukaczewii*) was carried out on MSGm medium supplemented with growth regulators (2,4-D and BAP) and followed one and the same scheme: elongation of somatic cells and their asymmetric division with formation of initial and tube cells. The cells of embryo initial underwent sequential divisions and formed embryonic globules which caused the formation of somatic embryos. Somatic embryos became mature and germinated by addition of ABA and PEG into the medium. Long-term proliferating cell lines and regenerant plants were obtained in Sukachev larch and its hybrid with Siberian larch. The success of somatic embryogenesis depended on the genotype of the donor tree.

Keywords: somatic embryogenesis, *in vitro* culture, Siberian larch, Dahurian larch, Sukachev larch.

МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

УДК 591

АПОПТОЗ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В ПРЕЗУМПТИВНОЙ НЕЙРАЛЬНОЙ СЕТЧАТКЕ И ПРЕЗУМПТИВНОМ ПИГМЕНТНОМ ЭПИТЕЛИИ СЕТЧАТКИ В РАННЕМ РАЗВИТИИ ГЛАЗА У ЖАБЫ *Bufo raddei* STRAUCH

© 2012 г. В. Хан*, И.-П. Хан**, З.-Р. Ванг*

*Институт биологии развития, Факультет наук о жизни, Университете Ланжоу,
Ланжоу 730000, Китайская Народная Республика

** Колледж Наук о жизни и Технологии, Университет Лангдонг,
Кингуанг 734000, Китайская Народная Республика

E-mail: wangzr@lzu.edu.cn

Поступила в редакцию 29.03.11 г.

Окончательный вариант получен 18.10.11 г.

Проведено изучение апоптоза и дифференцировки в презумптивной нейральной сетчатке (ПНС) и презумптивном пигментном эпителии сетчатки (ППЭС) у жабы *Bufo raddei* Strauch. Окраска TUNEL была использована для оценки апоптозных клеток и иммуногистохимия для оценки уровня экспрессии глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), RT97 и тирозиназы (Tyr) в раннем развитии глаза. Плотность апоптозных клеток и уровень экспрессии белка были оценены количественно с помощью программы Image-Pro Plus 6.0. Апоптоз был обнаружен и в ПНС, и в ППЭС, а плотность апоптозных клеток в ППЭС была выше, чем в ПНС ($P < 0.01$) на одной и той же стадии развития глаза. Уровень экспрессии GFAP и RT97 увеличивался в ПНС, но уменьшался в ППЭС, тогда как уровень экспрессии Tyr менялся в противоположном направлении и в ПНС, и в ППЭС. Точка пересечения была зарегистрирована через 5–6 ч после образования глазного пузырька. ППЭС становится тоньше, чем ПНС, возможно, благодаря более высокому уровню апоптоза в ППЭС. Молекулярная дифференцировка наблюдалась после контакта наружной стенки глазного пузырька с вышележащей эктодермой, запускающего экспрессию специфических молекул и подавляющего экспрессию неспецифических молекул в ПНС и ППЭС.

Ключевые слова: презумптивная нейральная сетчатка, презумптивный пигментный эпителий сетчатки, апоптоз, дифференцировка, иммунохимия.

ВВЕДЕНИЕ

Сетчатка глаза позвоночных животных берет свое начало от глазных пузырьков, которые возникают в виде двух выпячиваний боковой стенки переднего мозга до его разделения на конечный и промежуточный мозг в ходе зародышевого развития. Глазные пузырьки выпячиваются наружу, достигая эпидермиса и вступая в контакт с его внутренней поверхностью. Затем наружная поверхность глазного пузырька уплощается и вворачивается, образуя двухслойную глазную чашу. Внутренняя стенка глазной чаши гораздо толще наружной стенки, она развивается в нейральную сетчатку. Клетки наружной стенки продуцируют пигмент и развиваются в пигментный эпителий сетчатки (Lopashov, Stroeve, 1961, 1964; Lopashov, 1963; Jacobson, 1966; Hyer et al., 1998; Gilbert, 2003; Francisco-Morcillo et al., 2006).

При изучении механизмов дифференцировки глазной чаши возникает вопрос, почему внутрен-

няя и наружная стенки глазной чаши, которые имеют одинаковое происхождение, дифференцируются, соответственно, в нейральную и пигментную сетчатку. Есть два аспекта дифференцировки глазного пузырька – морфологический и молекулярный, или функциональный.

Морфологическую дифференцировку глазного пузырька описывали и изучали в течение длительного времени (Lopashov, Stroeve, 1961, 1964; Lopashov 1963; Jacobson, 1966; Feng et al., 1984; Martín-Partido et al., 1988; Li, Sakaguchi, 2002; Adler, Canto-Soler, 2007). Описываемые изменения объясняли как результат миграции некоторых клеток из ПНС в ППЭС в ходе раннего развития (ссылки) или как результат пролиферации клеток ПНС (Martín-Partido et al., 1988; Cuadros et al., 1991; Lee et al., 2001). До сих пор нет сведений о различиях в уровне апоптоза между ПНС и ППЭС.

Что касается молекулярной или функциональной дифференцировки, исследования касались

различных молекул (Lee et al., 2001; Canto-Soler, Adler, 2006; Adler, Canto-Soler, 2007), однако эти молекулы экспрессировались большей частью до образования глазного пузырька или на поздних стадиях развития глаза (Barnstable, 1987; Harris, Perron, 1998; Zhang et al., 2002). Было общепринято, что молекулярная дифференцировка связана с развитием глаза. Используемые в этих исследованиях белки (GFAP, RT97 и Tug) экспрессируются в раннем развитии глаза и участвуют в клеточной дифференцировке глазного зачатка (Holt, 1989; Kumasaka et al., 2003; Shin et al., 2003). Однако до сих пор нет сведений об экспрессии разных белков в ПНС и ППЭС в ходе раннего развития глаза. В настоящем исследовании окраска TUNEL была использована для выявления различий в уровне апоптоза и иммуногистохимия для изучения экспрессии разных белков в ПНС и ППЭС в ходе раннего развития глаза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Жабы *Bufo raddei* Strauch являются преобладающим видом амфибий на северо-западе Китая. Оплодотворенные яйца жаб собирали в лужах в окрестностях Ланжоу или получали путем искусственного оплодотворения в лаборатории. Зародыши на стадии развития 16–17 (Ge et al., 1982) собирали каждый час и фиксировали в 4% формалине в 0.1 М фосфатном буфере (PBS, рН 7.4) в течение 12–18 ч при 4°C. Затем их обезвоживали в спиртах и просветляли в ксилоле, после чего их заключали в парафин для приготовления срезов.

Плотность клеток на единицу площади. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином и изучали под микроскопом Motic B5 с помощью программы Motic Images Advanced 3.0. Срезы рассматривали с помощью программы Photoshop CS3 (10.0), и на той же площади подсчитывали число клеток при одном и том же увеличении в дорсальной, вентральной и центральной областях ПНС и ППЭС, соответственно, через 2, 4, 6, и 8 ч после образования глазного пузырька. Плотность клеток = число клеток/единица площади.

Окрашивание TUNEL. Разрушенную ДНК в клетках выявляли с помощью окрашивания TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling) (Nanjing KeyGen Biotech. Co. Ltd., China) после облучения в микроволновой печи с раствором цитратного буфера. Срезы промывали 0.1 М PBS, а затем блокировали 3% hydrogen peroxidase-carbinol. После этого срезы инкубировали в 50 мкл буфере, содержащем TDT (terminal deoxynucleotidyl transferase) с Biotin-11-dUTP

при 37°C в течение 1 ч. После промывания в 0.1 М PBS срезы инкубировали в streptavidin-HRP буфере при 37°C в течение 30 мин. Затем срезы снова промывали 0.1 М PBS и визуализировали с помощью диаминобензидина (DAB), еще раз промывали 0.1 М PBS и окрашивали гематоксилином. После проведения в спиртах срезы заключали в нейтральный бальзам и изучали под микроскопом Motic B5. Фотографии срезов собирали с помощью Motic Images Advanced 3.0. В качестве отрицательного контроля использовали 0.1 М PBS для смещения фермента TDT.

Иммуногистохимия. Срезы зародышей и взрослой сетчатки обрабатывали 1 мМ ЭДТА (рН 8.0) в микроволновой печи для восстановления антигена и повторно промывали PBS. Затем срезы последовательно обрабатывали 0.3% перекиси водорода при 37°C в течение 30 мин и в 10% нормальной сыроворотки овцы при 37°C в течение 30 мин.

Срезы обрабатывали различными антителами: антимышиными моноклональными против GFAP (разведение 1 : 800; Thermo, USA), антимышиными моноклональными против RT97 (1 : 800; Chemicon, USA) и антимышиными моноклональными против Tug (1 : 700; Thermo). Затем срезы инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение ночи. После споласкивания в 0.1 М PBS срезы инкубировали с теми же вторичными антителами (овечьи антимышиные IgG) из двухэтапного иммуногистохимического набора (Beijing Zhongshan Golden Bridge Biotechnology Co. Ltd., China) при 37°C в течение 30 мин. Срезы снова промывали 0.1 М PBS, визуализировали с помощью DAB, трижды промывали 0.1 М PBS, окрашивали гематоксилином, обезвоживали в серии спиртов и просветляли в ксилоле. Затем срезы заключали в нейтральный бальзам и изучали под микроскопом Motic Images Advanced 3.0. В качестве отрицательного контроля использовали 0.1 М PBS для смещения первичных антител.

Для выявления специфичности антител у жабы использовали взрослую сетчатку.

Компьютерный анализ изображений на интенсивность окрашивания. Фотографии с окрашиванием TUNEL и на иммуногистохимию получали под микроскопом Image 3.0 при увеличении 400×. По крайней мере, десять образцов полученных от десяти различных зародышей рассматривали как одну группу. TUNEL-положительные ядра и иммуногистохимические данные о белках на срезах количественно обрабатывали с помощью программы Image-Pro 6.0. Область интереса (AOI) была создана и оптическая плотность была измерена. Участки с положительной экспрессией, визуализиро-

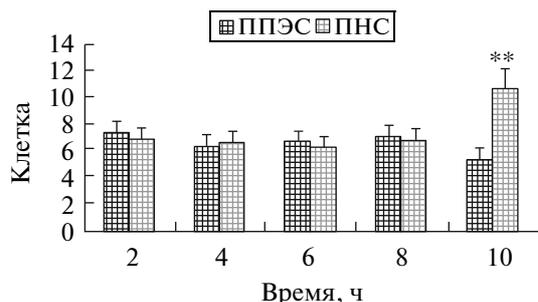


Рис. 1. Плотность клеток в ПНС и ППЭС глазного пузырька в раннем морфогенезе глаза.

Данные показывают плотность клеток в ПНС и ППЭС через 2, 4, 6, 8 и 10 ч соответственно, после образования глазного пузырька ($n = 10$). ** $P < 0.01$ считали статистически значимым при сравнении плотности клеток в ПНС и ППЭС на одной и той же стадии развития.

ванные с помощью DAB, были выбраны как АОI. После установления АОI в полученных фотографиях все пиксели в АОI были выбраны и интегральная оптическая плотность (IOD) была измерена соответственно в ПНС и ППЭС (Xavier et al., 2005; Sharma et al., 2006). Значения IOD показывают плотность апоптозных клеток и количественную экспрессию белков.

Анализ данных. Результаты были выражены как среднее \pm стандартная ошибка (SD) и оценены в соответствии с критерием Стьюдента. Значения $P < 0.05$ рассматривали как статистически значимые между группами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Плотность клеток в развивающихся ППЭС и ПНС. Плотность клеток в ППЭС и ПНС различалась, но эта разница не была статистически значимой до 10 ч после формирования глазного пузырька, когда плотность клеток в ПНС была значительно выше, чем в ППЭС ($p < 0.01$; рис. 1).

Апоптоз в развивающихся ППЭС и ПНС. Фрагменты разрушенной ДНК выглядели как коричневые скопления в TUNEL-положительных участках, которые располагались в основном около стенки мозга и внутренней поверхности глазного пузырька (рис. 2). На стадии 16 плотность апоптозных клеток в ППЭС и ПНС достигла максимума и постепенно снижалась в ходе развития глаза.

Сравнивая плотность апоптозных клеток в ПНС и ППЭС, мы обнаружили, что в ПНС она была ниже, чем в ППЭС на одной и той же стадии развития ($p < 0.01$; рис. 2E). Апоптоз проходил в основном в ППЭС, а не в ПНС.

Экспрессия GFAP, RT97 и Туг в сетчатке взрослой жабы. Экспрессия GFAP наблюдалась в боль-

шинстве участков сетчатки, кроме пигментного эпителия, потому что там располагаются глиальные клетки и их отростки (рис. 3A). Экспрессия RT97 наблюдалась в основном в наружном и внутреннем сетчатых слоях, наружном и внутреннем ядерных слоях и ганглиозном клеточном слое и, в незначительной степени, в слое нервных волокон (рис. 3B). Экспрессия Туг наблюдалась в основном в пигментном эпителии и в слое фоторецепторных сегментов, где располагались отростки пигментных клеток (рис. 3C).

Распределение GFAP и RT97 в развивающихся ППЭС и ПНС. Участки экспрессии GFAP окрашены коричневым цветом (рис. 4A, B и C). В начале исследуемого периода уровень экспрессии GFAP был минимальным, затем он постепенно возрастал и достигал максимума в ПНС в конце исследуемого периода (рис. 4D).

Уровень экспрессии RT97 был сходен с уровнем экспрессии GFAP соответственно в ПНС и ППЭС (рис. 5).

Распределение Туг в развивающихся ППЭС и ПНС. Уровень экспрессии Туг был минимальным в начале исследуемого периода (рис. 6A), затем он постепенно возрастал (рис. 6B и C) и достигал максимума в ППЭС в конце исследуемого периода (рис. 6D). Напротив, уровень экспрессии Туг в ПНС постепенно уменьшался (рис. 6D).

ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с принципами классической эмбриологии, ключевым событием является контакт глазного пузырька с головной эктодермой. Часть глазного пузырька, вступившая в контакт с головной эктодермой, инвагинирует и становится внутренним слоем глазной чаши – ПНС, а остальная его часть становится наружным слоем внутренней чаши – ППЭС. В конечном счете, ПНС формирует многослойную структуру, а ППЭС становится однослойной плоской структурой. Исходя из формы клеток, можно допустить, что некоторые клетки мигрируют из ППЭС в ПНС на ранних стадиях развития глаза (Martin-Partido et al., 1988; Cuadros et al., 1991; Lee et al., 2001), а клетки ПНС быстро пролиферируют в ходе развития сетчатки (Li et al., 2000; Gilbert, 2003; Canto-Soler, Adler, 2006). Мы обнаружили более высокую плотность апоптозных клеток в ППЭС по сравнению с ПНС на одной и той же стадии, и их плотность постепенно снижалась в ходе раннего развития глаза. Однако сходная плотность в ППЭС и ПНС сменялась статистически более высокой плотностью в ПНС по сравнению с ППЭС. И, в конечном счете, она падала в ППЭС, но возросла в ПНС в ходе

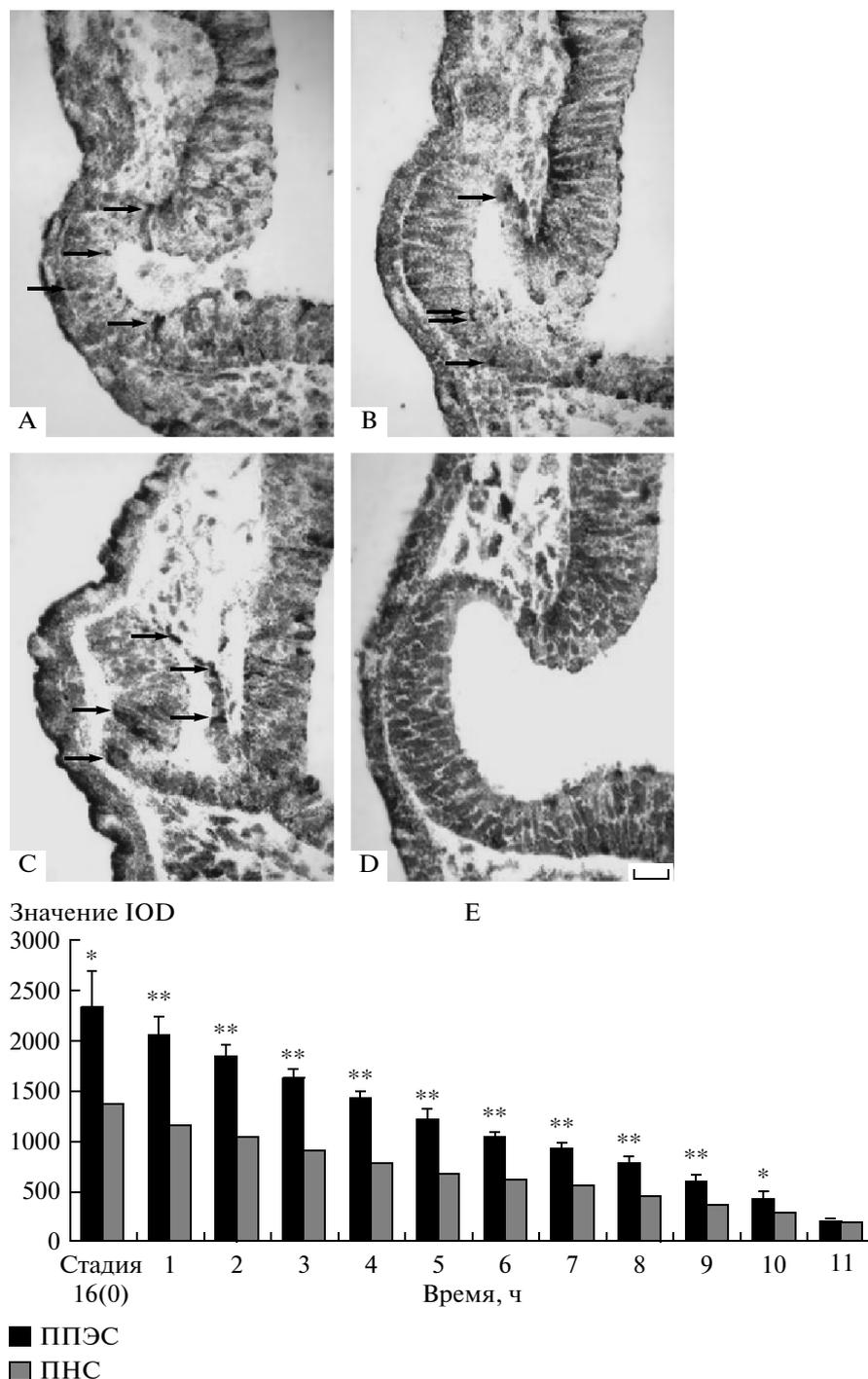


Рис. 2. Апоптоз в ППЭС и ПНС глазного пузыря в раннем морфогенезе глаза.

На фотографиях видны апоптотические тельца (показаны стрелками) через 1 (А), 5 (В) и 11 (С) ч после образования глазного пузыря. (D) Отрицательный контроль. (E) Данные представлены как средняя ± стандартная ошибка ($n = 10$) в каждой группе. * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ считали статистически значимыми при сравнении интегральной оптической плотности в ПНС и ППЭС на одной и той же стадии развития.

морфогенеза глаза. Сравнивая характер изменений плотности апоптотических клеток с нормальной плотностью клеток в ППЭС и ПНС на ранних стадиях развития глаза, мы обнаруживаем, что кле-

точная пролиферация происходит и в ППЭС, и в ПНС, но характер изменения плотности апоптотических клеток более выражен, чем изменения нормальной плотности клеток. Поэтому апоптоз мог

бы быть одной из движущих сил наблюдаемой морфологической дифференцировки, особенно в ходе раннего развития глаза.

Мы обнаружили также, что плотность апоптозных клеток была максимальной на ранних стадиях развития сетчатки, но постепенно снижалась в ходе дальнейшего развития (рис. 2). Сходный характер изменений наблюдался и в ходе развития куриного зародыша (Martin-Partido et al., 1988), черепахи (Francisco-Morcillo, Hidalgo-Sanchez, 2004) и мыши (Rodriguez-Gallardo et al., 2005).

Известно, что сетчатка позвоночных представляет собой структуру, состоящую из десяти слоев и трех типов клеток — нейронов, глиальных и пигментных клеток (Dowing, 1987); и после формирования глазного пузырька одиночная клетка-предшественник нейробласта сетчатки может мигрировать и дать начало нейронам и глиальным клеткам (Turner, Soroko, 1987). Антитела против GFAP обычно считают маркером глиальных клеток (главным образом, астроцитов и немиэлинизированных шванновских клеток) и они экспрессируются в начале дифференцировки глиальных клеток (Bignami et al., 1972; Eng, 1982; Schnitzer, 1985). Известно, что антитела RT97 являются маркером нейронов и специфичны для крупных и средних субъединиц нейрофиламентов в нейронах, и поскольку RT97 является главным компонентом нейрального отростка, например аксонов и дендритов, он экспрессируется несколько позже (Ezeonu et al., 1999; Velasco et al., 2000; Shin et al., 2003). Тут и связанные с ним белки задействованы в биосинтезе пигментных клеток (Newton et al., 2001), и антитела против Тут являются маркером пигментных клеток (Basu et al., 1983; Kumasaka et al., 2003; Bharti et al., 2006; Julien et al., 2007). Наше исследование показало, что эти три типа антител специфичны для сетчатки жабы (рис. 3).

Кроме того, оказалось, что GFAP, RT97 и Тут экспрессируются до или после образования нервной трубки (GFAP — у амфибий, Messenger, Warner, 1989; у куриного зародыша, Norkute et al., 2010; RT97 — у костистых рыб, Velasco et al., 2000; Wang et al., 2006; Тут — у мышей, Coglein et al., 1977; Cronin et al., 2003). Наши исследования показали, что уровень экспрессии GFAP и RT97 постепенно повышается в ППЭС, но понижается в ПНС на ранних стадиях развития глаза (рис. 4 и 5). Напротив, уровень экспрессии Тут постепенно понижается в ПНС, но повышается в ППЭС (рис. 7). Это означает, что количество нейронов и глиальных клеток увеличивается, а биосинтез пигмента уменьшается в ПНС. Напротив, в ППЭС количество нейронов и глиальных клеток уменьшается, а биосинтез пигмента увеличивается. И ПНС, и ППЭС образуются из одного источника — стенки переднего мозга

(Лопашов, Строева, 1961; Лопашов, 1963; Lopashov, Stroeveva, 1964; Jacobson, 1966; Lee et al., 2001; Li, Sakaguchi, 2002; Francisco-Morcillo et al., 2006; Adler, Canto-Soler, 2007), так что GFAP, RT97 и Тут экспрессируются в них в первую очередь. Все приведенные данные показывают, что различные уровни экспрессии белков могут быть обусловлены различным положением ПНС и ППЭС в глазном пузырьке. Известно, что пигментные клетки обычно локализуются в отдаленной маргинальной области, например на поверхности стенки мозга и кожи. ПНС локализуется в более удаленном маргинальном участке, чем ППЭС после образования глазного пузырька. Кроме того, когда глазные пузырьки выпячиваются наружу, ПНС увеличивается, но число клеток в ПНС заметно не возрастает. Так что уровень экспрессии Тут в ПНС был выше, чем в ППЭС, а уровни экспрессии GFAP и RT97 были ниже в начале образования глазного пузырька (рис. 4А, 5А и 6А). Из этих данных следует, что молекулярная дифференцировка связана с положением ткани в начале морфогенеза глазного пузырька.

Кривые экспрессии всех трех белков пересекаются через 5–6 ч после образования глазного пузырька во время прямого контакта глазного пузырька с покрывающей эктодермой (Feng et al., 1984). Известно, что взаимодействие глазного пузырька с покрывающей эктодермой приводит к образованию хрусталика из находящейся в контакте эктодермы и образованию глазной чаши, в которой контактирующая часть глазного пузырька становится внутренней стенкой глазной чаши, т.е. ПНС и остальные части становятся наружной стенкой глазной чаши или ППЭС (Лопашов, Строева, 1961; Лопашов, 1963; Lopashov, Stroeveva, 1964; Jacobson, 1966; Gilbert, 2003). Дифференцировка ПНС и ППЭС активирует экспрессию новых генов или изменяют экспрессию уже активированных генов. В этой работе мы использовали три типа антител, GFAP, RT97 и Тут, которые экспрессируются уже перед образованием глазного пузырька. Так что наши результаты показывают, что взаимодействие между глазным пузырьком и покрывающей эктодермой стимулирует специфическую молекулярную экспрессию и подавляет неспецифическую. Наконец, молекулярная дифференцировка приводит к максимальному уровню экспрессии в нейронах и глиальных клетках в ПНС, тогда как уровень экспрессии Тут оказывается наивысшим в ППЭС. Специфическая молекулярная дифференцировка начинается после установления контакта между глазным пузырьком и эктодермой. Мы предполагаем, что три различных белка проявляют различную экспрессию в ходе дифференцировки различных типов клеток в сетчатке. После взаимодействия нейроны и гли-

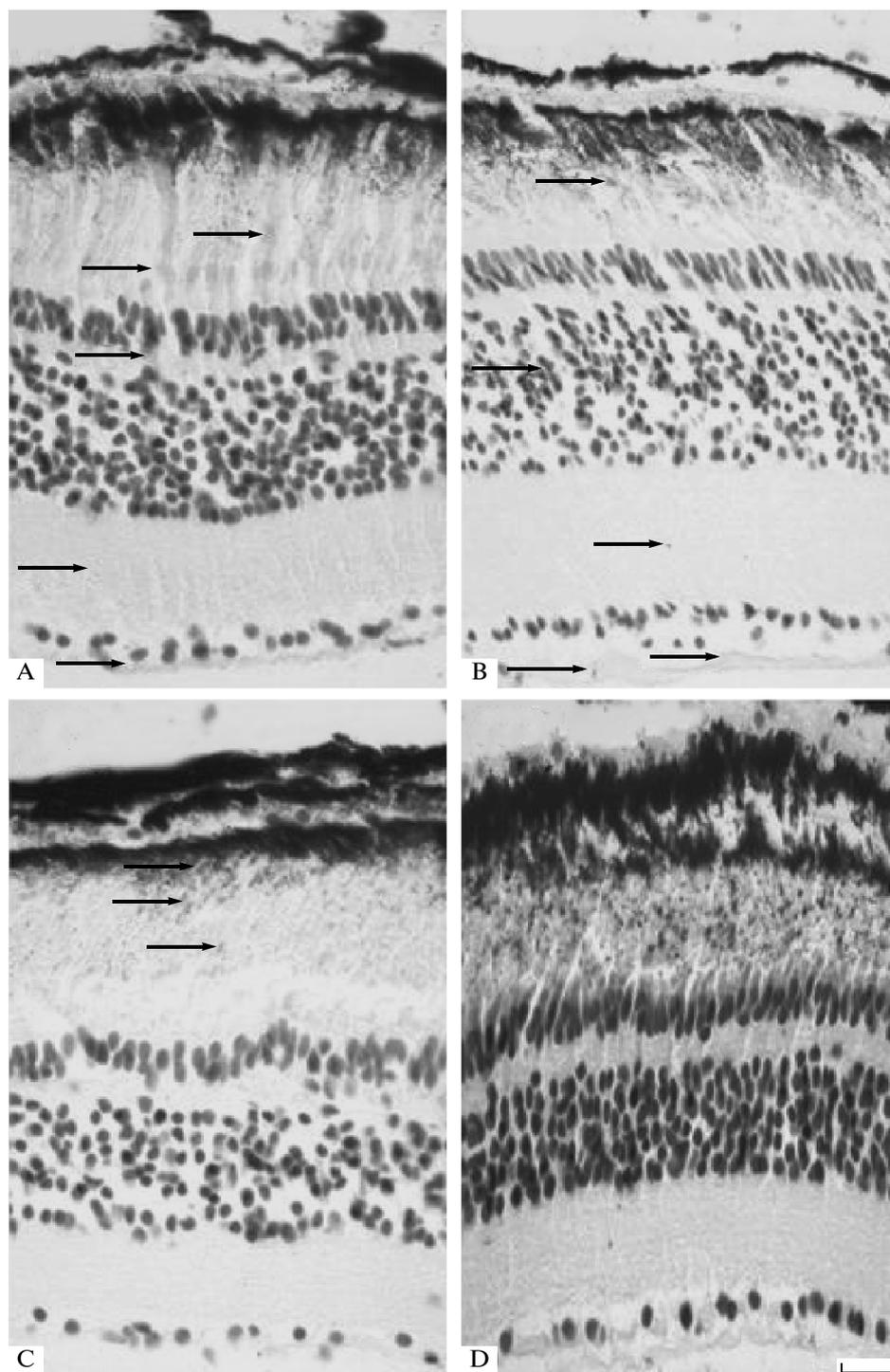


Рис. 3. Иммуногистохимический анализ сетчатки взрослой жабы.

(A) Экспрессия GFAP (показано стрелками) в сетчатке взрослой жабы. (B) Экспрессия RT97 (показано стрелками) в сетчатке взрослой жабы. (C) Экспрессия Tug (показано стрелками) в сетчатке взрослой жабы. (D) Отрицательный контроль. Масштаб 20 мкм.

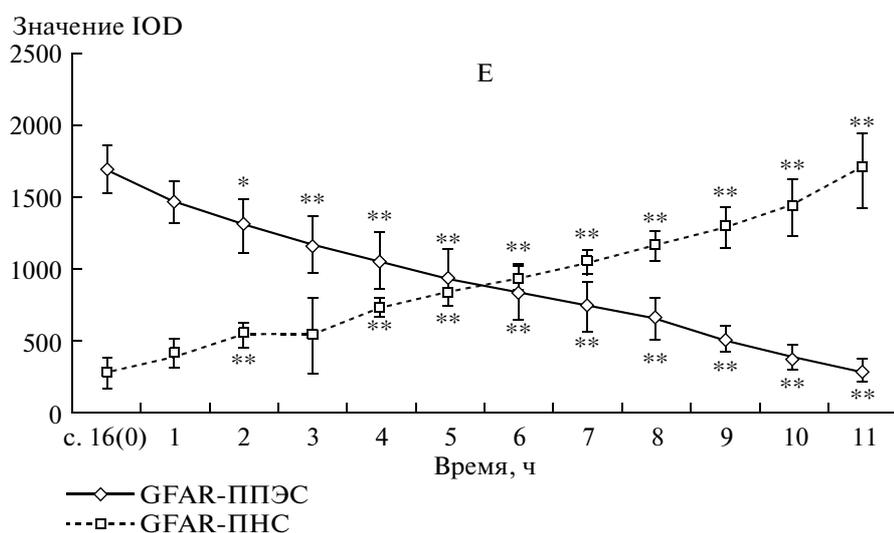
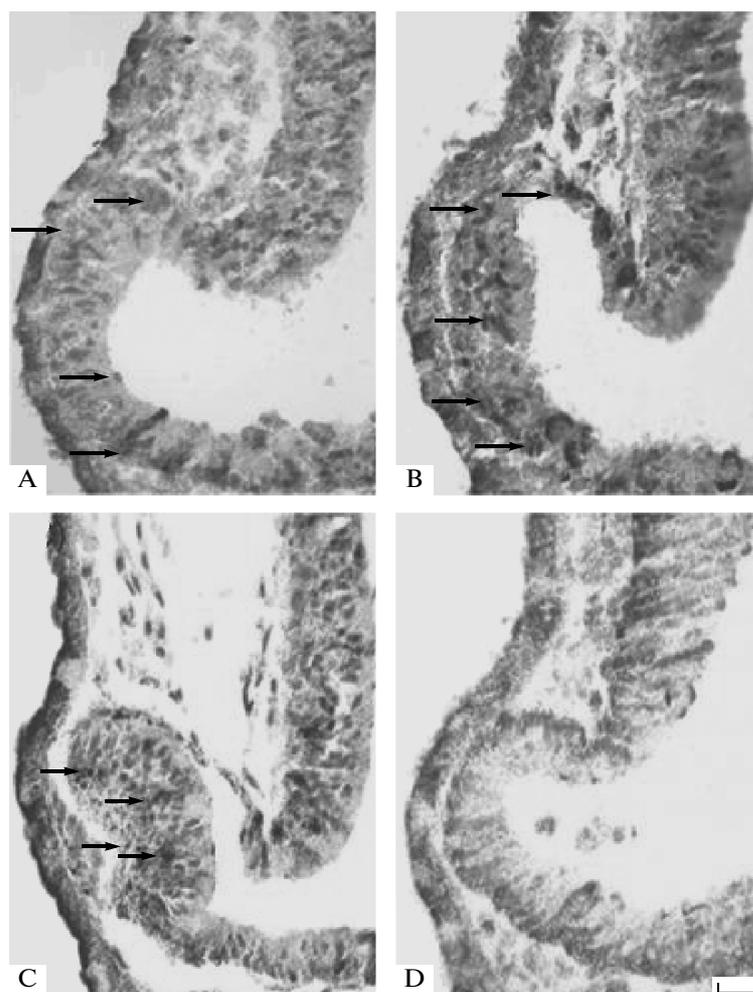


Рис. 4. Динамика экспрессии GFAP в ПНС и ППЭС в раннем морфогенезе глаза.

(А) Уровень экспрессии GFAP (показано стрелками) был низким в вентральной части ПНС через 5 ч после образования глазного пузыря. (В) Уровень экспрессии GFAP (показано стрелками) увеличился через 8 ч после образования глазного пузыря. (С) Уровень экспрессии GFAP (показано стрелками) был наивысшим в ПНС через 11 ч после образования глазного пузыря. (D) Отрицательный контроль. Масштаб 30 мкм. (E) Данные представлены как средние \pm стандартная ошибка ($n = 10$) в каждой группе. * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ считали статистически значимыми при сравнении ПНС и ППЭС на стадии 16 (0 ч).

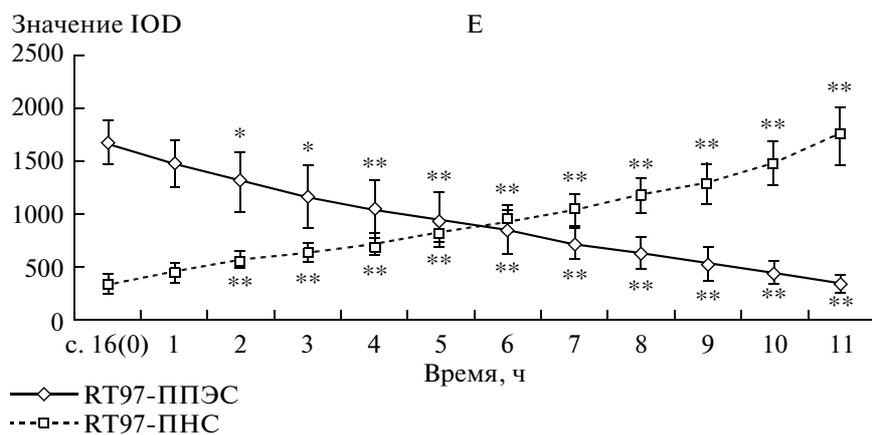
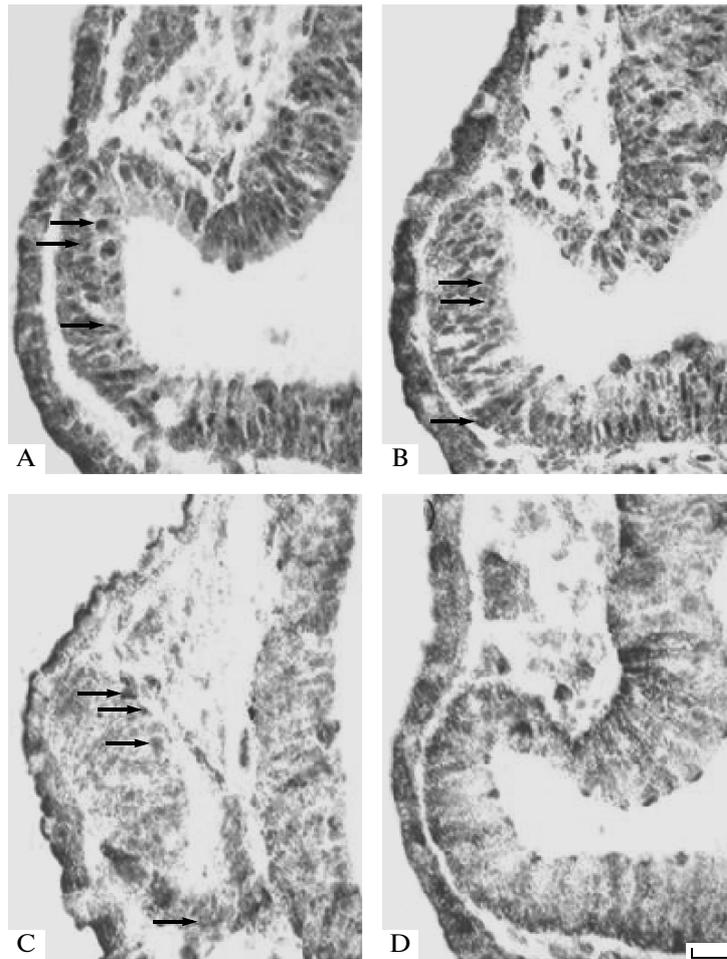


Рис. 5. Динамика экспрессии RT97 в ПНС и ППЭС в раннем морфогенезе глаза.

(А) Уровень экспрессии RT97 (показано стрелками) был низким в ПНС через 4 ч после образования глазного пузырька. (В) Уровень экспрессии RT97 (показано стрелками) увеличился через 9 ч после образования глазного пузырька. (С) Уровень экспрессии RT97 (показано стрелками) был наивысшим в ПНС через 11 ч после образования глазного пузырька. (D) Отрицательный контроль. Масштаб 30 мкм. (Е) Данные представлены как средняя \pm стандартная ошибка ($n = 10$) в каждой группе. * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ считали статистически значимыми при сравнении ПНС и ППЭС на стадии 16 (0 ч).

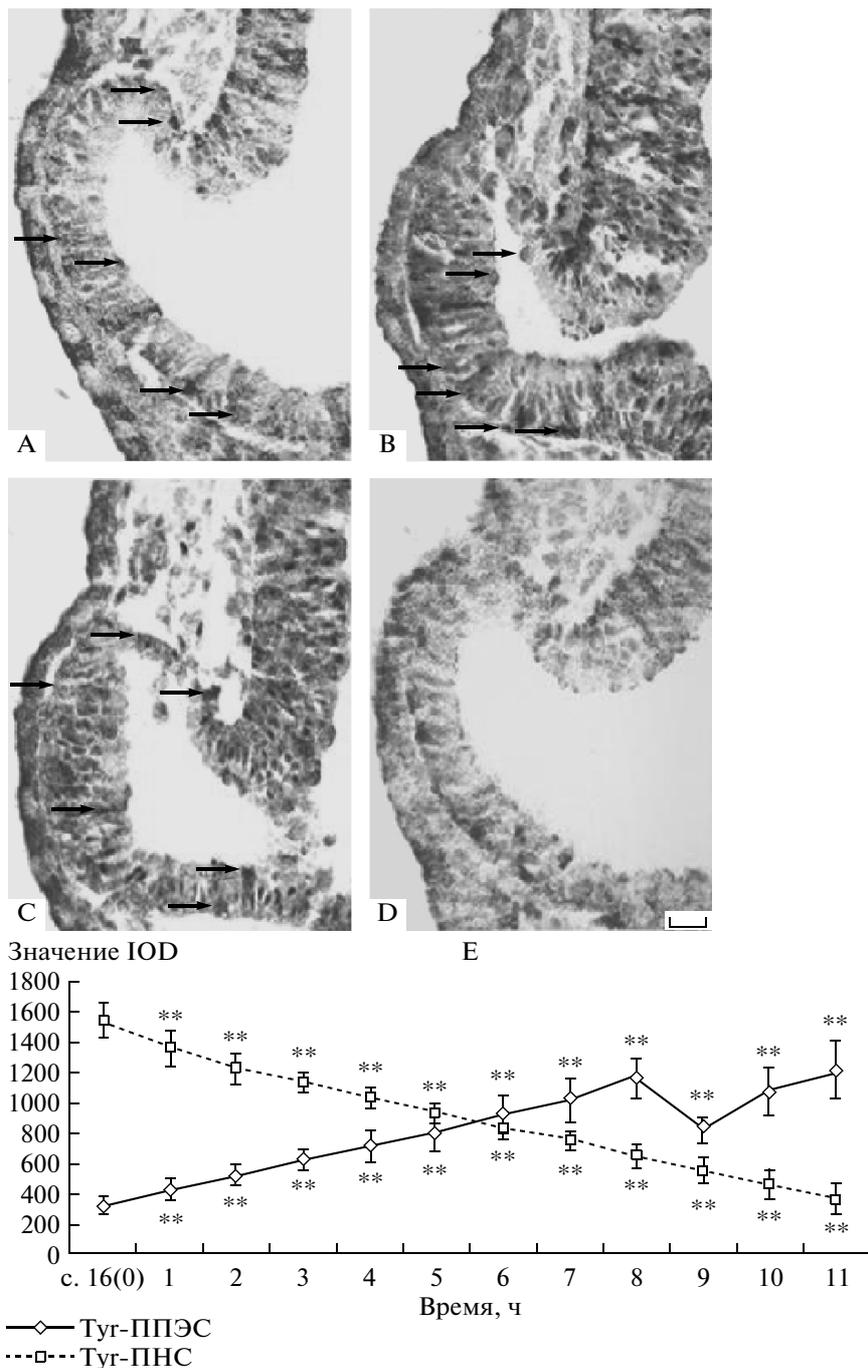


Рис. 6. Динамика экспрессии Туг в ПНС и ППЭС в раннем морфогенезе глаза.

(А) Уровень экспрессии Туг (показано стрелками) был низким в ПНС через 5 ч после образования глазного пузыря. (В) Уровень экспрессии Туг (показано стрелками) увеличился через 7 ч после образования глазного пузыря. (С) Уровень экспрессии Туг (показано стрелками) был наивысшим в ПНС через 10 ч после образования глазного пузыря. (D) Отрицательный контроль. Масштаб 30 мкм. (Е) Данные представлены как средняя ± стандартная ошибка ($n = 10$) в каждой группе. * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ считали статистически значимыми при сравнении ПНС и ППЭС на стадии 16 (0 ч).

альные и пигментные клетки начинают экспрессировать специфические белки в соответствии с их будущими функциями, а не с их положением.

Это исследование было поддержано Национальным фондом естественных наук КНР, проект 30670230.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adler, R. and Canto-Soler, M.V., Molecular Mechanisms of Optic Vesicle Development: Complexities, Ambiguities and Controversies, *Dev. Biol.*, 2007, vol. 305, pp. 1–13.
- Basu, P.K., Sarkar, P., Menon, I., et al., Bovine Retinal Pigment Epithelial Cells Cultured in vitro: Growth Characteristics, Morphology, Chromosomes, Phagocytosis Ability, Tyrosinase Activity and Effect of Freezing, *Exp. Eye Res.*, 1983, vol. 36, pp. 671–683.
- Bharti, K., Nguyen, M.T.T., Skuntz, S., et al., The Other Pigment Cell: Specification and Development of the Pigmented Epithelium of the Vertebrate Eye, *Pigm. Cell Res.*, 2006, vol. 19, pp. 380–394.
- Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D., et al., Localization of the Glial Fibrillary Acidic Protein in Astrocytes by Immunofluorescence, *Brain Res.*, 1972, vol. 43, pp. 429–435.
- Barnstable C.J.A., Molecular View of Vertebrate Retinal Development., *Molecul. Neurobiol.*, 1987, vol. 11, pp. 9–46.
- Canto-Soler, M.V. and Adler, R., Optic Cup and Lens Development Requires Pax6 Expression in the Early Optic Vesicle during a Narrow Time Window, *Dev. Biol.*, 2006, vol. 294, pp. 119–132.
- Coughlin, M.D., Boyer, D.M. and Black, I.B., Embryologic Development of a Mouse Sympathetic Ganglion in Vivo and in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, pp. 3438–3442.
- Cronin, C.A., Ryan, A.B., Talley, E.M., et al., Tyrosinase Expression during Neuroblast Divisions Affects Later Pathfinding by Retinal Ganglion Cells, *J. Neurosci.*, 2003, vol. 23, pp. 11692–11697.
- Cuadros, M.A., García-Martín, M., Martín, C., et al., Haemopoietic Phagocytes in the Early Differentiating Avian Retina, *J. Anat.*, 1991, vol. 177, pp. 145–158.
- Dowling, J.E., *The Retina*. Cambridge, MA: Belknap Press. 1987.
- Eng, L.F., The Glial Fibrillary Acidic Protein: The Major Protein Constituent of Glial Filaments, *Scand. J. Immunol.*, 1982, vol. 15, pp. 41–51.
- Ezeonu, I., Dutt, S. and Smith, K., Differentiation in a Human Retinal Precursor Cell Line: Limitation to Multipotency, in vitro, *Cell Dev-An.*, 1999, vol. 35, pp. 435–440.
- Feng, B.S., Ge, R.C. and Tong, Y.X., Studies on Morphogenesis of *Bufo raddei* Eye, *Acta Herpetol., Sin.*, 1984, vol. 3, pp. 5–10.
- Francisco-Morcillo, J., Hidalgo-Sánchez, M. and Martín-Partido, G., Spatial and Temporal Patterns of Apoptosis during Differentiation of the Retina in the Turtle, *Anat. Embryol.*, 2004, vol. 208, pp. 289–299.
- Francisco-Morcillo, J., Hidalgo-Sánchez, M. and Martín-Partido, G., Spatial and Temporal Patterns of Proliferation and Differentiation in the Developing Turtle Eye, *Brain Res.*, 2006, vol. 1103, pp. 32–48.
- Ge, R.C., Feng, B.S., and Tong, Y.X., The Early Development and Stages of the Toad, *Bufo raddei* Strauch, *J. Lanzhou University (Nature and Science edition)* 1982, vol. 18, pp. 125–136.
- Gilbert, S.F., *Developmental Biology*, Sunderland, MA: Sinauer, 2003.
- Harris W.A. and Perron M., Molecular Recapitulation: The Growth of the Vertebrate Retina, *Int. J. Dev. Biol.*, 1998, vol. 42, pp. 299–304.
- Holt, C.E., A Single-Cell Analysis of Early Retinal Ganglion Cell Differentiation in *Xenopus*: From Soma to Axon Tip, *J. Neurosci.*, 1989, vol. 9, pp. 3123–3145.
- Hyer, J., Mima, T. and Mikawa, T., FGF1 Patterns the Optic Vesicle by Directing the Placement of the Neural Retina Domain, *Development*, 1998, vol. 125, 869–877.
- Jacobson, A.G., Inductive Processes in Embryonic Development, *Science*, 1966, vol. 152, pp. 25–34.
- Julien, S., Kociok, N., Kreppel, F., et al., Tyrosinase Biosynthesis and Trafficking in Adult Human Retinal Pigment Epithelial Cells, *Graef. Arch. Clin. Exp.*, 2007, vol. 245, pp. 1495–1505.
- Kumasaka, M., Sato, S., Yajima, I., et al., Isolation and Developmental Expression of Tyrosinase Family Genes in *Xenopus laevis*, *Pigm. Cell Res.*, 2003, vol. 16, pp. 455–462.
- Lee, C.S., May, N.R. and Fan, C.M., Transdifferentiation of the Ventral Retinal Pigmented Epithelium to Neural Retina in the *growth arrest specific gene 1* Mutant, *Dev. Biol.*, 2001, vol. 236, pp. 17–29.
- Li, M. and Sakaguchi, D.S., Expression Patterns of Focal Adhesion Associated Proteins in the Developing Retina, *Dev. Dynam.*, 2002, vol. 225, pp. 544–553.
- Li, Z., Hu, M., Ochocinska, M.J., et al., Modulation of Cell Proliferation in the Embryonic Retina of Zebrafish (*Danio rerio*), *Dev. Dynam.*, 2000, vol. 219, pp. 391–401.
- Lopashov, G.V., *Developmental Mechanisms of Vertebrate Eye Rudiment*, Oxford, 1963.
- Lopashov, G.V. and Stroeva, O.G., Morphogenesis of the Vertebrate Eye, *Adv. Morphol.*, 1961, vol. 1, pp. 331–370.
- Lopashov, G.V. and Stroeva, O.G., *Development of the Eye: Experimental Studies*, Jerusalem, 1964.
- Martín-Partido, G., Rodríguez-Gallardo, L., Álvarez I.S., et al., Cell Death in the Ventral Region of the Neural Retina during the Early Development of the Chick Embryo Eye, *Anat. Rec.*, 1988, vol. 222, pp. 272–281.
- Messenger, N.J. and Warner, A.E., The Appearance of Neural and Glial Cell Markers during Early Development of the Nervous System in the Amphibian Embryo, *Development*, 1989, vol. 107, pp. 43–54.
- Newton, J.M., Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., et al., Mutations in the Human Orthologue of the Mouse *underwhite* Gene (*uw*) Underlie a New Form of Oculocutaneous Albinism, OCA4, *Am. J. Hum. Genet.*, 2001, vol. 69, pp. 981–988.
- Norkute, A., Kipp, M., Dang, J., et al., Early Formation of a GFAP-Positive Cell Population in the Ventricular Zone during Chicken Brain Development, *Cells Tissues Organs*, 2010, vol. 191, pp. 57–65.
- Rodríguez-Gallardo, L., Lineros-Domínguez, M.D.C., Francisco-Morcillo, J., et al., Macrophages during Retina and Optic Nerve Development in the Mouse Embryo: Relationship to Cell Death and Optic Fibres, *Anat. Embryol.*, 2005, vol. 210, pp. 303–316.

- Schnitzer, J., Distribution and Immunoreactivity of Glia in the Retina of the Rabbit, *J. Comp. Neurol.*, 1985, vol. 240, pp. 128–142.
- Sharma, S., Sharma, M.C., Gupta, D.K., et al., Angiogenic Patterns and Their Quantitation in High Grade Astrocytic Tumors, *J. Neuro-Oncol.*, 2006, vol. 79, pp. 19–30.
- Shin, D.H., Lee, K.S., Lee, E., et al., The correspondence between the Labeling Patterns of Antibody RT97, Neurofilaments, Microtubule Associated Protein 1B and tau Varies with Cell Types and Development Stages of Chicken Retina, *Neurosci. Lett.*, 2003, vol. 342, pp. 167–170.
- Turner, D.L. and Copko, C.L., A Common Progenitor for Neurons and Glia Persists in Rat Retina Late in Development, *Nature*, 1987, vol. 328, pp. 131–136.
- Velasco, A., Bragado, M.J., Jimeno, D., et al., Growing and Regenerating Axons in the Visual System of Teleosts are Recognized with the Antibody RT97, *Brain Res.*, 2000, vol. 883, pp. 98–106.
- Wang, F.C., Liu, Z.H., Si, K.Y., et al., Immunohistochemical Localization of the Medium and High-Weight Neurofilament in the Visual Nervous System of *Carasius auratus*, *Journal of Northwest Normal University (Natural Science)*, 2006, vol. 42, pp. 74–77.
- Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., et al., A Simple and Fast Densitometric Method for the Analysis of Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Substantia Nigra Pars Compacta and in the Ventral Tegmental Area, *Brain Res.*, 2005, vol. 16, pp. 58–64.
- Zhang, S.S., Fu X.Y. and Barnstable, C.J., Molecular Aspects of Vertebrate Retinal Development, *Mol. Neurobiol.*, 2002, vol. 26(2–3), pp. 137–152.

Apoptosis and Differentiation in Presumptive Neural Retina and Presumptive Retinal Pigmented Epithelium during Early Eye Development in Toad, *Bufo raddei* Strauch

W. Han^a, Y.-P. Han^{a,b}, and Z.-R. Wang^a

^a Institute of Developmental Biology, School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, 730000 P.R. China

^b College of life Sciences and Techenology, Longdong University, Qingyang, 734000 P.R. China

e-mail: wangzr@lzu.edu.cn

Abstract—Apoptosis and differentiation in presumptive neural retina (PNR) and presumptive retinal pigmented epithelium (PRPE) were investigated during early retina development of toad, *Bufo raddei* Strauch. TUNEL staining was used to evaluate apoptotic cells and the immunohistochemistry was used to assess the expression levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP), RT97 and tyrosinase (Tyr) during early eye development respectively. The density of apoptotic cells and protein expression were quantitated with Image-Pro Plus 6.0. Apoptosis was found in both PNR and PRPE and the density of apoptotic profiles in PRPE was higher than that in PNR (most $P < 0.01$) at the same stage during early eye development. The expression levels of GFAP and RT97 changed from low to high in PNR, but from high to low in PRPE, whereas the expression level of Tyr, was contrary to those of GFAP and RT97 in both PNR and PRPE. The point of intersection of these, increase and decrease respectively was found at 5–6 h after formation of optic vesicle (FOV). PRPE becomes thinner than PNR, one of the reasons might be due to higher density of apoptosis in PRPE than that in PNR during early eye development. Molecular differentiation, however, occurred after the contact of the optic vesicle outer wall with the overlying ectoderm which promotes the expression of specific molecules and inhibits the expression of non-specific molecules in PNR and PRPE respectively.

Keywords: presumptive neural retina, presumptive retinal pigmented epithelium, apoptosis, differentiation, immunohistochemistry.

УДК 591

АНДРЕЙ ПАВЛОВИЧ ДЫБАН (к 90-летию со дня рождения)



18 апреля 2012 года исполнилось 90 лет Андрею Павловичу Дыбану — выдающемуся эмбриологу, ученому с мировым именем, внесшему существенный вклад в биологию развития млекопитающих. А.П. Дыбан — доктор медицинских наук (с 1960 г.), профессор (с 1960 г.), заслуженный деятель науки РФ (с 1998 г.), почетный доктор НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург (с 2000 г.).

А.П. Дыбан родился 18 апреля 1922 г. в г. Умани Киевской (Черкасской) области в семье известных земских врачей.

В 1939 г. А.П. Дыбан поступил в Киевский медицинский институт, который и окончил в 1944 г. в г. Челябинске. В 1941 г., спасая детей из дома малютки, А.П. Дыбан был тяжело контужен и получил многочисленные осколочные ранения.

В 1944–1947 гг. А.П. Дыбан работал ассистентом кафедры гистологии и эмбриологии Киевского медицинского института и одновременно обучался в аспирантуре. В 1947 г. он защитил кандидатскую диссертацию на тему “Гистологические структуры аномальных зародышей человека” и в 25-летнем возрасте стал руководителем кафедры гистологии и эмбриологии Львовского медицинского института, которую и возглавлял вплоть до своего переезда в Ленинград (т.е. с 1947 по 1963 гг.).

Незаурядный исследователь и руководитель, А.П. Дыбан сформулировал научное направление сотрудников кафедры — изучение факторов и механизмов, обуславливающих аномальное развитие человека и лабораторных млекопитающих. Итогом научной деятельности А.П. Дыбана во Львовском медицинском институте стала монография “Очерки патологической эмбриологии человека”, 1959), по которой он в 1960 г. защитил докторскую диссертацию в стенах Института экспериментальной медицины АМН СССР. Монография эта в дальнейшем была переиздана на немецком языке в Германии и принесла ему большую известность как в СССР, так и за рубежом.

Наиболее способных своих учеников (В.С. Баранова, И.Р. Барияляка) А.П. Дыбан пригласил в аспирантуру в Ленинград, куда он переехал работать в ИЭМ АМН СССР.

В 1965–1991 гг. А.П. Дыбан руководил Отделом эмбриологии Института экспериментальной медицины АМН СССР (Ленинград), с 1991 по 1995 гг. находился в научной командировке в США, а с 1995 г. и по настоящее время работает в Отделе молекулярной генетики НИИЭМ СЗО РАМН.

Особенностью научного творчества А.П. Дыбана является то, что он не замыкался в рамках только одного научного направления, а, обладая энциклопедическими знаниями не только в области

экспериментальной эмбриологии и научным предвидением, успешно развивал и вносил существенный вклад в новые научные области. Это и экспериментальная тератология, цитогенетика развития млекопитающих, генетика поведения, трансгенез млекопитающих.

А.П. Дыбан внес значительный вклад в экспериментальную тератологию млекопитающих. Современный этап развития тератологии начался после талидомидной трагедии, когда под эгидой Всемирной Организации Здравоохранения была создана группа экспертов, представленная девятью всемирно известными специалистами, включая А.П. Дыбана, которые и разработали основные принципы тестирования тератогенности и эмбриотоксичности лекарственных веществ. Сформулированные положения ВОЗ рекомендовала внедрить в практику здравоохранения.

А.П. Дыбан и руководимый им коллектив Отдела эмбриологии ИЭМ АМН СССР установили общие закономерности повреждающего действия различных агентов на разных стадиях эмбриогенеза (Н.А. Чеботарь, А.М. Котин, В.Ф. Пучков, В.С. Баранов, В.Б. Попов и др.). Данные эти были положены в основу составленных этим коллективом правил доклинической проверки лекарственных препаратов на тератогенную и эмбриотоксическую активность, которые были утверждены Минздравом СССР (1972, 1986 гг.) и внедрены в здравоохранение.

А.П. Дыбан внес значительный вклад в экспериментальную цитогенетику развития млекопитающих. Он создал новую технику хромосомного анализа ранних зародышей млекопитающих, что позволило ему вместе с сотрудниками детально проанализировать влияние числовых и структурных хромосомных aberrаций на ключевые звенья эмбриогенеза. На основании полученных данных А.П. Дыбан сформулировал новые представления о роли различных хромосом в раннем развитии и о сочетанном участии генов и эпигеномных факторов в контролирующих механизмах раннего эмбриогенеза млекопитающих.

А.П. Дыбан и его сотрудники выполнили большой цикл работ по направленному воздействию на оогенез и ранний эмбриогенез млекопитающих. Были созданы новые методы искусственной активации яйцеклеток и детально исследовано поведение хромосом при экспериментальном партеногенезе (Л.И. Хожай, Е.М. Нониашвили).

А.П. Дыбан и его сотрудники совместно с Лабораторией генетики поведения кафедры высшей нервной деятельности МГУ (рук.-член-корр. АН СССР Л.В. Крушинский) обнаружили неизвестное ранее явление — положительное влияние центрального слияния определенных аутосом на некоторые поведенческие акты у мышей и сформулировали представление о возможной роли ро-

бертсоновских транслокаций в адаптивной эволюции млекопитающих.

Пионерскими являются работы А.П. Дыбана и его сотрудников по трансгенезу млекопитающих. В 1986 г. в Отделе эмбриологии ИЭМ совместно с С.И. Городецким (Москва) впервые в мире были созданы трансгенные крысы и впервые в СССР мыши, экспрессирующие ген гормона роста человека. Неоценимая роль в получении трансгенных животных принадлежала ученикам А.П. Дыбана — Б.Л. Вайсману, Г.Ф. Голинскому, Г.Г. Секириной, а впоследствии Т.В. Игнатъевой, А.В. Сорокину и др.

А.П. Дыбан является основателем отечественной школы по изучению нормального и патологического развития млекопитающих (Н.А. Чеботарь, А.М. Котин, В.Б. Попов, В.С. Баранов, Г.Ф. Голинский, И.И. Тиходеева, В.М. Михайлов, Л.А. Конописцева, Н.К. Бичева, И.Б. Архангельская, И.В. Голованова, Т.И. Станжевская, Э.А. Космачевская, В.Н. Ростовцев, И.Ю. Соколик и мн. др.), основоположником петербургской школы цитогенетиков и биологов развития (В.С. Баранов, Е.Л. Паткин, И.Р. Барияк, Е.М. Нониашвили, Г.Г. Секирина, Л.Д. Удалова, Л.И. Хожай, Е.Л. Северова, А.В. Сорокин и мн. др.). Его ученики не только продолжили дело своего учителя, но и внесли существенный личный вклад в развитие экспериментальной и клинической цитогенетики. Так, член-корр. РАМН, д.м.н. В.С. Баранов — главный специалист по медицинской генетике Санкт-Петербурга, зав. лабораторией пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней ФБГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Отта СЗО РАМН, руководитель Федерального медико-генетического центра, известный ученый в области цитогенетики эмбрионального развития и персонифицированной (предиктивной) медицины. Проф., д.б.н. Е.Л. Паткин — руководитель лаборатории молекулярной цитогенетики развития млекопитающих Отдела молекулярной генетики ФБГУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, известный ученый в области генетики и эпигенетики развития. Необходимо также вспомнить безвременно ушедшего из жизни проф., д.м.н. И.Р. Барияка, основателя научного центра медицинской генетики, автора концепции и создания эффективной медико-генетической службы на Украине.

А.П. Дыбан подготовил 45 кандидатов и 5 докторов наук. В 1990-е гг. многие ученики А.П. Дыбана оказались востребованы в практическом здравоохранении и занимают посты ведущих эмбриологов в центрах экстракорпорального оплодотворения. Руководимый им Отдел эмбриологии ИЭМ АМН СССР был всесоюзным центром подготовки специалистов в области экспериментальной эмбриологии, тератологии и цитогенетики

развития млекопитающих. Отдел эмбриологии в те годы также был единственным в СССР центром по культивированию *in vitro* зародышей млекопитающих. Важная роль в налаживании метода культивирования постимплантационных зародышей принадлежала ученикам А.П. Дыбана, в частности, В.Б. Попову, Т.В. Игнатъевой, а доимплантационных – безвременно ушедших из жизни Г.Г. Секириной и Г.Ф. Голинскому. Широко известны работы д.б.н. Н.А. Самошкиной, которая методом автордиографии изучила синтез ДНК и митотические циклы в раннем эмбриогенезе млекопитающих, установила композиционную гетерогенность бластомеров доимплантационных зародышей мышей.

А.П. Дыбан является автором 289 статей, в том числе 19 глав в книгах или коллективных монографиях и 6 монографий, 2 из которых изданы в Германии (Dyban, 1962, 1990), а одна опубликована в Великобритании (Dyban, Baranov, 1987).

Труды А.П. Дыбана о методах работы с зародышами млекопитающих (Дыбан, 1974), по оогенезу млекопитающих (Дыбан, Баранов, 1977), монография “Раннее развитие млекопитающих” (Дыбан, 1988), прекрасно иллюстрированное коллективное руководство по эмбриональному развитию лабораторных млекопитающих (А. Дыбан с соавт.,

1975) выдержали проверку временем и способствовали становлению не одного поколения эмбриологов и биологов развития.

А.П. Дыбан является не только ученым-теоретиком, но и блестящим экспериментатором, который всегда непосредственно участвовал в проведении исследований. А.П. Дыбан автор ряда цитологических и цитогенетических методов. По мнению Симпсона (J.L. Simpson, 2010) работы А. Тарковского, А. Дыбана, А. Гроппа и др. по экспериментальной эмбриологии лабораторных млекопитающих, в частности, по цитогенетике мышей, явились предтечей и фундаментом для создания пренатальной генетической диагностики человека.

Андрей Павлович Дыбан служит Науке без малого 70 лет. У истоков многих успешно развивающихся в настоящее время направлений стоят пионерские фундаментальные, ставшие классическими, исследования А.П. Дыбана, получившие заслуженное признание ученых, изучающих механизмы нормального и патологического развития лабораторных животных и человека: эмбриологов, биологов развития, тератологов, цитогенетиков.

С.Г. Васецкий, П.А. Дыбан

УДК 591

К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ТАТЬЯНЫ АНТОНОВНЫ ДЕТЛАФ



8 октября 2012 г. исполнилось 100 лет со дня рождения выдающегося российского эмбриолога, профессора, доктора биологических наук Татьяны Антоновны Детлаф. Специалистам в области биологии развития это имя хорошо знакомо по публикациям в отечественных и международных журналах. Кроме того, ее имя неразрывно связано с серией монографий “Проблемы биологии развития”, инициатором издания которой она была, а также с популярными в свое время научными школами по биологии развития, в организации и проведении которых она принимала самое активное участие.

Татьяна Антоновна Детлаф родилась в Московской области. Ее мать, Софья Ароновна, была врачом, а отец, Антон Иосифович Детлаф, учителем математики. С 1918 по 1929 гг. он заведовал педагогическим и сельскохозяйственным техникумами в Волоколамском уезде, где вся семья жила 10 лет. Отец преподавал там математику, мать — биологию, а также вела санитарные наблюдения за здоровьем студентов.

После окончания школы-семилетки и двух курсов техникума Татьяна Антоновна в 1925 г. сдала вступительные экзамены на биологическое отделение 2-го пединститута в Москве, но принята не была, так как для детей служащих было выделено мало мест. Ее принял Симферопольский пединститут, где был недобор студентов. Однако через

несколько месяцев был объявлен дополнительный набор студентов на биофаке 1-го МГУ. Так как в это время семья переехала ближе к Москве, Татьяне Антоновне удалось перевестись в 1-й МГУ. Ознакомившись с кафедрами геоботаники и физико-химической биологии, она остановила свой выбор на кафедре Михаила Михайловича Завадовского “Динамика развития организмов”. После окончания университета в 1933 г. Татьяна Антоновна была оставлена в аспирантуре и под руководством своего учителя — выдающегося русского ученого, основателя школы экспериментальной эмбриологии в России, профессора Д.П. Филатова — подготовила и в 1937 г. защитила кандидатскую диссертацию на тему “Развитие нервной системы у *Anura* в связи с вопросом о действии организатора”.

В 1937 г. Т.А. Детлаф поступила в Лабораторию экспериментальной эмбриологии ВИЭМ, а в 1939 г., в связи с переводом ВИЭМ в Ленинград, перешла в Институт эволюционной морфологии АН СССР. Во время эвакуации она работала в Лаборатории динамики развития Казахского филиала АН СССР у М.М. Завадовского по изучению многоплодия овец. В 1943 г. Татьяна Антоновна вернулась в Москву и поступила в докторантуру к академику И.И. Шмальгаузену, который возглавлял в то время Институт эволюционной морфологии АН СССР. Татьяна Антоновна подготовила и

защитила в 1948 г. докторскую диссертацию на тему “Сравнительно-экспериментальное изучение эктодермы, хордо-мезодермы и их производных у *Anamnia*”. Первая часть была посвящена изложению теории зародышевых листков на разных этапах развития этой теории. Характеризуя работу Татьяны Антоновны, академик И.И. Шмальгаузен писал: “Т.А. Детлаф проявила себя при этом как замечательно тонкий и точный экспериментатор. В результате ее исследований получено много совершенно новых данных и сделаны весьма интересные выводы, в частности, о влиянии темпа дифференцировки на формирование эмбриональных зачатков”. Эта диссертация должна была быть опубликована в виде книги, однако из-за прошедшей в августе 1948 г. печально знаменитой сессии ВАСХНИЛ, после которой в число “лженаук” попала не только генетика, но и механика развития (так тогда называлась экспериментальная эмбриология), набор книги был рассыпан, а утверждение Татьяны Антоновны в степени доктора биологических наук состоялось лишь через год.

С декабря 1947 г. Т.А. Детлаф работала старшим научным сотрудником в Институте эволюционной морфологии АН СССР (с 1948 г. – Институт морфологии животных им. А.Н. Северцова), а после раздела Института в 1967 г. – в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова АН СССР. При организации Института биологии развития Лаборатория академика Б.Л. Астаурова была разделена на три, и одну из них, Лабораторию экспериментальной эмбриологии им. Д.П. Филатова, Татьяна Антоновна возглавила и руководила ею до 1987 г.

Нельзя не отметить важнейшие вехи ее пути в науке. Это, прежде всего, изучение эволюционных аспектов процесса детерминации и дифференцировки эмбриональных зачатков у позвоночных животных. К сожалению, материалы этого большого цикла исследований, которые легли в основу ее докторской диссертации, были опубликованы лишь частично из-за наступившего в 1948 г. периода мракобесия в биологической науке. В этих исследованиях были экспериментально показаны различия в свойствах, морфогенетических потенциях и перспективном значении наружного и внутреннего слоев эктодермы и хордомезодермы. Сравнительный анализ изучения зародышевых листков позволил рассмотреть пути эволюции первичной эктодермы у разных групп *Anamnia*. При этом было показано, что расчленение первичной эктодермы на наружный и внутренний слой происходит у разных низших позвоночных на разных стадиях развития, т.е. может служить примером гетерохронии. Более ранняя или поздняя эпителиальная дифференцировка наружного слоя определяет особенности раннего эмбриогенеза в разных группах *Anamnia* (см., например: Современные проблемы..., 1982; Dettlaff, 1983).

В 1948 г., когда встал вопрос об изменении направления исследований в связи с новыми “веяниями”, Т.А. Детлаф и ее сотрудники вынуждены были переключиться на изучение зародышевого и личиночного развития важной в народнохозяйственном отношении группы рыб – осетровых. Однако именно благодаря этому осетровые рыбы встали в один ряд с наиболее хорошо изученными эмбриологическими объектами (см. Детлаф, Гинзбург, 1954). Вместе с тем в ходе этих исследований были получены данные, имеющие важное значение для разработки научных основ биотехники разведения осетровых и способствовавшие становлению новой отрасли народного хозяйства – осетроводства. Результаты этих исследований были опубликованы в большой серии статей Татьяны Антоновны и ее сотрудников, в методических руководствах и нескольких монографиях (Гинзбург, Детлаф, 1955, 1969; Детлаф и др., 1986; Dettlaff et al., 1993), ставших настольными книгами для специалистов в области разведения осетровых рыб в России и за рубежом.

Существенное место в научной деятельности Т.А. Детлаф заняло изучение механизмов созревания ооцитов амфибий и осетровых рыб. В этом цикле исследований ею и ее сотрудниками впервые были получены экспериментальные данные об изменениях строения и свойств цитоплазмы ооцита в ходе созревания и выяснена роль карิโอплазмы в приобретении ооцитами способности к цитотомии. Первые работы этого цикла (Dettlaff et al., 1964; Детлаф и др., 1965; Dettlaff, Skoblina, 1968) заложили начало нового направления исследований в биологии развития, связанного с изучением механизмов созревания ооцитов низших позвоночных животных, которое успешно развивалось и развивается ее учениками (Skoblina, 1969, 1976, 1997; Skoblina et al., 1986; Vassetzky et al., 1986; Трубникова, Рябова, 1989; Ryabova et al., 1994a–c; Гончаров и др., 1997, 1999; Nikitina, 1997; Ryabova, Vassetzky, 1997; Гончаров, 1998; Рябова и др., 1998, 2000; Елизаров и др., 1999; Goncharov, 2002). Это направление затем получило широкое развитие в ряде лабораторий США, Канады, Франции, Японии и других стран и привело к ряду фундаментальных открытий, касающихся общих биохимических и молекулярно-генетических механизмов регуляции мейоза и митоза.

Наконец, еще одно, наиболее любимое, направление исследований Т.А. Детлаф связано с выяснением временных закономерностей развития. При изучении продолжительности развития зародышей осетровых рыб она обнаружила, что при изменении температур в пределах оптимальных продолжительность разных периодов эмбриогенеза изменяется пропорционально. Такая же закономерность была выявлена позднее на амфибиях и костистых рыбах (Игнатьева, 1979), а в последнее время и на насекомых (Детлаф, 1994). Основыва-

ясь на этих наблюдениях, Татьяна Антоновна работала в 1960 г. совместно с братом — физиком А.А. Детлафом — метод относительной (безразмерной) характеристики продолжительности зародышевого развития (Детлаф Т., Детлаф А., 1960, 1982; Dettlaff T., Dettlaff A., 1961). При этом в качестве единицы измерения было предложено использовать продолжительность одного митотического цикла в период синхронных делений дробления t_0 (некоторые исследователи называют эту единицу детлафом). В настоящее время этот метод с успехом используется в научных лабораториях ряда стран и нашел отражение в рекомендациях по совершенствованию биотехники отечественного рыбоводства. Основные итоги исследований в этой области подведены Татьяной Антоновной в ее изданной монографии (Детлаф, 2001).

Татьяна Антоновна Детлаф уделяла немалое внимание истории науки. Ее перу принадлежат работы, в которых она проанализировала становление и развитие экспериментальной эмбриологии (Детлаф, 1953, 1957, 1976, 1988).

Помимо научной работы Татьяна Антоновна вела и педагогическую. С 1937 по 1940 гг. она читала курс гистологии и эмбриологии в Гомельском пединституте, а в 1947 г. — спецкурс по механике развития в МГУ.

Т.А. Детлаф известна как активный организатор науки. В течение многих лет она была заместителем председателя Научного совета РАН по проблемам биологии развития и сделала очень много для развития исследований по биологии развития в нашей стране. Она была инициатором, активным организатором и участником школ по биологии развития, которые пользовались большой популярностью в среде биологов. На этих школах, которые проходили в основном на базе академического пансионата в Звенигороде, выступали ведущие ученые с лекциями о разных аспектах биологии развития и смежных областей биологии. Школы сыграли большую роль в подготовке и повышении квалификации научных и педагогических кадров в области биологии развития. Под руководством Татьяны Антоновны и при ее непосредственном участии была подготовлена учебная программа по биологии развития. Татьяна Антоновна явилась также инициатором и организатором издания серии монографий “Проблемы биологии развития”. В этой серии было опубликовано свыше 20 монографий, и в ряде этих монографий она была редактором и автором (Методы..., 1974; Объекты..., 1975; Современные проблемы..., 1976, 1982). Три монографии из этой серии были переведены на английский язык (Oocyte..., 1988; Experimental Species..., 1990, 1991). Татьяна Антоновна много сделала для ознакомления научной общественности с достижениями зарубежной науки.

Она переводила книги и редактировала переводы книг ведущих зарубежных ученых.

В течение ряда лет Т.А. Детлаф была членом Национального комитета советских биологов, и благодаря ее настойчивости удалось организовать выезды делегаций советских ученых на международные конференции и конгрессы по биологии развития, что в те времена было совсем не простым делом.

Т.А. Детлаф пользуется широкой международной известностью, и ее достижения признаны во всем мире. Еще в 1957 г. она была избрана (одной из первых среди советских ученых) членом Международного Института эмбриологии, позже реорганизованного в Международное общество биологов развития. С момента организации журнала “Онтогенез” она была бессменным членом редколлегии, а затем редакционного совета журнала. За свою исследовательскую деятельность она была удостоена премии Президиума АН СССР в 1954 г. и премии А.О. Ковалевского в 1972 г., а также награждена серебряной медалью ВДНХ в 1981 г.

Преданность науке, которую мы, ее ученики и коллеги, наблюдали в течение всех долгих лет совместной работы в лаборатории, кажется, не имеет границ.

С.Г. Васецкий

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ Т.А. ДЕТЛАФ И ЕЕ СОТРУДНИКОВ

- Айзенштадт Т.Б., Детлаф Т.А.* Ультроструктура ооцитов себрюги в период созревания. 1. Пористые пластинки и комплекс Гольджи // Онтогенез. 1972. Т. 3. С. 280–288.
- Бодемер Ч.* Современная эмбриология / Под ред. Т.А. Детлаф. М.: Мир, 1971.
- Гексли Дж., де Бэр Г.* Экспериментальная эмбриология / Пер. Т.А. Детлаф, Н.И. Лазарева. М.: Биомедгиз, 1936.
- Гинзбург А.С., Детлаф Т.А.* Развитие зародышей осетровых рыб. М.: Изд-во АН СССР, 1955. 88 с.
- Гинзбург А.С., Детлаф Т.А.* Развитие осетровых рыб. Созревание яиц, оплодотворение и эмбриогенез. М.: Наука, 1969. 134 с.
- Гончаров Б.Ф.* Гормональная регуляция заключительных стадий оогенеза у низших позвоночных животных (теоретические и практические аспекты): Дисс. ... докт. биол. наук. М., 1998. 64 с.
- Гончаров Б.Ф., Полупан И.С., Вийо П., Ле Менн Ф.* Влияние состава среды культивирования на созревание ооцитов осетровых рыб, индуцируемое гонадотропными гормонами и прогестероном // Онтогенез. 1997. Т. 28. С. 55–64.
- Гончаров Б.Ф., Вийо П., Ле Менн Ф.* Сезонные изменения морфологических и физиологических характеристик овариальных фолликулов сибирского осетра, *Acipenser baeri* Brandt и их ценность для прогнозирования успеха искусственного размножения // Там же. 1999. Т. 30. С. 51–60.

- Детлаф Т.А.* Исследование источников материала закладки нервной системы у *Aplysia* в связи с вопросом о действии организатора // Зоол. журн. 1936. Т. 15. С. 657–673.
- Детлаф Т.А.* К вопросу о гетеровозрастной трансплантации и ее возможностях // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. 1937. Т. 16. С. 247–248.
- Детлаф Т.А.* Нейруляция у бесхвостых амфибий как комплексный формообразовательный процесс // Тр. Ин-та эксперим. морфогенеза МГУ. 1938. Т. 6. С. 187–200.
- Детлаф Т.А.* Относительное значение наружного и внутреннего слоев нервной пластинки в образовании нервной трубки у бесхвостых амфибий // ДАН СССР. 1941. Т. 31. С. 180–183.
- Детлаф Т.А.* Хордомезодермальный зачаток у *Aplysia* // Там же. 1945. Т. 50. С. 513–516.
- Детлаф Т.А.* Происхождение гипохордальной пластинки у бесхвостых амфибий // Там же. 1946. Т. 52. С. 179–182.
- Детлаф Т.А.* Условия дифференцировки эктодермы в нервную ткань, эпителии и присоску // Там же. 1947. Т. 58. С. 501–504.
- Детлаф Т.А.* Открытие зародышевых листков К.Ф. Вольфом и Х. Пандером и учение К.М. Бэра о зародышевых листках // Тр. Ин-та истории естествознания. 1953. Т. 5. С. 281–316.
- Детлаф Т.А.* Зависимость темпа дробления яиц осетровых рыб от температуры // ДАН СССР. 1953. Т. 91. С. 695–698.
- Детлаф Т.А.* Видовые различия в формообразовательных свойствах зародышевого материала и смещение гастролы относительно стадий дробления // Там же. 1956. Т. 111. С. 1149–1152.
- Детлаф Т.А.* Значение ионов кальция в процессах оплодотворения и партеногенетической активации у осетровых рыб // Журн. общ. биологии 1957. Т. 18. С. 3–16.
- Детлаф Т.А.* Учение о зародышевых листках в период становления клеточного учения // Тр. Ин-та истории естествознания. 1957. Т. 14. С. 65–97.
- Детлаф Т.А.* Кортикальные гранулы и вещества, выделяющиеся из анимальной части яйца в период активации у осетровых рыб // ДАН СССР. 1958. Т. 116. С. 341–344.
- Детлаф Т.А.* Значение ионов кальция для активации яиц лососевых рыб // Журн. общ. биологии. 1959. Т. 20. С. 341–344.
- Детлаф Т.А.* Скорость распространения импульса оплодотворения и динамика завершения второго деления созревания в яйцах осетровых рыб // ДАН СССР. 1961. Т. 140. С. 967–969.
- Детлаф Т.А.* Динамика митоза первых делений дробления в яйцах осетра и форели // Журн. общ. биологии. 1962. Т. 23. С. 401–409.
- Детлаф Т.А.* Становление организации зрелого яйца у амфибий и рыб на заключительных стадиях оогенеза, в период созревания // Современные проблемы оогенеза. М.: Наука, 1975. С. 99–144.
- Детлаф Т.А.* Дмитрий Петрович Филатов (К 100-летию со дня рождения) // Онтогенез. 1976. Т. 7. С. 427–438.
- Детлаф Т.А.* Эволюция строения эктодермы, хордомезодермы и их производных у *Amphibia* // Онтогенез. 1981. Т. 13. С. 451–460.
- Детлаф Т.А.* Институт экспериментальной биологии // Там же. 1988. Т. 19. С. 94–112.
- Детлаф Т.А.* Безразмерные критерии времени развития зародышей, личинок и куколок дрозофилы и зародышей пчелы в таблицах нормального развития // Там же. 1995. Т. 26. С. 125–131.
- Детлаф Т.А.* Температурно-временные закономерности развития пойкилотермных животных. М.: Наука, 2001.
- Детлаф Т.А., Гинзбург А.С.* Зародышевое развитие осетровых рыб (севрюги, осетра и белуги) в связи с вопросами их разведения. М.: Изд-во АН СССР, 1954.
- Детлаф Т.А., Детлаф А.А.* О безразмерных характеристиках продолжительности развития в эмбриологии // ДАН СССР. 1960. Т. 134. С. 199–202.
- Детлаф Т.А., Зубова С.Э.* Соотношение продолжительности периодов созревания и зародышевого развития у осетра и севрюги // Там же. 1962. Т. 143. С. 746–750.
- Детлаф Т.А., Никитина Л.А., Строева О.Т.* Анализ роли и специфичности зародышевого пузырька в созревании ооцитов бесхвостых амфибий путем его удаления и замещения ядрами соматических клеток // ДАН СССР. 1965. Т. 165. С. 141–143.
- Детлаф Т.А., Детлаф А.А.* Безразмерные критерии как метод количественной характеристики развития животных. Математическая биология развития. М.: Наука, 1982. С. 25–39.
- Детлаф Т.А., Гинзбург А.С.* Акросомная реакция у осетровых рыб и роль ионов кальция в соединении гамет // Там же. 1983. Т. 153. С. 1461–1464.
- Детлаф Т.А., Гинзбург А.С., Шмальгаузен О.М.* Развитие осетровых рыб: созревание, оплодотворение, развитие зародышей и предличинок. М.: Наука, 1986. 334 с.
- Детлаф Т.А., Саченко-Завадовская М.М.* Михаил Михайлович Завадовский // Онтогенез. 1991. Т. 22. С. 431–435.
- Дьюкар Э.* Клеточные взаимодействия в развитии животных / Под ред. Т.А. Детлаф. М.: Мир, 1978.
- Елизаров С.М., Рябова Л.В., Васецкий С.Г.* Актинсвязывающая казеиновая киназа в ооцитах амфибий: характеристика, идентификация и субстраты фосфорилирования // Онтогенез. 1999. Т. 30. С. 281–288.
- Игнатьева Г.М.* Ранний эмбриогенез рыб и амфибий (сравнительный анализ временных закономерностей развития). М.: Наука, 1979. 153 с.
- Мазин А.Л., Детлаф Т.А.* Зависимость продолжительности одного митотического цикла в период синхронных делений дробления (t_0) от температуры у четырех видов *Rana* и границы температур, оптимальных для их размножения и раннего развития // Онтогенез. 1985. Т. 16. С. 382–388.
- Методы биологии развития / Под ред. Т.А. Детлаф и др. М.: Наука, 1974.
- Объекты биологии развития / Под ред. Т.А. Детлаф. М.: Наука, 1975.
- Рябова Л.В., Крылышкина О.П., Васецкий С.Г.* Актинсвязывающие белки в ооцитах и яйцах шпорцевой лягушки. I. Присутствие и распределение ос-актинина и винкулина // Онтогенез. 1998. Т. 29. С. 195–199.
- Рябова Л.В., Елизаров С.М., Васецкий С.Г.* Эффекты экзогенной актинсвязывающей казеиновой киназы, инъецированной в ооциты и яйца шпорцевой лягушки // Там же. 2000. Т. 31. С. 14–20.

- Современные проблемы оогенеза / Под ред. Т.А. Детлаф. М.: Наука, 1976.
- Современные проблемы сперматогенеза / Под ред. Т.А. Детлаф. М.: Наука, 1982.
- Трубникова О.Б., Рябова Л.В. Преовуляторные изменения фолликула себрюги *Acipenser stellatus* Pall // Онтогенез. 1989. Т. 20. С. 532–542.
- Уоддингтон К.Х. Организаторы и гены / Пер. Т.А. Детлаф, Л.Д. Лиознер. М.: Иностран. лит-ра, 1947.
- Чанницкая Р.А., Детлаф Т.А. Вильгельм Гис (старший) // Онтогенез. 1993. Т. 24. С. 103–110.
- Chulitskaia E.V. Desynchronization of cell divisions in the course of egg cleavage and an attempt of experimental shift of its onset // J. Embryol. Exp. Morph. 1970. V. 23. P. 359–374.
- Dettlaff T.A. Cortical changes in acipenserid eggs during fertilization and artificial activation // J. Embryol. Exp. Morphol. 1962. V. 10. P. 1–26.
- Dettlaff T.A. Mitotic dynamics in the first cleavage divisions in the eggs of sturgeon (at various temperatures) and of trout // Exp. Cell Res. 1963. V. 29. P. 490–503.
- Dettlaff T.A. Cell divisions, duration of interkinetic states in differentiation in early stages of embryonic development // Adv. Morphogen. 1964. V. 64. P. 323–362.
- Dettlaff T.A. Action of actinomycin and puromycin upon frog oocyte transformation during maturation // J. Embryol. Exp. Morphol. 1966. V. 16. P. 183–195.
- Dettlaff T.A. A study of the properties, morphogenetic potencies and prospective fate of outer and inner layers of ectodermal and chordamesodermal regions under gastrulation in various anuran amphibians // J. Embryol. Exp. Morphol. 1983. V. 75. P. 67–86.
- Dettlaff T.A. The rate of development in poikilothermic animals calculated in astronomical and relative time units // J. Therm. Biol. 1986. V. 11. P. 1–7.
- Dettlaff T.A. Introduction: Temperature and timing in the developmental biology // Animal species for developmental studies. N.Y.: Consultants Bureau, 1991. V. 2. P. 1–14.
- Dettlaff T.A. Evolution of the histological and functional structure of ectoderm, chordamesoderm and their derivatives in Anamnia // W. Roux's Arch. Devel. Biol. 1993. V. 203. P. 3–9.
- Dettlaff T.A. Clocks for studying temporal laws of animal development // On the way to understanding the time phenomenon: The construction of time in natural science / Ed. A.P. Levich. M.: World Scientific, 1995. Pt. 1. P. 65–87.
- Dettlaff T.A., Dettlaff A.A. On relative dimensionless characteristics of the development duration in embryology // Arch. Biol. (Liege). 1961. V. 72. P. 1–16.
- Dettlaff T.A., Nikitina L.A., Stroeva O.G. The role of the germinal vesicle in oocyte maturation in anurans as revealed by the removal and transplantation of nuclei // J. Embryol. Exp. Morphol. 1964. V. 12. P. 851–873.
- Dettlaff T.A., Skoblina M.N. The role of germinal vesicle in the process of oocyte maturation in Anura and Acipenseridae // Ann. Embryol. Morphogen. 1969. Suppl. 1. P. 133–151.
- Dettlaff T.A., Davydova S.I. Differential sensitivity of cells of follicular epithelium and oocytes in the stellate sturgeon to unfavorable conditions and correlative influence of triiodothyronine // Gen. Comp. Endocrinol. 1979. V. 32. P. 236–243.
- Dettlaff T.A., Ignatieva G.M., Vassetzky S.G. The problem of time in developmental biology: its study by the use of relative characteristics of development duration // Sov. Sci. Rev. F. Physiol. Gen. Biol. 1987. V. 1. P. 1–88.
- Dettlaff T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I. Sturgeon Fishes. Developmental Biology and Aquaculture. Jena: Springer Verlag, 1993.
- Dettlaff T.A., Vassetzky S.G. Experimental Embryology in Soviet Russia; The Case of Dmitrii P. Filatov (1876–1943) // Int. J. Devel. Biol. 1997. V. 41. P. 781–787.
- Experimental Species for Developmental Studies / Eds. T.A. Dettlaff, S.G. Vassetzky. V. 1. Invertebrates. V. 2. Vertebrates. N.Y.: Consultants Bureau, 1990, 1991.
- Goncharov B.F. *In vitro* approach to studying the mechanisms of oocyte maturation in sturgeons: a review of fundamental and applied aspects // J. Appl. Ichthyol. 2002. V. 18. P. 368–374.
- Nikitina L.A. Nuclear transplantation in fish and amphibians // Sov. Sci. Rev. 1997. V. 13. Pt. 1. P. 35–72.
- Oocyte Growth and Maturation / Eds. T.A. Dettlaff, S.G. Vassetzky. N.Y.: Consultants Bureau, 1988.
- Ryabova L.V., Vassetzky S.G., Capco D.G. Development of cortical contractility in the *Xenopus laevis* oocyte mediated by reorganization of the cortical cytoskeleton: a model // Zygote. 1994a. V. 2. P. 263–271.
- Ryabova L.V., Virtanen I., Wartiovaara J., Vassetzky S.G. Contractile proteins and nonerythroid spectrin in oogenesis of *Xenopus laevis* // Mol. Reprod. Devel. 1994b. V. 37. P. 99–109.
- Ryabova L.V., Virtanen I., Olink-Coux M. et al. Distribution of prosome proteins and their relationship with the cytoskeleton in oogenesis of *Xenopus laevis* // Ibid. 1994c. V. 37. P. 195–203.
- Ryabova L.V., Vassetzky S.G. A two-component cytoskeletal system of *Xenopus laevis* egg cortex: concept of its contractility // Int. J. Devel. Biol. 1997. V. 41. P. 843–851.
- Skoblina M.N. Independence of the cortex maturation from germinal vesicle material during maturation of amphibian and sturgeon oocytes // Exp. Cell Res. 1969. V. 55. P. 142–144.
- Skoblina M.N. Role of karyoplasm in the emergence of capacity of egg cytoplasm to induce DNA synthesis in transplanted sperm nuclei // J. Embryol. Exp. Morphol. 1976. V. 36. P. 67–72.
- Skoblina M.N. Involvement of chloride channels in progesterone production during meiotic maturation of follicle-enclosed oocytes of *Rana temporaria* and *Xenopus laevis* // J. Exp. Zool. 1997. V. 278. P. 422–428.
- Skoblina M.N., Pivnitsky K.K., Kondratieva O.T. The role of germinal vesicle in maturation of *Pleurodeles waltl* oocytes induced by steroids // Cell Differ. 1984. V. 14. P. 153–157.
- Skoblina M.N., Matikainen T., Huhtaniemi I. Involvement of cAMP in inhibition of maturation of follicle-enclosed oocytes by actinomycin D in *Xenopus laevis* and *Rana temporaria* // Exp. Zool. 1995. V. 273. P. 142–148.
- Vassetzky S.G. A personal approach to embryological research in Soviet Russia: An interview with Professor Tatiana A. Dettlaff // Int. J. Devel. Biol. 1997. V. 41. P. 789–791.
- Vassetzky S.G., Skoblina M.N., Sekirina G.G. Induced fusion of echinoderm oocytes // Methods in Cell Biol. 1986. V. 27. P. 360–378.

УДК 591

ОТКРЫТИЕ ПАМЯТНОЙ ДОСКИ К.Ф. ВОЛЬФУ В ПЕТЕРБУРГСКОМ АКАДЕМИЧЕСКОМ ЦЕНТРЕ

В день науки, 8 февраля 2012 года, в здании Санкт-Петербургского научного центра Российской академии наук состоялось открытие экспозиции, посвященной академикам, прославившим Императорскую Санкт-Петербургскую академию наук в XVIII веке. Экспозицию составили 16 медальонов, на 13 из них представлены изображения академиков Д. Бернулли, Я. Германа, Ж.-Н. Делиля, Л. Эйлера, И.Г. Гмелина, Г.В. Крафта, М.В. Ломоносова, С.П. Крашенинникова, Г.В. Рихмана, К.Ф. Вольфа, А.И. Лексела, Г.Ф. Миллера и А. Каау-Бургаве. На трех медальонах даны лишь фамилии академиков, портреты которых не удалось разыскать: И. Вейбрехта, И.А. Брауна, И.А. Гильденштедта.

В конце XVIII века, когда завершалась внутренняя отделка здания Академии наук, возникло предложение поместить в конференц-зале профили наиболее прославленных умерших академиков. Каждый из действующих в то время академиков должен был представить 12 наиболее достойных имен. В итоге 19 ноября 1795 г. были отобраны имена академиков, для изображения в медальонах. Принятое Академической конференцией решение удалось осуществить спустя более чем 200 лет. Созданные медальоны поместили в одну из гостиных на первом этаже. В экспозицию помимо медальонов входит памятная доска со следующим текстом: “Во исполнение постановления Конференции Императорской Академии наук в Санкт-Петер-



Рис. 1. Медальон с изображением К.Ф. Вольфа. Портрет восстановлен А.А. Архиповым по сохранившемуся силуэту К.Ф. Вольфа (худ. Антинг, 1784 г.).



Рис. 2. Общий вид экспозиции.

бурге (Академической конференции) от 19 ноября 1795 г. в рамках Научной программы Санкт-Петербургского научного центра Российской академии наук медальоны изготовлены скульптором А.А. Архиповым и установлены 8 февраля 2012 г.”.

Побудительным мотивом этого события послужило решение об увековечивании памяти Каспара Фридриха Вольфа, принятое Международной конференцией, посвященной 275-летию эмбриолога К.Ф. Вольфа и 250-летию обоснования им

концепции эпигенеза (председатель оргкомитета – проф. А.К. Дондуа, президент Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей), прошедшей в СПбНЦ РАН в 2009 г. Историческая справедливость потребовала вернуться к решению Академии 1795 г. и выполнить его в полном объеме.

*к.и.н. Е.А. Иванова,
начальник Отдела организации
научных исследований СПбНЦ РАН*