

	Название статьи	Страницы	Цит.
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ			
<input type="checkbox"/>	ВОЗРАСТНЫЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МИОЭНДОКРИННЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА У КРЫС В НОРМЕ И ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ Коростышевская И.М., Максимов В.Ф.	77	2
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ			
<input type="checkbox"/>	РОЛЬ ЭТИЛЕНА В РЕГУЛЯЦИИ ГАМЕТОФИТНО-СПОРОФИТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПЕТУНИИ (PETUNIA HYBRIDA L.) Ковалева Л.В., Тимофеева Г.В., Родионова Г.Б., Захарова Е.В., Ракитин В.Ю.	91	1
<input type="checkbox"/>	РОСТ И РАЗВИТИЕ ОГУРЦА CUCUMIS SATIVUS L. В ПРЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПЕРИОД В УСЛОВИЯХ ДЛИННЫХ ФОТОПЕРИОДОВ Шиббаева Т.Г., Марковская Е.Ф.	101	0
<input type="checkbox"/>	МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН А INTEGUMENTA РАПСА ПОД КОНТРОЛЕМ ПРОМОТОРА ВИРУСА МОЗАИКИ ГЕОРГИНА Кулуев Б.Р., Князев А.В., Чемерис А.В., Вахитов В.А.	110	1
ФИЗИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ			
<input type="checkbox"/>	ЭСТАФЕТНЫЙ СПОСОБ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ ГИДРОПЛАЗМЫ В КОЛОНИЯХ ГИДРОИДНЫХ ПОЛИПОВ Бурыкин Ю.Б.	115	0
РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И УСТАНОВЛЕНИЕ СВЯЗЕЙ			
<input type="checkbox"/>	РАЗВИТИЕ ХАБЕНУЛО-ИНТЕРПЕДУНКУЛЯРНОГО ТРАКТА У КРЫС Клепуков А.А., Макаренко И.Г.	126	0
КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ			
<input type="checkbox"/>	ЭКСТРАТИМИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И АНТИГЕНРАСПОЗНАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ α β-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ У МЫШЕЙ Куклина Е.М., Ширшев С.В., Глебездина Н.С.	136	0
ХРОНИКА			
<input type="checkbox"/>	IV СЪЕЗД ЕВРОПЕЙСКОГО ОБЩЕСТВА ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ: ОТ EVO-DEVO К НОВОМУ ЭВОЛЮЦИОННОМУ СИНТЕЗУ И ШИРОКОМАСШТАБНОМУ СРАВНИТЕЛЬНОМУ АНАЛИЗУ ПРОЦЕССОВ РАЗВИТИЯ Козин В.В.	141	0

ВОЗРАСТНЫЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МИОЭНДОКРИННЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА У КРЫС В НОРМЕ И ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

© 2013 г. И. М. Коростышевская, В. Ф. Максимов

НИИ физиологии СО РАМН,

630117 Новосибирск, ул. Тимакова, д. 4

E-mail: kor@physiol.ru

Поступила в редакцию 11.05.12 г.

Окончательный вариант получен 01.11.12 г.

Проведено качественное и количественное ультраструктурное исследование кардиомиоцитов правого предсердия у крыс линии ВАГ (контроль) и линии НИСАГ (с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией) в разном возрасте: 18-е сутки эмбриогенеза, 12-е и 21-е сутки после рождения, на 6-м и 13-м месяцах жизни. Показано, что у эмбрионов на фоне незавершенного морфогенеза предсердий в миоэндокринных клетках уже активно формируются, накапливаются и растворяются секреторные гранулы, содержащие натрийуретические пептиды. По ходу постнатального онтогенеза в клетках предсердий происходит накопление секреторного продукта. На всех изученных этапах онтогенеза у крыс гипертензивной линии в миоэндокринных клетках численная плотность гранул выше и качественный состав их более разнообразный, чем в контроле. Установлено, что в предсердных миоцитах крыс линии НИСАГ морфологические признаки гиперсекреции натрийуретических пептидов предшествуют генетически запрограммированному повышению артериального давления. У взрослых гипертензивных крыс гипертрофические и дегенеративные изменения миоцитов сочетаются с избыточным накоплением секреторных гранул, часть которых подвергается внутриклеточной деградации.

Ключевые слова: натрийуретические пептиды, правое предсердие, кардиомиоцит, онтогенез, крыса.

DOI: 10.7868/S0475145013020043

Сердце как центральный орган гемодинамики изучается всеми доступными средствами со времен Гарвея уже более трех веков. Естественно, что экспериментаторы и клиницисты всегда концентрировали свое внимание на структуре, функциях и патологии самых гемодинамически нагруженных отделов — желудочках, а правым предсердием традиционно интересовались электрофизиологи и аритмологи. Интерес научного сообщества к особенностям строения и функциям предсердных миоцитов оживился 30 лет назад, когда было обнаружено, что в их секреторных гранулах синтезируются и накапливаются биологически активные пептиды, обладающие выраженным натрийуретическим, диуретическим и гипотензивным действием (de Bold et al., 1981). Пик исследований гормональной активности сердца пришелся на 90-е годы прошлого столетия, когда в модельных экспериментах и клинической практике преимущественно иммуно- и биохимиче-

скими методами были получены фундаментальные сведения об этом регуляторном звене, антагонистичном прессорным системам. Все достижения новейших молекулярных, генетических и иммунологических технологий, представляя ценную информацию по нокаутным линиям животных, по молекулярной структуре пептидов и их рецепторов, по фармакокинетике в норме и патологии, остаются неполными без соответствующего морфологического контроля и привязки к определенным структурам. Морфологические исследования требуют применения электронной микроскопии, поскольку диаметр секреторных гранул в мышечных клетках предсердий не превышает 500 нм. Морфологических исследований натрийуретической системы сердца на этапах онтогенеза практически нет, а имеющиеся молекулярно-генетические и биохимические данные очень разрозненные (Deloof et al., 1995; Cameron, Ellmers, 2003; Zhang, Pasumarthi,

2007). Достижения и проблемы современного состояния знаний о натрийуретических пептидах сердца и их взаимодействий с известными вазоконстрикторными гормональными системами регуляции гемодинамики обобщены в авторских обзорах (Максимов, Коростышевская, 2011; Коростышевская, Максимов, 2012).

Растяжение предсердия повышенным давлением и/или объемом крови – сильнейший специфический стимул для выделения накопленных натрийуретических пептидов из миоцитов и синтеза их *de novo*. Установлено, что у взрослых крыс в любой модели артериальной гипертензии (спонтанная, вазоренальная, при солевой нагрузке и аорто-кавалых анастомозах и др.) экспрессия генов натрийуретических пептидов в сердце и концентрация гормонов в крови повышены (Avramovitch et al., 1995; de Bold et al., 1996; Nakayama, 2005; Рахчеева, Бугрова, 2010). Интерес к проблеме поддерживается тем, что и у больных с эссенциальной или вторичной гипертензией, застойной сердечной недостаточностью, ишемической болезнью сердца, хронической почечной недостаточностью, а также при других сердечно-сосудистых и гемодинамических нарушениях концентрация сердечных натрийуретических пептидов в плазме крови также значительно повышена (Wopow, 1996; Kawakami et al., 1996). Почему у таких больных с высоким артериальным давлением и отеками натрийуретические пептиды избыточны, но неэффективны? Этот гормональный парадокс ждет своего объяснения (Vesely, 2001, 2006, 2007). Является ли гиперсекреция компенсаторной реакцией на нарушение гемодинамики, когда и как начинают реагировать предсердные миоциты на гемодинамические нарушения или другие стимулы – остается совершенно неизвестным. Для решения этих проблем необходимы исследования на ранних стадиях онтогенеза с использованием адекватных экспериментальных моделей.

Цель исследования – описать ультраструктурные особенности становления и функционирования предсердных миоцитов на ключевых этапах онтогенеза у крыс в норме и при наследственной гипертензии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Крыс линии ВАГ (нормотензивный контроль) и гипертензивной линии НИСАГ содержали в стандартных условиях вивария с водой и пищей без ограничения. Линия крыс НИСАГ с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией как модель эссенциальной ги-

пертонии была получена в Институте цитологии и генетики СО РАН путем селекции на основе аутбредной линии Вистар (Маркель, 1985). Морфологические признаки гипертрофии левого желудочка появляются в возрасте с 3-й по 5-ю недели постнатальной жизни (Шмерлинг и др., 1997), когда генетически закрепленная гиперчувствительность к стрессу проявляется в стойком повышении артериального давления (Маслова и др., 1996).

Ультраструктуру миокарда правого предсердия изучали на 5 стадиях онтогенеза: у эмбрионов на 18-е сутки развития, у крысят в период молочного вскармливания на 12-е и 21-е сутки жизни, у самцов на 6-м и 13-м месяцах жизни (5–6 животных в каждой группе). У половозрелых животных измеряли систолическое базальное артериальное давление сфигмографическим методом на хвосте (tail-cuff method) на фоне кратковременного эфирного рауш-наркоза, что позволило избежать влияния психического стресса, связанного с процедурой измерения. Животных умерщвляли под эфирным наркозом гильотинированием согласно “Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных” и директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС). Определяли массу тела и сердца.

Для электронно-микроскопического исследования ушко правого предсердия (у эмбрионов – целиком предсердие) фиксировали в растворе 2.5% глутарового альдегида и 2% параформа, дофиксировали в 1.5% растворе OsO₄, заливали в смесь эпона с аралдитом. Ультратонкие продольные срезы миокарда контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония), фотографировали камерой Veleta 4 Mpx (Olympus, Япония). В пакете iTEM 5.1 (Olympus, Япония) измеряли размеры кардиомиоцитов в области ядра и диаметры секреторных гранул в них. Не менее чем на 15 случайных полях зрения каждого образца при увеличении ×10000 с помощью квадратной тестовой решетки с шагом 1 мкм определяли относительные объемы органоидов в цитоплазме кардиомиоцитов, подсчитывали численную плотность секреторных гранул. Статистическую обработку вариационных рядов и проверку их на нормальность распределения проводили в пакете Statistica 6.0. Результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего ($M \pm m$). Достоверность различий с контролем определяли *t* критерием Стьюдента для $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика предсердных миоцитов на ранних этапах онтогенеза

18-е сутки эмбриогенеза. У эмбрионов крыс линии ВАГ за три дня до рождения миокард правого предсердия настолько тонкий, что иногда представлен лишь 2–3-мя рыхлыми слоями мышечных клеток на разных стадиях дифференцировки. В более дифференцированных кардиомиоцитах вдоль длинной оси располагаются 1–2 пучка миофибрилл с четкими саркомерами. Значительная часть цитоплазмы заполнена скоплениями пылевидного гликогена с локусами резорбции. На срезах обнаруживается достаточно много митохондрий, встречаются фрагменты шероховатой сети, часто попадает центриоль. Около полюсов ядра располагаются 2–3 пластинчатых комплекса из уплощенных цистерн. Секреторные гранулы со средним диаметром 180 нм, содержащие натрий-уретические пептиды, группируются преимущественно в околоядерной зоне (рис. 1а). Если гранул в клетке много, то они встречаются и в зоне миофибрилл, и под сарколеммой. Ультраструктурные морфометрические параметры таких предсердных миоэндокринных клеток представлены в табл. 1. В малодифференцированных клетках секреторных гранул или нет совсем или они единичные и очень мелкие.

Секреторные гранулы представляют собой на срезах строго округлые тельца с электронноплотной сердцевиной, окруженной одинарной мембраной. Такие гранулы обозначали как “зрелые” формы. Если края гранул на срезе выглядели размытыми и неровными, сердцевины – неравномерной и сниженной плотности без четкой ограничительной мембраны, то их относили к растворяющимся формам. Электронно-плотное вещество без четких границ в расширенных цистернах пластинчатого комплекса рассматривали как формирующиеся гранулы (рис. 1в). При подсчетах в эту группу относили также мелкие гранулы с четким светлым ободком под мембраной, располагающиеся в зоне Гольджи. Такая классификация оказалась достаточно информативной и успешно используется в морфологических исследованиях (Avramovitch et al., 1995; Azizov, Muradova, 2003; Tilkova et al., 2008; Рахчеева, Бугрова, 2010 и др.).

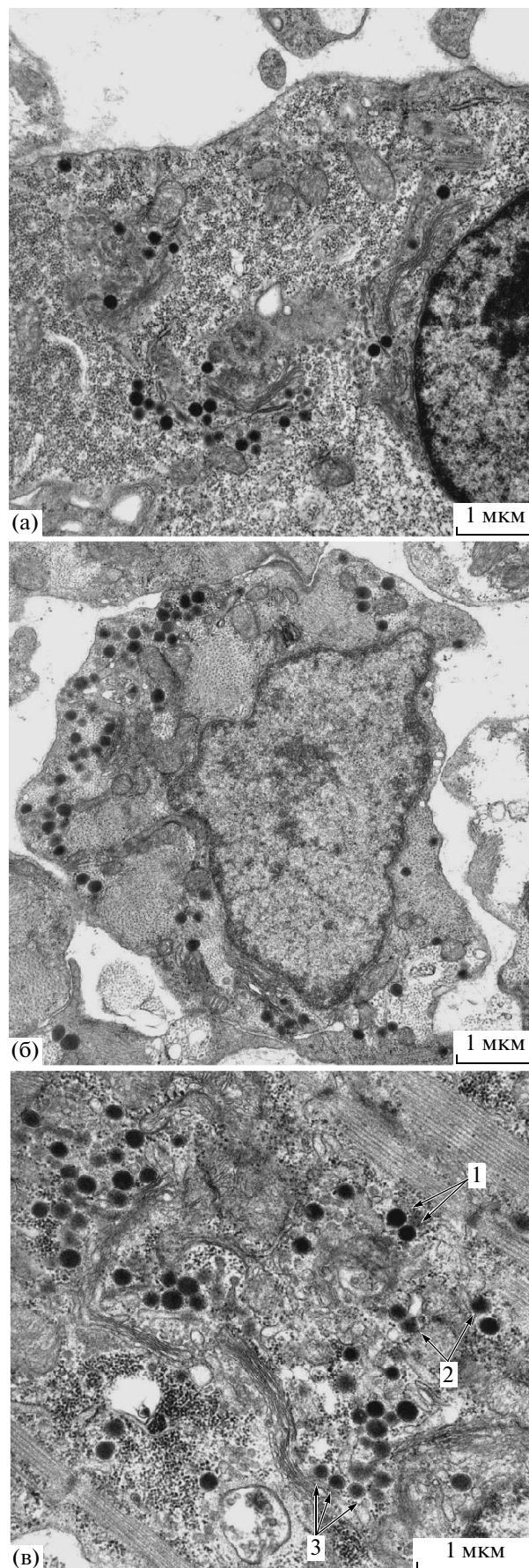


Рис. 1. Хорошо развитые пластинчатые комплексы и разнообразные секреторные гранулы в дифференцирующихся миоэндокринных клетках правого предсердия у 18-суточных эмбрионов крыс линий ВАГ (а, в) и НИСАГ (б). Разновидности гранул: 1 – зрелые, 2 – растворяющиеся, 3 – формирующиеся. Электронограммы. Масштаб 1 мкм.

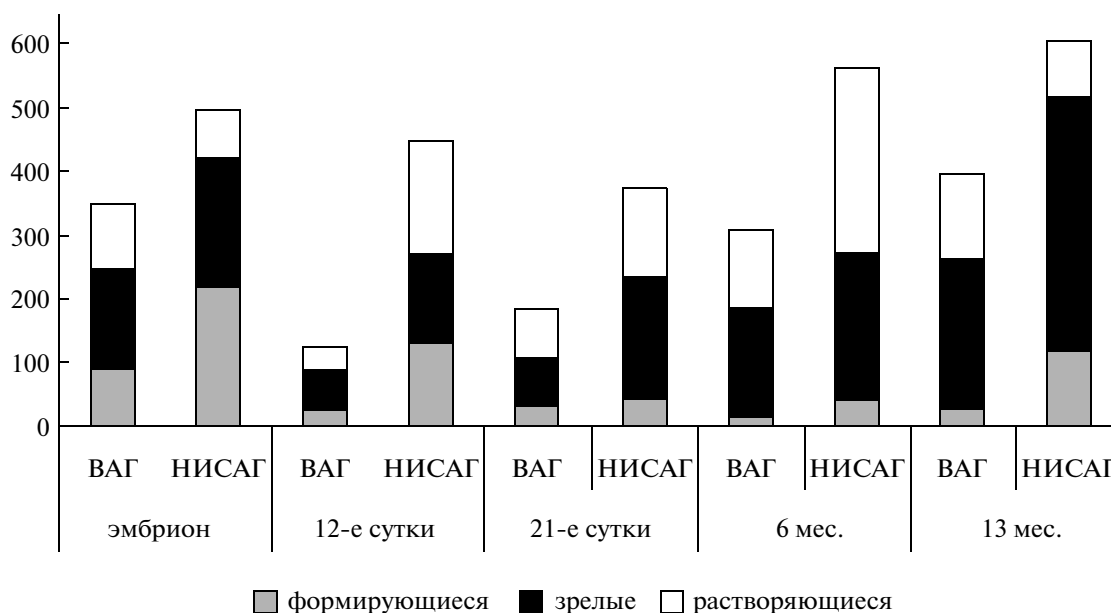


Рис. 2. Динамика численной плотности (на 1000 мкм²) и состава секреторных гранул в кардиомиоцитах правого предсердия в онтогенезе у крыс линий ВАГ и НИСАГ.

Анализ гранулярного пула в клетках предсердия эмбрионов линии ВАГ показал, что около половины их – это зрелые формы, а остальные составляют приблизительно поровну формирующиеся и растворяющиеся формы (рис. 2).

Эмбрионы крыс линии НИСАГ на том же сроке беременности отстают в росте. Их масса тела в два раза меньше, чем в контроле, причем это не связано с количеством плодов у конкретной самки. Самые яркие качественные и статистически достоверные количественные различия в композиции миоэндокринных клеток у эмбрионов гипертензивной линии по сравнению с контролем касаются их секреторного аппарата (табл. 1). На продольных срезах клеток около ядра можно насчитать до 5–7 пластинчатых комплексов, формирующих обширную секреторную зону в два раза большую по относительному объему, чем у эмбрионов ВАГ. Цистерны Гольджи неравномерно расширены, в них располагается рыхлое вещество и более плотные скопления – формирующиеся гранулы. Множество разнообразных пузырьков и вакуолей, фрагменты шероховатой сети, обилие свободных рибосом и полисом дополняют картину активных синтетических процессов. Хотя количество секреторных гранул сильно варьирует в соседних клетках, в среднем их в полтора раза больше, чем в контроле, они располагаются по всей цитоплазме мышечных клеток и даже скапливаются между миофибриллами и под сарколеммой (рис. 1б). По размеру они достоверно

мельче, чем у эмбрионов ВАГ, но суммарно занимают в клетке такой же относительный объем (табл. 1). При анализе качественного состава гранул обнаруживается, что преобладают формирующиеся и зрелые формы, а растворяющихся гранул относительно мало (рис. 2).

Можно заключить, что у эмбрионов крыс в миокарде предсердий еще до полной дифференцировки клеток происходит активный синтез, накопление и выделение секреторного продукта – натрийуретических пептидов. О функциональной реактивности этой системы свидетельствует то, что на тех же стадиях дифференцировки в миоцитах крыс гипертензивной линии НИСАГ накапливается больше секреторных гранул, чем в контроле. Состав гранул свидетельствует о более активном синтезе и очень быстром выделении секреторного продукта, то есть о повышенной потребности организма эмбриона в регуляторных пептидах.

12-е сутки постнатальной жизни. На этом этапе онтогенеза крысята находятся строго на молочном вскармливании, они еще слепые, но уже обрастают шерстью. Исследование показало, что миокард предсердия крысят линии ВАГ представлен тонкими пластами мышечных клеток, достаточно плотно сцепленных друг с другом. Хотя средний диаметр клеток в зоне ядра (около 6 мкм) не меняется с конца эмбриогенеза, объем цитоплазмы значительно увеличивается за счет изменения формы клеток: клетки сильно вытянуты в

Таблица 1. Параметры кардиомиоцитов правого предсердия крысят линий ВАГ и НИСАГ на ранних этапах онтогенеза

Параметр	Эмбрион 18-е сутки		12-е сутки жизни		21-е сутки жизни	
	ВАГ (6)	НИСАГ (6)	ВАГ (6)	НИСАГ (6)	ВАГ (6)	НИСАГ (5)
Масса тела, г	2.7 ± 0.11	1.2 ± 0.03*	20.9 ± 0.90	16.2 ± 0.90*	28.4 ± 0.78	34.6 ± 0.76*
Масса сердца, мг	—	—	109.2 ± 9.9	125.0 ± 9.6	141.7 ± 5.58	191.7 ± 4.77*
Масса сердца/тела, мг/г	—	—	5.2 ± 0.33	7.7 ± 0.38*	5.0 ± 0.24	5.5 ± 0.03
Диаметр клеток, мкм	6.0 ± 0.09 (195)	5.9 ± 0.07 (195)	6.0 ± 0.09 (269)	7.3 ± 0.1* (277)	6.0 ± 0.10 (216)	7.4 ± 0.15* (178)
Относительный объем, %	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(61)
Миофибриллы	37.5 ± 0.64	36.1 ± 0.6	47.9 ± 0.38	47.1 ± 0.62	51.2 ± 0.41	50.9 ± 0.42
Митохондрии	19.3 ± 0.54	16.7 ± 0.58*	36.8 ± 0.4	35.5 ± 0.64	39.5 ± 0.42	35.9 ± 0.56*
Гликоген	23 ± 0.79	22 ± 0.9	4.5 ± 0.17	3.0 ± 0.17*	1.5 ± 0.15	1.5 ± 0.14
Комплекс Гольджи	2.9 ± 0.21	6.0 ± 0.31*	1.7 ± 0.22	3.7 ± 0.28*	1.7 ± 0.14	3.7 ± 0.21*
Гранулы	1.9 ± 0.17	2.0 ± 0.16	1.1 ± 0.13	2.8 ± 0.2*	1.3 ± 0.11	3.3 ± 0.19*
Другие органоиды	15.8 ± 0.54	17.4 ± 0.62*	8.0 ± 0.29	7.85 ± 0.31	4.8 ± 0.27	4.7 ± 0.30
Диаметр гранул, нм	180 ± 2.3 (382)	143 ± 1.9*(303)	229 ± 5.7 (293)	211 ± 4.4 (247)*	227 ± 3.0 (293)	251 ± 3.2*(270)
зрелые	206 ± 2.1 (171)	173 ± 1.5* (121)	230 ± 4.5 (133)	255 ± 4.9 (75)*	250 ± 3.9 (111)	274 ± 4.1* (135)
растворяющиеся	170 ± 3.7 (115)	144 ± 3.6* (49)	223 ± 7.6 (87)	189 ± 3.9 (93)*	227 ± 4.4 (129)	240 ± 3.9* (104)
формирующиеся	144 ± 3.2 (96)	115 ± 2.0* (132)	148 ± 5.9 (55)	174 ± 4.5 (74)*	179 ± 5.7 (53)	176 ± 6.3 (31)
атипичные	—	—	496 ± 26 (18)	520 ± 33 (5)	—	547 ± 43 (7)

В скобках — число измерений, * межлинейные различия достоверны при $p < 0.05$.

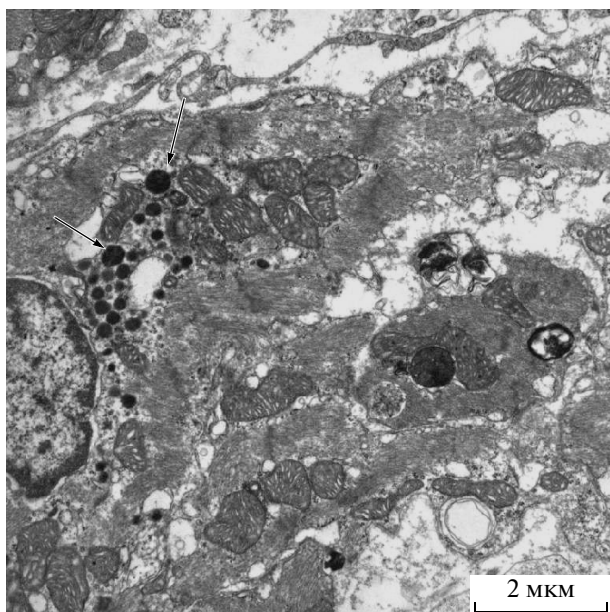


Рис. 3. Атипичные крупные гранулы (стрелки) и миелоноподобные тельца в цитоплазме миоэндокринной клетки правого предсердия у 12-суточного крысенка линии ВАГ. Электронограмма. Масштаб 2 мкм.

длину, сужены на концах, овальные ядра располагаются в центре. Внутренняя композиция мышечных клеток предсердия имеет свои особенности: сформированные миофибриллы заполняют периферию клеток, а широкое пространство около полюсов ядра заполнено крупными митохондриями с многочисленными кристами (табл. 1). Часто встречаются разнообразные вакуоли, лизосомы, миелоноподобные тельца. Количество секреторных гранул в одной группе клеток варьирует в очень широких пределах: в одних — гранулы в срез не попадают, зато в них больше миофибрилл и они потоньше, а рядом могут располагаться клетки с большим количеством гранул и крупным пластинчатым комплексом. Складывается впечатление, что клетки подразделяются на чисто сократительные и миоэндокринные, но насколько эта дифференцировка необратимая, судить невозможно.

Секреторных гранул в миоэндокринных клетках у крысят линии ВАГ мало. Они крупные (в среднем около 230 нм в диаметре), часто неправильной формы, даже в “зрелых” гранулах электронная плотность сердцевины под мембраной снижена и приобретает зернистую структуру. Зрелые секреторные гранулы составляют половину гранулярного пула, формирующихся гранул мало (табл. 1, рис. 2). Кроме того, в цитоплазме обнаруживаются “атипичные” структуры — крупные тельца округлой или слегка неправильной формы

диаметром около 500 нм, похожие на очень крупные гранулы или первичные лизосомы, или слившиеся гранулы, или на гранулы, поглощенные лизосомами (рис. 3). Возможно, это — отражение внутриклеточного избытка и утилизации путем аутофагии (кринофагии) накопленного и невыделенного секрета.

У крысят линии НИСАГ на 12-е сутки жизни, несмотря на низкую среднюю массу тела, относительный вес сердца и диаметр кардиомиоцитов правого предсердия достоверно больше, чем у крысят линии ВАГ (табл. 1). При этом внутренняя композиция клеток по содержанию миофибрилл и митохондрий у крысят обеих линий практически не различается. Однако у крысят гипертензивной линии относительный объем секреторных структур (пластинчатого комплекса и гранул) в два с лишним раза больше, чем у одновозрастного контроля, при меньшем содержании в цитоплазме свободного гликогена. Детальное морфологическое и морфометрическое исследование секреторных гранул показало, что количество гранул в миоэндокринных клетках в 3.5 раза больше, а их средний диаметр меньше, чем у одновозрастного контроля (табл. 1). Однако если проанализировать размеры гранул по морфологическим разновидностям, то видно, что в клетках у крысят гипертензивной линии преобладают более мелкие формирующиеся и растворяющиеся разновидности, которых в общей сложности около 70%. Лишь 30% гранул составляют зрелые формы (рис. 2), которые достоверно крупнее, чем у контрольных животных (табл. 1). Кроме того, у крысят линии НИСАГ в саркоплазме было обнаружено значительно меньше (5 против 18) атипичных гранул. Эти данные принято интерпретировать как отражение активного синтеза и усиленного (экстренного) выделения секрета.

21-е сутки жизни. К трехнедельному возрасту крысята переходят на самостоятельное питание, но еще не достигают половой зрелости.

У крысят линии ВАГ за 10 дней, прошедшие с предыдущего срока исследования, увеличение массы тела сопровождается пропорциональным увеличением массы сердца и неизменным размером кардиомиоцитов правого предсердия. В клетках сохраняется стабильное (на уровне 1.3) объемное соотношение основных клеточных органоидов — миофибрилл и митохондрий. Насыщение цитоплазмы клеток этими структурами сопровождается закономерным уменьшением содержания в ней гликогена (табл. 1). Достаточно стабильными остаются средние размеры и состав секреторных гранул. Их количество в миоэндокринных клетках на треть больше, чем у малень-

ких крысят, но вдвое меньше, чем у эмбрионов (рис. 2).

Принципиально иная динамика рассмотренных параметров обнаруживается у крысят линии НИСАГ за 10-дневный период с 12-е по 21-е сутки жизни. Прежде всего, у них происходит очень быстрый прирост массы тела (в 2.2 раза при 1.4 у крысят ВАГ). Поскольку прирост массы сердца не столь значительный (в 1.5 раза), межлинейных различий по относительной массе органа на этом этапе жизни нет. Сохраняются различия по диаметру миоэндокринных клеток и их внутренней композиции. У крысят НИСАГ более крупные клетки содержат много достаточно толстых миофибрилл, между которыми относительно мало митохондрий (табл. 1). Секреторные гранулы и пластинчатые комплексы встречаются чаще и занимают больший объем в цитоплазме миоэндокринных клеток, чем у крысят нормотензивной линии (суммарно 7 и 3% соответственно). Гранулы крупные (в среднем 250 нм, а зрелые – более 270 нм в диаметре), они часто имеют неправильные очертания за счет “растворения” с одной или нескольких сторон, можно наблюдать гранулы и их фрагменты в составе аутофагосом. В гранулярном пуле обнаруживается подавляющее преобладание крупных зрелых и растворяющихся разновидностей, лишь 11% составляют формирующиеся формы (рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что у крысят НИСАГ к концу периода молочного вскармливания гипертрофированные предсердные кардиомиоциты имеют ультраструктурные признаки повышенной секреторной активности. По сравнению с предыдущим этапом онтогенеза (12-е сутки жизни) в клетках изменяется соотношение процессов синтеза, накопления и выделения секреторного продукта. Пептиды накапливаются в гранулах (их размер увеличивается), интенсивность синтетических процессов снижается, 2.5% от общего количества гранул составляют атипичные крупные формы со средним диаметром более 500 нм, которые у контрольных животных в этом возрасте отсутствуют.

Особенности миоэндокринных клеток у половозрелых крыс

6-месячные самцы. Сердце самых распространенных лабораторных животных – белых крыс – изучено подробно всеми возможными методами. Что касается морфологии, то анатомия, гистология, гистохимия и ультраструктура желудочков сердца неоднократно описаны, их многочисленные параметры измерены как в норме, так и при

патологии в клинике и эксперименте. Клетки предсердий у взрослых животных исследованы хуже, но их описания можно найти в соответствующей литературе (Румянцев, 1982; Лапша и др., 2005; Волкова и др., 2006, Chimenti et al., 2010). В данном разделе мы остановимся лишь на особенностях клеток правого предсердия у самцов-гипертоников линии НИСАГ. Гипертрофия в сердце у этих животных по сравнению с нормотензивными одновозрастными самцами проявляется на всех уровнях: по относительной массе сердца, по размеру клеток (в 1.5 раза больше средний диаметр), по содержанию миофибрилл. Во внутриклеточной архитектонике обнаруживаются те же диспропорции, какие были отмечены у неполовозрелых животных в конце первого месяца жизни: в цитоплазме относительно мало митохондрий (объемное отношение миофибрилл и митохондрий 2.4 против 1.95 в контроле), а секреторный аппарат (пластинчатые комплексы и гранулы) занимает в 1.5 раза больший относительный объем, чем в контроле (табл. 2). Межлинейных различий по размеру гранул у взрослых животных нет, но количество их у животных-гипертоников почти вдвое больше, а потому они располагаются не только в околядерной зоне, но и между миофибриллами и под сарколеммой (рис. 2, 4а, 4б). Чаще чем в контроле среди гранул встречаются различные атипичные разновидности. В некоторых клетках преобладают гранулы с фрагментарным растворением (исчезновением) электронноплотной сердцевинки, что придает гранулам неправильные и причудливые очертания. В крупных скоплениях гранул встречается мелкозернистое перерождение сердцевинки гранул, их слияние и превращение в конгломераты по типу крупных лизосом. В части клеток наблюдается равномерное снижение электронной плотности сердцевинки гранул с исчезновением подмембранной ободки при сохранении целостности окружающей мембраны. Миелоноподобных телец вообще много в цитоплазме кардиомиоцитов, но особенно их много около или в составе крупных гранулярных скоплений. Все это выражается в значительном преобладании растворяющихся разновидностей гранул (более 50%) в общем гранулярном пуле клеток на этом этапе онтогенеза, что очевидно из рис. 2.

Ранее нами было показано, что ядра в предсердных кардиомиоцитах у взрослых крыс линии НИСАГ содержат больше эухроматина и больше пор в оболочке, чем у контрольных животных (Максимов и др., 2004). Перечисленные морфологические и морфометрические данные дают возможность сделать заключение, что у крыс-ги-

Таблица 2. Параметры кардиомиоцитов правого предсердия взрослых крыс линий ВАГ и НИСАГ

Параметр	6 месяцев		13 месяцев	
	ВАГ (6)	НИСАГ (5)	ВАГ (6)	НИСАГ (5)
Артериальное давление, мм рт.ст.	121 ± 4	179 ± 2.5*	120 ± 6	178 ± 1*
Масса тела, г	376 ± 6.1	362 ± 12	389 ± 4.2	407 ± 12
Масса сердца, мг	1228 ± 30	1365 ± 83	1023 ± 15	1476 ± 25*
Масса сердца/тела, мг/г	3.27 ± 0.08	3.78 ± 0.20*	2.63 ± 0.02	3.63 ± 0.08*
Диаметр клеток, мкм	7.8 ± 0.11 (227)	11.8 ± 0.40* (188)	8.1 ± 0.11 (142)	13.1 ± 0.18* (149)
Относительный объем, %	(60)	(57)	(50)	(50)
Миофибриллы	56.3 ± 0.48	61.5 ± 0.71*	55.4 ± 0.67	52.3 ± 0.77*
Митохондрии	29.0 ± 0.53	25.3 ± 0.57*	31.3 ± 0.57	29.6 ± 0.54*
Гликоген	2.8 ± 0.18	1.5 ± 0.18*	—	—
Комплекс Гольджи	1.3 ± 0.14	2.1 ± 0.15*	2.2 ± 0.22	3.3 ± 0.26*
Гранулы	2.7 ± 0.31	3.7 ± 0.28*	4.2 ± 0.33	8.6 ± 0.50*
Другие органоиды	8.2 ± 0.39	5.9 ± 0.47*	6.9 ± 0.42	6.2 ± 0.50
Диаметр гранул, нм	252 ± 5.3 (241)	255 ± 4.9 (249)	307 ± 4.3 (247)	306 ± 5.5 (264)
зрелые	269 ± 4.9 (122)	277 ± 7.0 (103)	334 ± 4.6 (147)	354 ± 4.6* (171)
растворяющиеся	241 ± 10 (109)	250 ± 6.4 (130)	283 ± 6.4 (84)	271 ± 8.8 (41)
формирующиеся	167 ± 12.7 (10)	149 ± 7.7* (16)	186 ± 9.1 (16)	176 ± 3.9 (52)

В скобках – число измерений, * межлинейные различия достоверны при $p < 0.05$.

пертоников с повышенной стресс чувствительностью в предсердных кардиомиоцитах имеется выраженная стойкая секреторная гиперфункция.

13-месячные самцы. У крыс линии ВАГ за второе полугодие жизни существенных изменений артериального давления и массы тела не происходит. Абсолютная и относительная масса сердца уменьшается, однако на размерах и композиции предсердных миоцитов это не отражается. На этом фоне морфологически и морфометрически регистрируются ультраструктурные признаки усиления секреторной активности клеток: более развиты пластинчатые комплексы, достоверно больше секреторных гранул в цитоплазме и они крупнее (табл. 2). Как и у полугодовалых животных преобладают зрелые формы гранул, меньше рас-

творяющихся и формирующихся разновидностей (рис. 2). В цитоплазме, особенно в околоядерном пространстве, встречаются крупные митохондрии и конгломераты дегенерирующих гранул. Они представляют собой элетронноплотные зернистые образования без ограничительной мембраны неправильной формы. Иногда наблюдается тесный контакт этих структур и их слияние с секреторными гранулами, имеющими, как правило, неоднородную зернистую сердцевину (рис. 5).

К годовалому сроку крысы-самцы линии НИСАГ приобретают физиологические и поведенческие признаки глубокой старости, многие до этого срока не доживают. При вскрытии – сердце очень большое с расширенными камерами и дряблое. Кардиомиоциты предсердия сильно

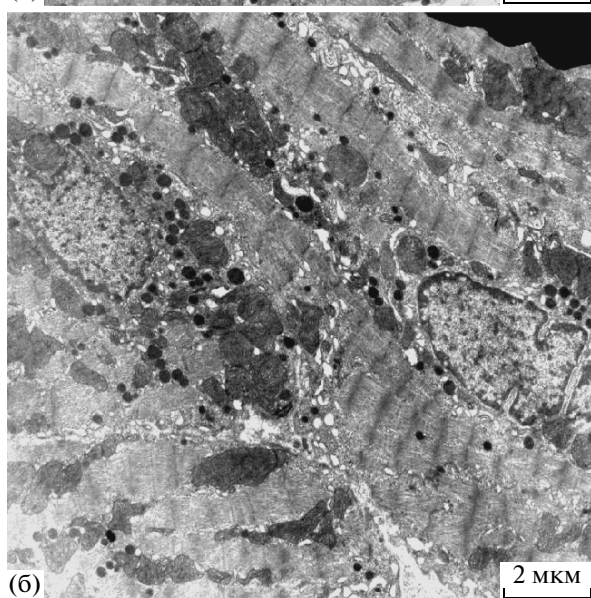
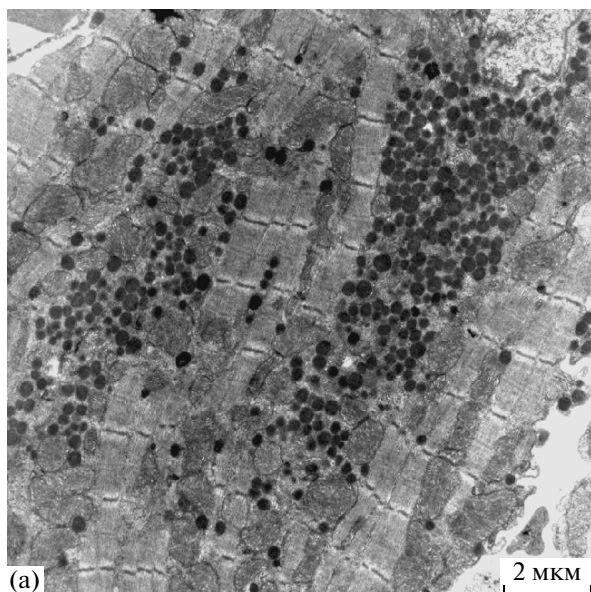


Рис. 4. Накопление разнообразных по форме и электронной плотности секреторных гранул в гипертрофированных предсердных миоцитах у 6-месячных гипертензивных крыс линии НИСАГ (а) и у нормотензивных контрольных крыс линии ВАГ (б). Электронограммы. Масштаб 2 мкм.

гипертрофированы с непараллельным ходом миофибрилл по длинной оси клетки. Во многих клетках имеются признаки вакуольной дистрофии. Митохондрий не много, но они очень крупные. Значительно чаще, чем в контроле, встречаются митохондрии с циркулярно закрученными кристами. Многочисленные миелоноподобные тельца располагаются в цитоплазме мышечных клеток, встречаются под сарколеммой, иногда видны свободно в интерстиции или в макрофа-

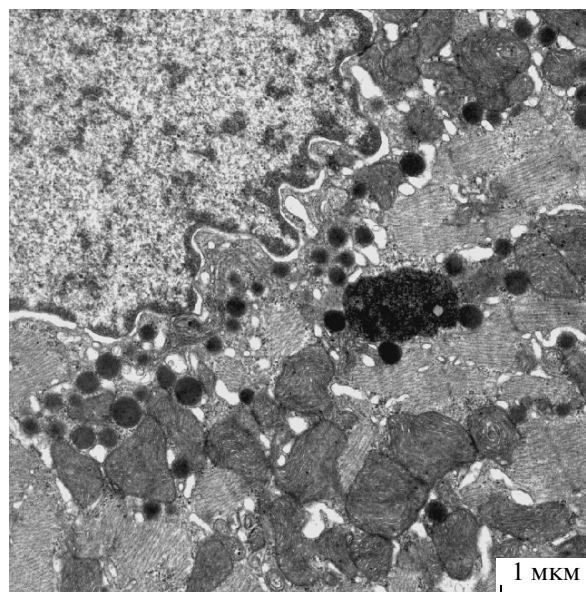


Рис. 5. Крупные секреторные гранулы, их слияние и внутриклеточная деградация в окооядерном пространстве миоэндокринной клетки правого предсердия у крысы ВАГ на 13-м месяце жизни. Электронограмма. Масштаб 1 мкм.

гальных клетках, обнаруживаются и в просвете сосудов.

Некоторые миоэндокринные клетки крыс-гипертоников на втором году жизни просто переполнены многочисленными секреторными гранулами, которые образуют плотные скопления у полюсов ядра, цепочками располагаются между миофибриллами и под сарколеммой. В соседних клетках гранул может быть меньше, они могут отличаться по размерам и распределению. Удивительно то, что в этом возрасте у крыс НИСАГ все ультраструктурные признаки свидетельствуют об активном синтезе секреторного продукта — в клетках очень крупные комплексы Гольджи, около которых среди многочисленных пузырьков и вакуолей обнаруживаются все последовательные этапы формирования гранул. Подавляющее большинство гранул представлено зрелыми формами, но имеются все ультраструктурные разновидности гранул по степени зрелости и по механизму деградации, описанные выше (рис. 2). Особенно характерно слияние гранул и их деградация *in situ* в структуры, похожие на лизосомы или остаточные тельца. Такие формы внутриклеточной дегенерации секреторного продукта в клетках гипертоников встречаются значительно чаще, чем у одновозрастного контроля — как правило, обнаруживается три и более таких структур на срезе любого крупного скопления гранул.

ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего, логично обосновать применение морфологического метода для оценки функциональных процессов, которыми являются синтез и выделение секреторных продуктов из мышечных клеток предсердий. Ультраструктурное исследование — трудоемкий, но общепризнанный способ оценки активности внутриклеточных процессов, имеющий свои преимущества (объективная привязка к конкретным органоидам) и ограничения (отсутствие динамических характеристик). Выделение морфологических разновидностей гранул — формирующиеся, зрелые и растворяющиеся формы — прием, позволяющий оценивать активность различных этапов внутриклеточных процессов. Объективность результатов обеспечивается одинаковыми условиями подготовки образцов, соблюдением правил стереоморфометрии, “слепым” способом подсчета и достаточным объемом выборок для статистической обработки. Дело в том, что современные молекулярные, биохимические и иммунологические методы пока не дали общепризнанного точного и специфичного способа определения концентрации натрийуретических пептидов в биологических средах по причинам, подробно обсуждаемым в специальной литературе и обзорах (Wopow, 1996; Clerico et al., 2000). Еще меньше в настоящее время ясности в процессах внутриклеточного синтеза, накопления и выделения секреторного продукта, не определены пути регуляции этих процессов, как на уровне организма, так и внутри клеток (de Bold et al., 1996; Baertschi et al., 2001; Goetze, 2010).

Если анализировать онтогенетическую динамику содержания и состава секреторных гранул в мышечных клетках предсердий на рис. 2, то можно отметить некоторые общие закономерности. У крыс обеих изученных линий большая концентрация секреторного продукта в миоэндокринных клетках наблюдается в эмбриогенезе, его количество снижается после рождения, особенно у маленьких крысят, а затем он накапливается в клетках, достигая максимума у животных на 13-м месяце жизни. Это соответствует данным, полученным радиоиммунным методом, о содержании натрийуретических пептидов в предсердиях крыс в постнатальном онтогенезе (Navaratnam et al., 1989). На всех изученных этапах онтогенеза численная плотность гранул выше, а качественный состав более разнообразный у крыс гипертензивной линии, чем в контроле.

Мы показали, что у эмбрионов линии ВАГ (контроль) на 18-е сутки развития в мышечных

клетках по мере дифференцировки активно формируется и начинает функционировать натрийуретическое звено поддержания водно-солевого гомеостаза. На фоне незавершенной дифференцировки клеток (митозы, большой объем гликогена и малый — миофибрилл, табл. 1) органоиды, ответственные за синтез секрета, развиты очень хорошо, гранул в клетках много, имеются все их разновидности. Приблизительное соответствие формирующихся и растворяющихся форм свидетельствует об определенном стабильном или “базальном” уровне секреторной активности. Эти находки соответствуют данным о том, что у эмбрионов крыс первые клетки с иммунной реактивностью к сердечному пептиду появляются среди кардиомиоцитов предсердий очень рано — на 10-й или 11-й день беременности (DeLoof et al., 1995). Ежедневное измерение и-РНК по ходу эмбриогенеза у мышей показало, что экспрессия ее появляется на 8–9 день гестации с наибольшим пиком на 12.5 день и меньшими пиками в период 14.5–16.5 суток развития (Cameron et al., 1996).

У крыс гипертензивной линии НИСАГ уже на 18-е сутки эмбриогенеза в миоэндокринных клетках предсердия обнаруживаются морфологические признаки повышенной секреторной активности. Преобладание среди гранул формирующихся форм (рис. 2) и мелкие размеры зрелых гранул (табл. 1) могут отражать повышенную потребность в их продукции, которая не задерживается в клетке и выделяется “с колес”. Это может свидетельствовать о том, что уже на самых ранних этапах онтогенеза эта депрессорная регуляторная система реагирует на генетически закрепленные отклонения в ходе индивидуального развития и/или внешние стимулы. По-видимому, это достаточно универсальное явление и для других классов позвоночных, поскольку, по нашим данным, у куриных эмбрионов уже на 14-е сутки развития в условиях гипоксии в клетках предсердий наблюдаются аналогичные ультраструктурные признаки гиперсекреции (Максимов, Коростышевская, 2012).

В литературе имеются отдельные экспериментальные данные о том, что натрийуретические пептиды играют существенную роль в формировании и функционировании вне- и внутриэмбриональной сосудистой системы, обмене жидкости и солей, регуляции гемодинамики и других ключевых процессов развития и роста организма. Признается, что у эмбрионов особенно актуально их выраженное действие на морфогенез сердца — они сдерживают рост кардиомиоцитов, соединительнотканной стромы и утолщение сосудистых стенок (Feng et al., 2003; D’Souza et al., 2004; Das

et al., 2009; Scott et al., 2009). Возможно, на этом этапе онтогенеза повышенная секреция натрийуретических пептидов у гипертензивной линии НИСАГ сдерживает генетически запрограммированную гипертрофию миокарда и другие типичные для гипертоников перестройки в сердце.

Нужно отметить, что высокое содержание секрета в клетках миокарда может мало соотноситься с содержанием активного пептида в крови эмбриона, поскольку количество таких клеток в миокарде на этой стадии развития эмбриона доподлинно неизвестно. Кроме того, у эмбрионов существенный вклад в секрецию пептидов вносят кардиомиоциты желудочков, активность которых прогрессивно снижается и сходит на нет в первые дни после рождения (Navaratnam et al., 1989). По данным Занг и Пасумарти (Zhang, Pasumarthi, 2007), у мышей на 11.5 сутки эмбриогенеза в миокарде желудочков только 14% зрелых миоцитов, 43% малодифференцированных и 43% недифференцированных клеток. На стадии 16.5 суток последних насчитывается около 20%, а на 18.5 сутки — остается всего 7%. В постнатальном периоде, когда в сердце завершаются морфогенетические процессы, функциональная активность миоэндокринных клеток в большой мере отражает поступление гормона в кровотоки.

У быстро растущих неполовозрелых крысят линии ВАГ в первый месяц жизни в миоэндокринных клетках содержится меньше гранул, чем у эмбрионов, но они достоверно крупнее и по мере роста клеток и их окончательной дифференцировки количество гранул в цитоплазме нарастает (табл. 1, рис. 2). Характер секреции, оцененный по соотношению типов гранул, не претерпевает существенных изменений — он носит “спокойный” характер. К сожалению, в литературе нет пока сложившейся концепции регуляции выделения и механизма секреции натрийуретических пептидов. Высказывается мнение, что “базальная” секреция вне стимуляции происходит, минуя стадию секреторных гранул. При специфической стимуляции сначала в острую стадию выделяется секрет, накопленный в гранулах, а затем начинается усиленный синтез пептидов *de novo* для обеспечения потребностей и пополнения запасов (de Bold et al., 1996; Ogawa et al., 1999). Морфологический эквивалент этого механизма можно наблюдать в клетках предсердий у крысят линии НИСАГ. В крупных миоэндокринных клетках очень хорошо развиты пластинчатые комплексы, много секреторных гранул, причем среди них около половины составляют формирующиеся и растворяющиеся формы. В связи с этим логично поставить вопросы: что является

стимулом для секреторной гиперактивности, и почему натрийуретические пептиды не оказывают своего модулирующего влияния на рост миоцитов на этом этапе и развитие гипертензии на последующих сроках жизни? Напомним, что уже на 12-е сутки жизни мы наблюдаем выраженную относительную гипертрофию сердца на фоне отставания массы тела от контроля, и абсолютную гипертрофию кардиомиоцитов предсердия, а наследственно обусловленная гипертензия проявляется у крыс НИСАГ только на втором месяце жизни. Это принципиально отличает миоэндокринные клетки предсердий у крысят НИСАГ первого месяца жизни от сократительных миоцитов желудочков, диаметр которых на 21-е сутки жизни даже не достигает величины одновозрастного контроля (Шмерлинг и др., 2005). Функциональная несостоятельность при избытии натрийуретических пептидов, получившая название “гормональный парадокс”, начинает проявляться на очень ранних этапах постнатального онтогенеза и сопровождается формированием стойкой гипертензии со всеми регуляторными, функциональными и морфологическими нарушениями на уровне тканей, органов и организма.

У взрослых полугодовалых животных в клетках предсердий у крыс линии ВАГ гранул в клетках больше, чем у крысят, они крупнее. При этом формирующихся форм мало, зато встречаются разные варианты внутриклеточной утилизации секреторного материала: неравномерное растворение содержимого гранул, их слияние и зернистая деградация. Однако все эти явления значительно более ярко проявляются у крыс линии НИСАГ. Для взрослых крыс-самцов линии НИСАГ характерно повышение артериального давления как в покое (до 180 мм рт.ст.), так и особенно значительное — в условиях эмоционального стресса (до 220 мм рт.ст.). Комплексное исследование выявило у этих животных изменения основных звеньев регуляции гемодинамики — гипофизарно-надпочечниковой, ренин-ангиотензин-альдостероновой и инсулин-адреналовой систем. Параллельно в сердце обнаруживаются все морфологические изменения, характерные для гипертензивного статуса: большая относительная масса, умеренный кардиосклероз, гипертрофия желудочковых кардиомиоцитов, утолщение стенки и уменьшение просветов коронарных артерий (Шмерлинг и др., 1997). В предсердных миоэндокринных клетках гранул значительно больше, чем в контроле, они более активно формируются, но еще более активно деградируют — более половины всех гранул имеют различные признаки растворения содержимого. Такая диспропорция между интенсив-

ностью процессов синтеза и выделения дает возможность предположить, что у гипертензивных животных в покое в мышечных клетках предсердий скапливается большое количество гранул, выделение которых по потребности компенсируется их активным синтезом в хорошо развитых комплексах Гольджи. По-видимому, генетически закрепленная высокая стресс чувствительность этих животных проявляется резким повышением артериального давления в ответ на манипуляции, что сопровождается экстренным выделением накопленного в клетках секреторного продукта.

После года жизни в состоянии кардиомиоцитов предсердий у изученных линий крыс обнаруживаются принципиальные различия. У нормотензивных крыс ВАГ морфологических признаков “старения” в миокарде предсердий не наблюдается: ни размеры клеток, ни их внутриклеточная композиция, ни соотношение основных органоидов (миофибрилл и митохондрий) не изменяются за прошедшие семь месяцев жизни после предыдущего этапа исследования. Что касается секреторного аппарата клеток, то относительный объем гранул и аппаратов Гольджи, количество и размеры гранул увеличиваются, но состав не изменяется. Принципиально другая ситуация обнаруживается в клетках предсердий у одновозрастных гипертензивных крыс. Очень крупные клетки имеют признаки дистрофии – в них мало миофибрилл и митохондрий. Более 10% цитоплазмы клеток занимают структуры синтеза, и, прежде всего, огромные скопления крупных секреторных гранул (табл. 2). В этих скоплениях всегда присутствуют несколько гранулярных телец неправильной формы по типу остаточных телец – одна из форм внутриклеточной деградации гранул. Состав гранул свидетельствует о накоплении большого запаса секреторного продукта при достаточно сбалансированных процессах синтеза и выделения. Стимуляция секреторной активности кардиомиоцитов на фоне возрастной деградации миофибрилл и особенно митохондрий остается непонятной. Возможно, это наблюдение по механизму соотносится с известными из литературы данными о восстановлении секреторной активности фетальных натрийуретических пептидов в кардиомиоцитах желудочков взрослых особей при тяжелых декомпенсированных расстройствах гемодинамики (Langenickel et al., 2000; Cameron, Ellmers, 2003).

Таким образом, ультраструктурное исследование кардиомиоцитов правого предсердия крыс показало, что уже у 18-суточных эмбрионов на фоне незавершенного морфогенеза предсердий в миоэндокринных клетках активно формируются,

накапливаются и растворяются секреторные гранулы, содержащие натрийуретические пептиды. По ходу постнатального онтогенеза в клетках предсердий происходит накопление секреторного продукта, достигая максимума у 13-месячных животных. На всех изученных этапах онтогенеза у крыс НИСАГ с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией в миоэндокринных клетках численная плотность гранул выше и качественный состав их более разнообразный, чем в контроле. Морфологические признаки гиперсекреции натрийуретических пептидов, выявленные у эмбрионов и у 12- и 21-дневных крысят линии НИСАГ, предшествуют генетически запрограммированному повышению артериального давления, которое регистрируется на 2-м месяце жизни. У взрослых крыс НИСАГ на фоне высокого артериального давления гипертрофические и дегенеративные изменения миоцитов сопровождаются избыточным накоплением крупных секреторных гранул, часть которых подвергается внутриклеточной деградации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Волкова Н.Н., Драпкина О.М., Ивашкин В.Т. Ультраструктурные и функциональные особенности кардиомиоцитов предсердий и желудочков // Клиническая медицина. 2006. № 11. С. 16–20.
- Коростышевская И.М., Максимов В.Ф. Где и когда в сердце секреторируются натрийуретические пептиды // Онтогенез. 2012. Т. 43. № 3. С. 217–228.
- Лапша В.И., Бочарова В.Н., Гурин В.Н. Структурно-функциональные изменения в правом предсердии у крыс при кратковременном и длительном тепловом стрессе // Морфология. 2005. Т. 128. № 5. С. 48–52.
- Максимов В.Ф., Коростышевская И.М., Маркель А.Л. и др. Структурные особенности кардиомиоцитов правого предсердия у крыс гипертензивной линии НИСАГ // Бюлл. экспер. биол. мед. 2004. Т. 138. № 7. С. 4–8.
- Максимов В.Ф., Коростышевская И.М. Гормональная система сердца как звено регуляции гемодинамики и водно-солевого гомеостаза // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2011. Т. 97. № 3. С. 263–275.
- Максимов В.Ф., Коростышевская И.М. Морфогенез и реакция на гипоксию миоэндокринных клеток предсердия у куриных эмбрионов (*Gallus gallus*) // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2012. Т. 48. № 5. С. 502–508.
- Маслова Л.Н., Шишкина Г.Н., Булыгина В.В. и др. Катехоламины мозга и гипоталамо-гипофизарно-адреноренальная система при наследственной артериальной гипертензии // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 1996. Т. 82. № 4. С. 30–38.

- Маркель А.Л.* Генетическая модель индуцированной стрессом артериальной гипертензии. Изв. АН СССР. Сер. биол. 1985. Т. 3. С. 466–469.
- Рахчиева М.В., Бугрова М.Л.* Изменение соотношения гранул А- и В-типов, содержащих предсердный и мозговой натрийуретические пептиды, в предсердных миоцитах крыс в условиях вазоренальной гипертензии // Цитология. 2010. Т. 52. № 8. С. 629–633.
- Румянцев П.П.* Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Л.: Наука, 1982.
- Шмерлинг М.Д., Филюшина Е.Е., Коростышевская И.М. и др.* Гисто- и ультраструктурная характеристика миокарда крыс новой гипертензивной линии (НИСАГ) в раннем периоде онтогенеза // Бюлл. СО РАМН. 1997. № 2. С. 91–94.
- Шмерлинг М.Д., Бузуева И.И., Коростышевская И.М. и др.* Стереоморфометрическое исследование органов-мишеней у крыс с наследственной артериальной гипертензией в разные периоды постнатального онтогенеза при изменении условий вскармливания // Морфология. 2005. Т. 128. № 4. С. 85–90.
- Azizov V.A., Muradova S.R.* Immunohistochemical and electron-microscopic characterization of secretory cardiomyocytes in experimental myocardial infarction // Anadolu Kardiol. Derg. 2003. № 4. P. 299–302.
- Avramovitch N., Hoffman A., Winaver J. et al.* Morphometric analysis of atrial natriuretic peptide-containing granules in atrioocytes of rats with experimental congestive heart failure // Cell Tissue Res. 1995. V. 279. № 3. P. 575–583.
- Baertschi A.J., Monnier D., Schmidt U. et al.* Acid prohormone sequence determines size, shape, and docking of secretory vesicles in atrial myocytes // Circ. Res. 2001. V. 89. P. E23–E29.
- Bonow R.O.* New insights into the cardiac natriuretic peptides // Circulation. 1996. V. 93. P. 1946–1950.
- de Bold A.J., Borenstein H.B., Veress A.T. et al.* A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats // Life Sci. 1981. V. 28. P. 89–94.
- de Bold A.J., Bruneau B.G., de Bold M.L.* Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart // Cardiovasc. Res. 1996. V. 31. P. 7–18.
- Cameron V.A., Aitken G.D., Ellmers L.J. et al.* The sites of gene expression of atrial, brain, and c-type natriuretic peptide in mouse fetal development: temporal changes in embryos and placenta // Endocrinology. 1996. V. 137. P. 817–824.
- Cameron V.A., Ellmers L.J.* Minireview: Natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation // Endocrinology. 2003. V. 144. № 6. P. 2191–2194.
- Chimenti C., Russo M.A., Carpi A., Frustaci A.* Histological substrate of human atrial fibrillation // Biomed Pharmacother. 2010. V. 64. № 3. P. 177–183.
- Clerico A., Ry S.D., Giannessi D.* Measurement of cardiac natriuretic hormones (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and related peptides) in clinical practice: the need for a new generation of immunoassay methods // Clinical Chemistry. 2000. V. 46. P. 1529–1534.
- Das B.B., Raj S., Solinger R.* Natriuretic peptides in cardiovascular diseases of fetus, infants and children // Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem. 2009. V. 7. № 1. P. 43–51.
- Deloof S., VanCamp G., Chatelain A.* Absence of transplacental transfer of atrial natriuretic peptide in the rat: direct experimental evidence // Med. Sci. Res. 1995. V. 23. P. 347–350.
- D'Souza S.P., Davis M., Baxter G.F.* Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart // Pharmacol. Ther. 2004. V. 101. № 2. P. 113–129.
- Feng J.A., Perry G., Miri T. et al.* Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in atrial natriuretic peptide-deficient mice // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2003. V. 30. № 5–6. P. 343–349.
- Goetze J.P.* Biosynthesis of cardiac natriuretic peptides // Results Probl. Cell Differ. 2010. V. 50. P. 97–120.
- Kawakami H., Okayama H., Hamada M. et al.* Alteration of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide gene expression associated with progression and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats // Clin. Sci. 1996. V. 90. P. 197–204.
- Langenickel T., Pagel I., Hohnel K. et al.* Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2000. V. 278. P. H1500–H1506.
- Nakayama T.* The genetic contribution of the natriuretic peptide system to cardiovascular diseases // Endocrine J. 2005. V. 51. № 1. P. 11–21.
- Navaratnam V., Woodward J.M., Skepper J.N.* Specific heart granules and natriuretic peptide in the developing myocardium of fetal and neonatal rats and hamsters // J. Anat. 1989. V. 163. P. 261–273.
- Ogawa T., Vatta M., Bruneau B.G. et al.* Characterization of natriuretic peptide production by adult heart atria // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 1999. V. 276. Issue 6. P. H1977–H1986.
- Scott N.J., Ellmers L.J., Lanchbury J.C. et al.* Influence of natriuretic peptide receptor-1 on survival and cardiac hypertrophy during development // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1792. № 12. P. 1175–1184.
- Tilkova L., Novotova M., Zahradnik I., Kiss A.* Evaluation of changes in secretory granules of atrial myocytes: a morphometric approach // Anal. Quant. Cytol. Histol. 2008. V. 30. № 1. P. 53–59.
- Vesely D.L.* Atrial natriuretic peptides in pathophysiological diseases // Cardiovascular Research. 2001. V. 51. P. 647–658.
- Vesely D.L.* Which of the cardiac natriuretic peptides is most effective for the treatment of congestive heart failure, renal failure and cancer? // Clin. Exper. Pharm. Physiol. 2006. V. 33. № 3. P. 169–176.
- Vesely D.L.* Discovery of new cardiovascular hormones for the treatment of congestive heart failure // Cardiovasc. Hematol. Disord. Targets. 2007. V. 7. № 1. P. 47–62.
- Zhang F., Pasumarthi K.B.* Ultrastructural and immunohistochemical characterization of undifferentiated myocardial cells in the developing mouse heart // J. Cell. Mol. Med. 2007. V. 11. № 3. P. 552–560.

Age-Related Structural and Functional Characteristics of Cardiac Myoendocrine Cells of Rats in a Normal State and with Hereditary Hypertension

I. M. Korostyshevskaya and V. F. Maksimov

Institute of Physiology, ul. Timakova 4, Novosibirsk, 630117 Russia

e-mail: kor@physiol.ru

Abstract—A qualitative and quantitative ultrastructural study of right atrial cardiomyocytes in WAG (normotensive control) and ISIAH (inherited stress-induced arterial hypertension) rats of different age (on day 18 of embryogenesis, on days 12 and 21 after birth, and at an age of 6 and 13 months) was performed. It was shown that, in embryos with an as yet incomplete atrial morphogenesis, secretory granules containing natriuretic peptides are actively formed, accumulated, and dissolved. In postnatal ontogeny, the secretory product is accumulated in atrial cells. In all ontogeny stages studied, the numerical density of secretory granules in the myoendocrine cells of hypertensive rats is greater and the qualitative composition of these granules is more diverse than in the control. It was established that, in atrial myocytes of ISIAH rats, the morphological signs of natriuretic peptide hypersecretion precede the development of genetically programmed high blood pressure. In adult hypertensive rats, hypertrophic and degenerative changes in myocytes are accompanied by excessive accumulation of secretory granules, some of which undergo intracellular degradation.

Keywords: natriuretic peptides, right atrium, cardiomyocyte, ontogeny, rat.

УДК 581.1.581.14

РОЛЬ ЭТИЛЕНА В РЕГУЛЯЦИИ ГАМЕТОФИТНО-СПОРОФИТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПЕТУНИИ (*PETUNIA HYBRIDA* L.)

© 2013 г. Л. В. Ковалева, Г. В. Тимофеева, Г. Б. Родионова, Е. В. Захарова, В. Ю. Ракитин

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева

127276 Москва, ул. Ботаническая, д. 35

E-mail: kovaleva_l@mail.ru

Поступила в редакцию 16.11.11 г.

Окончательный вариант получен 19.01.12 г.

Исследовали динамику содержания 1-аминоциклопропан 1-карбоновой кислоты (АЦК) и образования этилена в процессе развития и прорастания мужского гаметофита петунии трех клонов (стерильного, самосовместимого и самонесовместимого). Развитие мужского гаметофита у фертильных клонов сопровождалось двумя максимумами содержания АЦК и выделения этилена в системе пыльник—мужской гаметофит. Первый сопровождал развитие микроспор, разрушение тапетума и средних слоев стенки пыльника, второй — дегидратацию и созревание пыльцевых зерен. Пыльники стерильного клона уже на стадии мейоза выделяли в 10 раз больше этилена, чем пыльники фертильных клонов, что приводило к разрушению тапетума и гибели микроспороцитов. Обработка этиленом (1–100 мкл/л) бутонов фертильных клонов на стадии мейоза мужского гаметофита также вызывала гибель генеративных клеток. Накопленная во время дегидратации и созревания в пыльцевых зернах АЦК расходовалась на синтез этилена при их прорастании. Всплеск выделения этилена сопровождал прорастание мужского гаметофита как на среде культивирования, так и на поверхности рыльца. Основным местом синтеза этилена в опыленном пестике были ткани рыльца. Прорастание мужского гаметофита после совместимого опыления сопровождалось более высоким содержанием АЦК, но менее интенсивным образованием этилена, чем после несовместимого опыления. Более интенсивное образование этилена после самонесовместимого опыления вызывало торможение роста пыльцевых трубок в проводниковых тканях столбика. Ингибитор действия этилена 2,5-норборнадиен (NBD) блокировал как развитие, так и прорастание мужского гаметофита. Полученные данные показывают, что этилен участвует в регуляции развития, прорастания и роста мужского гаметофита в прогамной фазе оплодотворения.

Ключевые слова: этилен, мужской гаметофит, дифференциация, прорастание, рост, стерильность, самонесовместимость, петуния.

DOI: 10.7868/S0475145013020055

В настоящее время накапливается все больше данных об участии этилена в регуляции репродуктивного процесса растений (Kende, 1993; Woltering et al., 1995; Liu et al., 1999; Bleecker, Kende, 2000; Alexander, Grierson, 2002; Butenko et al., 2006; Trusov, Botella, 2006; Achard et al., 2007; Xue et al., 2008; Lin et al., 2009).

Показано, что трансгенные растения петунии со сниженной экспрессией гена *PhEIN2* проявляли низкую чувствительность к этилену при старении цветков и созревании плодов (Shibuya et al., 2004), а сверхэкспрессия в трансгенных растениях табака гена *Cm-ETR1/H69A* или *Cm-ERS1/H70A* индуцировала стерильность пыльцы или снижала ее фертильность (Ishimaru et al., 2006).

LM-array (laser microdissection technique) анализ профиля глобальной экспрессии генов в развивающемся пыльнике риса выявил наличие синтеза и сигналинга этилена в микроспорах, пыльцевых зернах и тапетуме, в частности выявил экспрессию *АЦК-синтазы6 (ACS6)*, *АЦК-оксидазы2 (ACO2)* и *АЦК-оксидазы3 (ACO3)* на последних стадиях развития пыльцевого зерна, что указывало на то, что эти стадии характеризуются активным синтезом этилена (Hirano et al., 2008).

Опыление у многих растений инициирует каскад событий, включающих в себя образование этилена, способного координировать дальнейшее развитие цветка (O'Neill et al., 1993). Исследования, проведенные на орхидее, гвоздике, табаке и петунии, предполагают, что индуцированное опы-

лением образование и выделение этилена тканями пестика необходимо для роста пыльцевых трубок и успешного оплодотворения (Hoekstra, Weges, 1986; Singh et al., 1992; Nadeau et al., 1993; Tang et al., 1994; Tang, Woodson, 1996; Bui, O'Neill, 1998; Weterings et al., 2002; Holden et al., 2003; Kovaleva, Zakharova, 2003). Однако вопрос о физиологической роли этилена в гаметофитно-спорофитных взаимодействиях в прогамной фазе оплодотворения как при нормальном развитии репродуктивного процесса, так при наличии генетически детерминированных барьеров самооплодотворения еще далек от своего решения.

Цель данной работы составило изучение образования и действия АЦК и этилена в развивающихся пыльниках самосовместимого, стерильного и самонесовместимого клонов петунии, а также в *in vitro* прорастающем мужском гаметофите (на среде культивирования) и *in vivo* в системе пыльца–пестик.

Полученные данные показали, что этилен участвует в регуляции гаметофитно-спорофитных отношений на всех этапах прогамной фазы оплодотворения у петунии. Изменение этой регуляции на генетическом уровне у стерильного и самонесовместимого клонов или экзогенным этиленом и ингибитором его действия NBD у самосовместимого клона приводило к нарушению гаметофитно-спорофитных взаимодействий и в конечном итоге к блокированию оплодотворения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Вегетативно размноженные растения двух фертильных (самосовместимого и самонесовместимого) и стерильного клонов петунии (*Petunia hybrida* L.) выращивали в почвенной культуре при естественном освещении в оранжерее.

Самонесовместимый клон характеризуется тем, что при самоопылении его пыльца прорастает на рыльце, но рост пыльцевых трубок останавливается в проводниковых тканях столбика вследствие гаметофитной самонесовместимости. У стерильного клона микроспорогенез останавливается на стадии мейоза (Добровольская и др., 2009).

Самоопыление кастрированных и изолированных накануне раскрытия цветков самосовместимого и самонесовместимого клонов проводили пылью, собранной из раскрытых цветков соответствующего клона.

Стадии развития микроспор и пыльцевых зерен в развивающихся пыльниках определяли в соответствии с общепринятой классификацией (Koltunow et al., 1990) по методике Матвеевой и др. (1998). Пыльники извлекали из бутонов длиной от 2.5 до 50 мм, раздавливали пестиком в фиксирующей жидкости (ацетон : 96% этанол, 1 : 1). Полученную взвесь клеток фильтровали через капроновую сет-

ку (поры 40 мкм), центрифугировали 3 мин при 200 g, ресуспендировали в 70% спирте, снова центрифугировали и окрашивали флюоресцентным красителем Hoechst 33258 ("Serva" Германия) для идентификации стадий развития микроспор, основанной на специфичном связывании красителя с ДНК ядер (Матвеева и др., 1998). Для определения каждой стадии использовали пыльники из 15 бутонов. Препараты анализировали под микроскопом Axio Imedger D1 (Carl Zeiss, Германия).

Изучение влияния экзогенного этилена и ингибитора его действия 2,5-норборнадиена (NBD) на развитие мужского гаметофита петунии самосовместимого клона

Обработка побегов с бутонами этиленом. За 0.5 ч до начала эксперимента побеги с бутонами, находящимися на разных стадиях развития мужского гаметофита, срезали с растений, ставили в стаканы с 100 мл водопроводной воды и помещали в герметичные стеклянные камеры объемом 20 л, снабженные штуцерами для ввода этилена. С помощью шприца вводили этилен, создавая в камерах следующие концентрации: 1, 10 и 100 мкл/л. Обработку побегов с бутонами этиленом проводили в течение трех суток, пробы брали каждые 24 часа. После отбора бутонов и проветривания в камерах создавали необходимые концентрации этилена. В качестве контроля использовали пыльники из бутонов, находившихся в камере без добавления этилена.

Обработку побегов с бутонами и прорастающую на среде культивирования пыльцу NBD проводили в 5-литровых стеклянных камерах при температуре 26°C и 16-часовом фотопериоде с интенсивностью освещения люминисцентными лампами ЛБ-80-8000 люкс. Для создания в камерах концентрации газообразного NBD 500, 2000 и 6000 мкл/л на полосу фильтровальной бумаги, прикрепленной к крышке сосуда, наносили соответственно 12, 48 или 144 мкл жидкого NBD, после чего сосуд немедленно закрывали и герметизировали. Камеры ежедневно проветривали, после чего восстанавливали концентрацию NBD.

Ежедневные наблюдения за состоянием генеративных клеток в пыльниках, обработанных этиленом и NBD, проводили на Hoechst-окрашенных срезах с помощью микроскопа Axio Imedger D1.

Питательная среда для культивирования пыльцы включала 0.4 М сахарозу и 1.6 мМ борную кислоту. О степени прорастания судили по количеству проросших пыльцевых зерен, произвольно отобранных и наблюдаемых в четырех полях микроскопа ($n = 200$). Длину пыльцевых трубок определяли с помощью микроскопа Axio Imedger D1 с камерой Axio Cam MRc. Измерения выполняли в программе Axio Vizion 4.5 (Carl Zeiss, Германия).

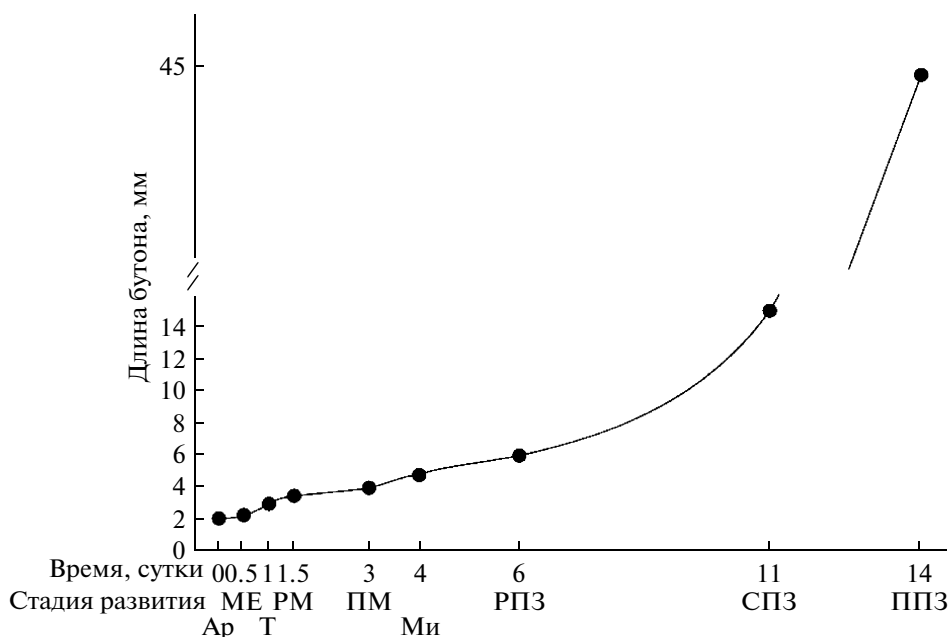


Рис. 1. Корреляция между длиной бутона и стадиями развития пыльника и мужского гаметофита петунии фертильного клона. Ар — археспорий, Ме — мейоз, Т — тетрады, РМ — ранние микроспоры, ПМ — поздние микроспоры, Ми — митоз, РПЗ — ранние пыльцевые зерна, СПЗ — средние пыльцевые зерна, ППЗ — поздние пыльцевые зерна.

Выделение этилена определяли газохроматографическим методом (Ракитин В., Ракитин Л., 1986). По 30 пыльников из бутонов одного размера, 20 мг пыльцы + 2 мл питательной среды, 5–7 неопыленных или опыленных пестиков или их частей (рылец, столбиков, завязей) помещали в отдельные флаконы объемом 15 мл и герметично закрывали резиновыми пробками (Septa, Red Rubber, O.D. 13 мм, Aldrich, США). Одновременно для контроля исходного уровня этилена в воздухе закрывали пустой флакон. Образцы инкубировали в темноте при 26°C в термостате TCH 100 (Laboratori Pristole, Прага) не более 30 мин до начала анализа. Весь воздух из флакона использовали для определения содержания этилена на газовом хроматографе Цвет 106 (Россия) с пламенно ионизационным детектором и концентрирующей системой для углеводородов, позволяющей в десятки раз повышать чувствительность прибора, которая необходима для максимального сокращения времени инкубации и проведения анализа до начала выделения “раннего” этилена.

Определение содержания АЦК проводили по методу Лизада и Янга (Lizada, Yang, 1979) с модификациями. Свежесобранный материал (пыльники, неопыленные и опыленные пестики) замораживали в жидком азоте и хранили при –70°C. Навески образцов (50 мг) гомогенизировали в 1.2 мл 0.2 М ТХУ. АЦК экстрагировали в течение 2 ч. Гомогенат центрифугировали 5 мин при 2300 g. Затем во флакон объемом 15 мл добавляли 1 мл экстракта АЦК и 0.2 мл 0.01 М HgCl₂. Флакон герметично закры-

вали резиновой пробкой, через которую шприцем вводили 0.2 мл охлажденной смеси 5.25% гипохлорита натрия и насыщенного раствора NaOH (в соотношении 2 : 1). Все операции проводили при 4°C. Образующийся из АЦК этилен определяли на газовом хроматографе (Ракитин В., Ракитин Л., 1986).

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в трех–пяти биологических повторностях. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента при степени свободы 0.05. На рисунках приведены средние значения и стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика содержания АЦК и образования этилена в развивающихся пыльниках

Содержание АЦК и образование этилена исследовали на девяти стадиях развития пыльника: стадия материнских клеток пыльцы, археспорий (Ар), мейоз (Ме), тетрады (Т), ранние микроспоры (РМ), поздние микроспоры (ПМ), митоз (Ми), ранние пыльцевые зерна (РПЗ), средние пыльцевые зерна (СПЗ), поздние пыльцевые зерна (ППЗ) (рис. 1). Стадии определяли по экспериментально выявленной корреляции между длиной бутона и стадией развития мужского гаметофита (Добровольская и др., 2009).

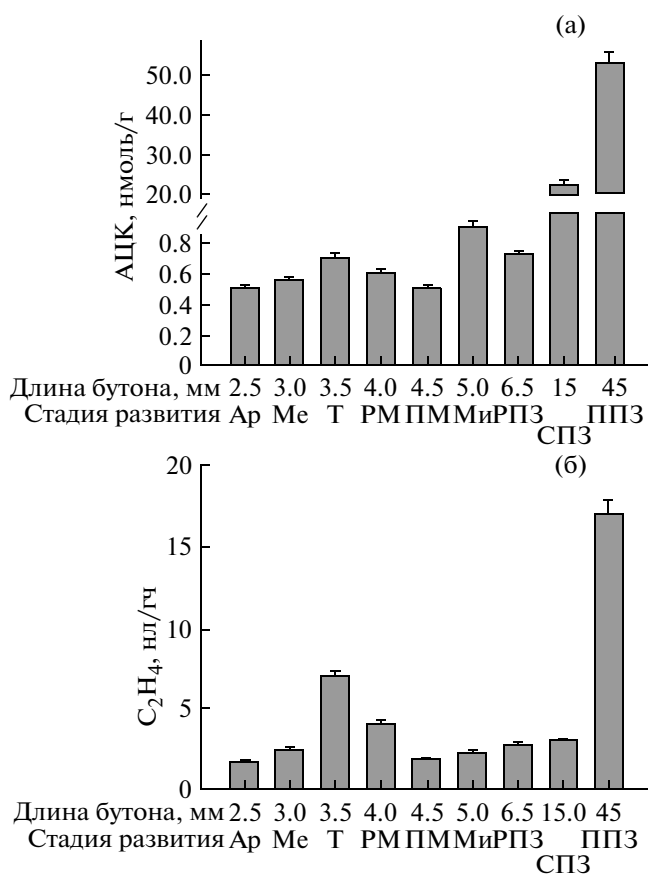


Рис. 2. Динамика содержания АЦК (а) и выделения этилена (б) в развивающихся пыльниках петунии самосовместимого клона.

Пыльники фертильного клона

Развитие мужского гаметофита у обоих фертильных клонов (самосовместимого и самонесовместимого) сопровождалось двумя периодами повышения содержания АЦК и образования этилена в тканях пыльника: первый происходил во время развития микроспор, второй — при созревании пыльцевых зерен (рис. 2). Поскольку динамика выделения этилена у обоих клонов была идентична, мы приводим данные только по самосовместимому клону.

Микроспоры являются первыми клетками гаметофитной генерации, образующимися в микроспорангии в результате мейотического деления материнских клеток микроспор. Развитие микроспоры — наиболее длительный этап формирования пыльцевого зерна, в ходе которого микроспоры и стенка пыльника подвергаются структурным и функциональным изменениям.

Тапетум, внутренний слой стенки пыльника, непосредственно прилегает к спорогенной ткани. Запасные вещества тапетума гидролизуются и секретируются в гнездо пыльника, обеспечивая про-

хождение мейоза, развитие микроспор и созревание пыльцевых зерен (Резникова, 1984; Goldberg et al., 1993).

У петунии разрушение тапетума происходило по мере созревания микроспор и завершалось к моменту образования двуядерной пыльцы (Добровольская, 2009). Так, средние слои стенки пыльника уже на стадии Т были в значительной степени разрушены. На стадии РМ наблюдали полное разрушение двух средних слоев стенки и дезорганизацию тапетума. Полное разрушение тапетума происходило перед стадией РПЗ. Трехкратное повышение выделения этилена пыльниками, сопровождавшее развитие микроспор на стадии Т (рис. 2), по-видимому, и было причиной разрушения тапетума и средних слоев стенки пыльника.

Для подтверждения этого предположения исследовали влияние различных концентраций ингибитора действия этилена NBD (500, 2000, 6000 мкл/л) на состояние пыльников в бутонах самосовместимого клона. Обработка NBD (во всех концентрациях) бутонов длиной до 5 мм уже на 2-й день приводила к полной остановке развития пыльника и мужского гаметофита.

Зрелые микроспоры вступают в дифференцирующей Ми, в результате которого образуются две клетки мужского гаметофита: вегетативная и генеративная. Период развития пыльцевых зерен на стадиях РПЗ и СПЗ характеризовался низким уровнем выделения этилена (рис. 2).

Финальным этапом созревания пыльцы, без которой она практически утрачивала способность к прорастанию, являлась дегидратация пыльцы, которая начиналась после разрушения тапетума, и к моменту растрескивания пыльника пыльцевые зерна были частично дегидратированы. Созревание и дегидратация пыльцевых зерен (стадия ППЗ) сопровождалась значительным повышением содержания АЦК и выделения этилена пыльниками (рис. 2). Повышение содержания АЦК в пыльниках на последней стадии созревания сопряжено с ее накоплением в созревающих пыльцевых зернах. Следует отметить, что выделение этилена пыльниками на стадии позднего двуядерного пыльцевого зерна возрастало приблизительно в 10 раз, а содержание АЦК в 100 раз. Содержание АЦК в зрелой пыльце составляло 300 нмоль/г сырого веса. Накопление АЦК при созревании пыльцы также было обнаружено у гвоздики (Whitehead et al., 1983).

Значительное увеличение образования и, следовательно, содержания этилена запускает в стенке пыльника механизмы программируемой клеточной смерти (ПКС), которая является частью нормального развития флоральных органов, включая завершающие стадии развития пыльника, приводящие к его растрескиванию и высвобожде-

нию пыльцы (Rogers, 2006; Goldberg et al., 1993). Так растрескивание пыльников у табака задерживалось при обработке цветков ингибитором действия этилена 1-метилциклопропеном (1-МСП) и ускорялось при обработке этиленом (Rieu et al., 2003). В наших опытах семидневная обработка бутонов (длина 10–15 мм) петунии самосовместимого клона ингибитором действия этилена NBD в концентрации 6000 мкл/л предотвращала растрескивание пыльников и прорастание полученной из них пыльцы. Эффект от воздействия NBD в концентрациях 2000 и 500 мкл/л был менее значителен, и хотя бутоны продолжали свое развитие, процент прорастания пыльцы из них составлял 50% от контроля (пыльца из бутонов, развивавшихся в сосудах без NBD), что указывало на участие этилена в развитии мужского гаметофита также и на поздних стадиях развития.

Пыльники стерильного клона

У стерильного клона, разрушение тканей тапетума наблюдали очень рано, уже в профазе Me, одновременно с нарушениями в развитии спорогенной ткани (Добровольская и др., 2009). Гибель микроспороцитов сопровождалась плазмолизом тапетальных клеток. Однако, не смотря на гибель микроспороцитов и разрушение тапетума, стенка пыльника продолжала расти. Растрескивание пыльников у стерильного и фертильных клонов происходило в одно и то же время.

Гибель микроспороцитов и дегенерация клеток тапетума у стерильного клона сопровождалась аккумуляцией АЦК и высоким уровнем выделения этилена на стадии материнских клеток пыльцы (рис. 3). Следует отметить, что образование этилена пыльниками стерильного клона, сопровождающее плазмолиз тапетума и гибель микроспороцитов было в 10 раз выше, чем у фертильного во время разрушения тапетума и средних слоев стенки пыльника (рис. 2).

Влияние экзогенного этилена на развитие мужского гаметофита

Результат воздействия экзогенного этилена на развивающийся мужской гаметофит петунии самосовместимого клона зависел от концентрации гормона и стадии развития генеративных клеток (табл. 1).

Наиболее чувствительными к действию этилена оказались генеративные клетки на стадии Me, которые погибали через сутки воздействия этилена в концентрациях 10 и 100 мкл/л и через двое суток воздействия этилена в концентрации 1 мкл/л.

Генеративные клетки на стадии T погибали через 3 суток воздействия этилена в концентрациях 10 и 100 мкл/л, в то время как клетки на стадии PM

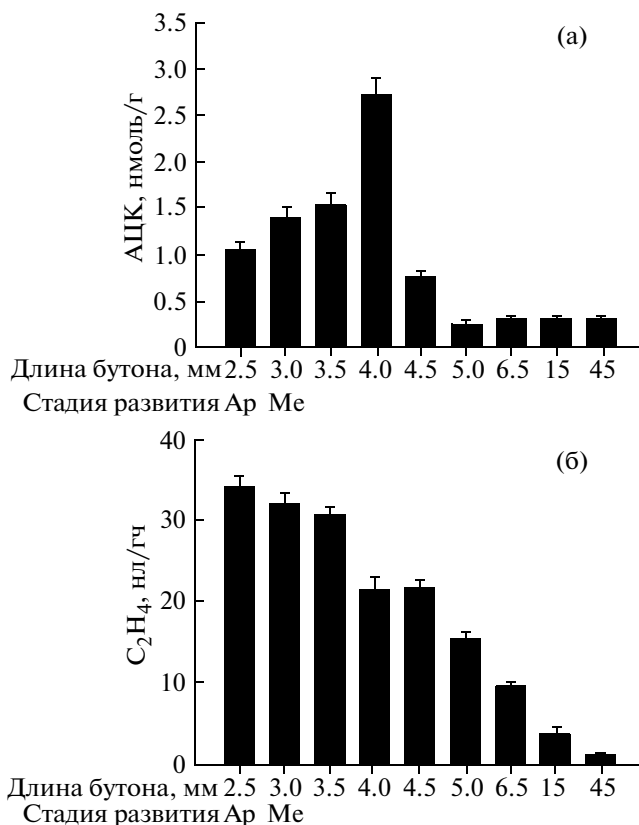


Рис. 3. Динамика содержания АЦК (а) и выделения этилена (б) в развивающихся пыльниках петунии стерильного клона.

только повреждались после 3-х суток воздействия этилена в концентрации 10 мкл/л или после 2-х суток в концентрации 100 мкл/л.

Каких-либо признаков деградации после воздействия экзогенного этилена на генеративные клетки на стадиях PM и Mi, а также на последующих стадиях созревания пыльцевых зерен не наблюдали.

Таким образом, высокие концентрации этилена (1–100 мкл/л) вызывали деградацию и гибель мужских генеративных клеток, находящихся в момент обработки на ранних стадиях развития, от начала Me до выхода микроспор из тетрады, так же, как это происходило при высоком уровне выделения и, следовательно, содержания эндогенного этилена у стерильного клона.

Образование и действие этилена в прорастающем *in vitro* мужском гаметофите

Прорастающая *in vitro* пыльца практически сразу же после начала культивирования интенсивно выделяла этилен (рис. 4), возможно, за счет аккумуляции в пыльцевых зернах АЦК (рис. 2а).

Влияние экзогенного этилена на развивающийся мужской гаметофит петунии самосовместимого клона

Стадии развития мужского гаметофита	Концентрация этилена											
	0 (Контроль)			1 мкл/л			10 мкл/л			100 мкл/л		
	1-е сутки	2-е сутки	3-и* сутки	1-е сутки	2-е сутки	3-и* сутки	1-е сутки	2-е сутки	3-и* сутки	1-е сутки	2-е сутки	3-и* сутки
Мейоз												
Тетрады												
Ранние микроспоры												
Поздние микроспоры												
Митоз												
Пыльцевые зерна												

* Длительность обработок.

□ — контрольные и неповрежденные клетки, ■ — поврежденные клетки, ■ — гибель клеток.

Экзогенный этилен в концентрации 0.1 мкл/л на 20% стимулировал, а в концентрациях 1 и 10 мкл/л на 20% ингибировал прорастание пыльцы петунии (рис. 5а).

NBD в концентрациях 500 и 2000 мкл/л подавлял прорастание пыльцы на 30–40% и на 95% ингибировал этот процесс в концентрации 6000 мкл/л (рис. 5б).

Образование и действие этилена в системе мужской гаметофит–пестик самосовместимого и самонесовместимого клонов

Ранее было показано, что опыление вызывает усиление выделения этилена тканями пестика (Sign et al., 1992; O'Neill et al., 1993; Kovaleva, Zakharova, 2003; Tang et al., 1994). В данной работе мы исследовали динамику содержания предше-

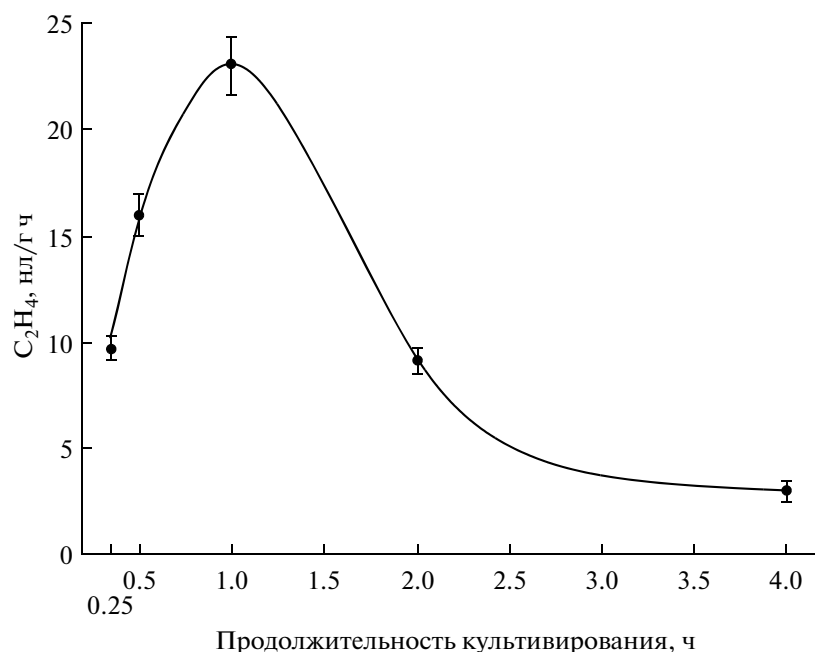


Рис. 4. Выделение этилена *in vitro* прорастающим мужским гаметофитом петунии самосовместимого клона.

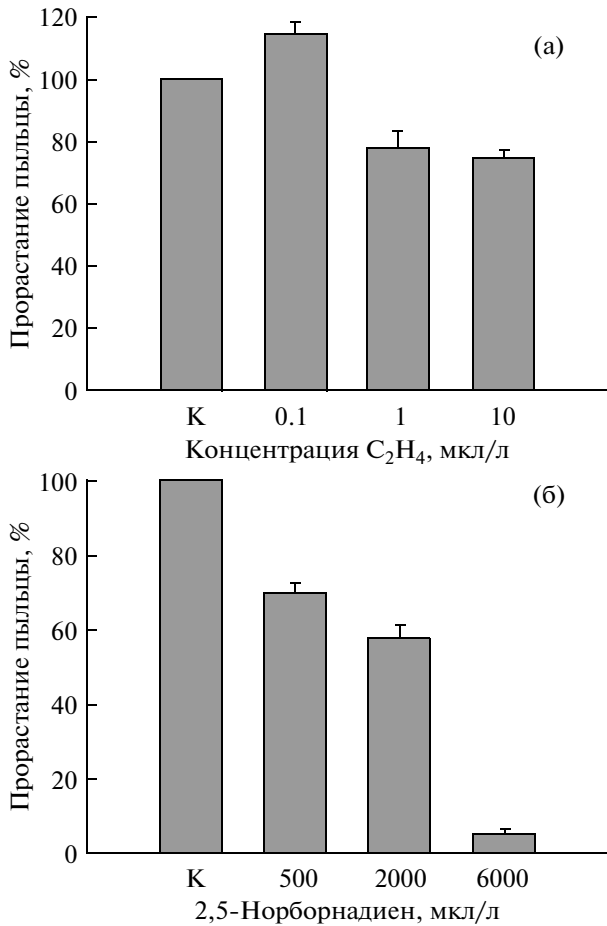


Рис. 5. Влияние этилена (а) и ингибитора действия этилена NBD (б) на *in vitro* прорастание мужского гаметофита петунии самосовместимого клона.

ственника этилена – АЦК и образования этилена в тканях рыльца при прорастании и во время роста пыльцевых трубок после самоопыления самосовместимого и самонесовместимого клонов петунии.

Опыление очень быстро запускало синтез АЦК в системе рыльца–рыльце (рис. 6). Содержание АЦК в тканях рыльца достигало максимума через 1.5–2 часа после опыления. После совместимого опыления ее содержание в рыльцах было в 2.5 раза больше, чем после несовместимого. Концентрация АЦК в столбиках и завязях в течение 7 часов после опыления менялась незначительно и была в 100 раз ниже, чем в рыльцах.

Рыльце являлось основным местом синтеза этилена после обоих типов опыления. Прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок после несовместимого опыления сопровождались в 3 раза большим образованием этилена в системе мужской гаметофит–пестик, чем при совместимом опылении (рис. 7). Полагаем, что повышенный уровень этилена связан с функционированием механизма самонесовместимости (de Nettancourt, 2001; Hua et al., 2008), вследствие которого рост пыльцевых трубок останавливается в проводниковых тканях столбика. В пользу такого предположения могут служить наши данные о том, этилен в высокой концентрации (10 мкл/л) на 45% замедлял скорость роста пыльцевых трубок петунии на среде культивирования (данные не представлены). Как полагают, одной из причин ингибирования роста пыльцевых трубок после самонесовместимого опыления может быть ПКС (Wang et al., 2009;

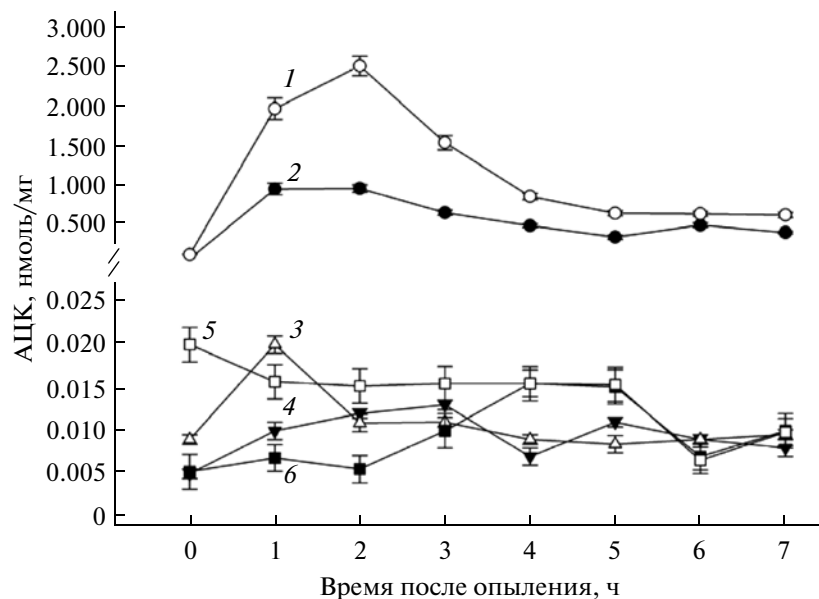


Рис. 6. Динамика АЦК в рыльцах (1, 2), столбиках (3, 4) и завязях (5, 6) петунии после самоопыления самосовместимого (светлые символы) и самонесовместимого (черные символы) клонов.

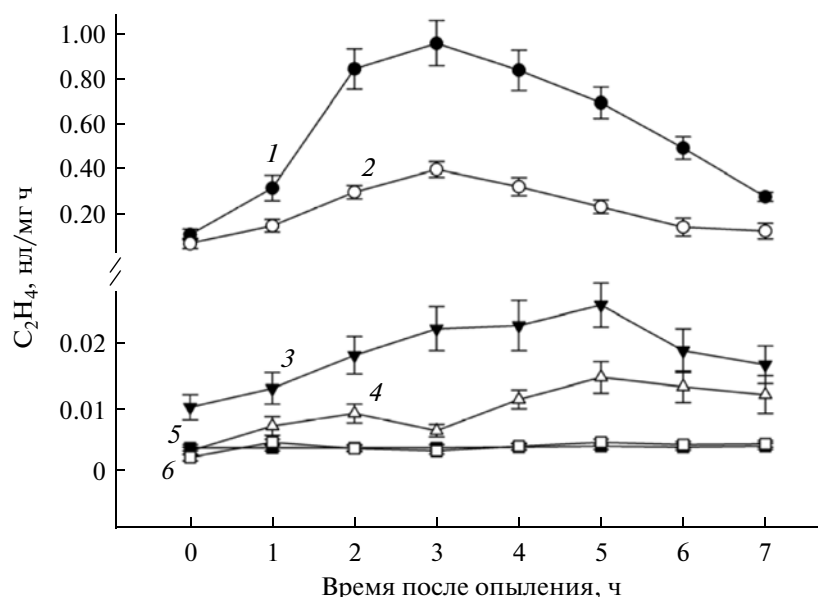


Рис. 7. Выделение этилена рыльцами (1, 2), столбиками (3, 4) и завязями (5, 6) петунии после самоопыления самосовместимого (светлые символы) и самонесовместимого (черные символы) клонов.

Serrano et al., 2010), индуцируемая этиленом (Woltering et al., 1999; Rogers, 2006).

Таким образом, полученные результаты дают основание заключить, что этилен участвует в регуляции развития, прорастания и роста мужского гаметофита в прогамной фазе оплодотворения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие мужской гаметофитной генерации — пыльцы полностью зависит от спорофитных тканей стенки пыльника, в котором осуществляется микроспорогенез, образуются и созревают пыльцевые зерна. Результаты настоящей работы показали, что этилен необходим для ранних стадий микроспорогенеза. Структурные изменения в стенке развивающегося пыльника у фертильных клонов (разрушение тапетума и средних слоев стенки пыльника) сопровождаются повышением выделения этилена на стадиях формирования микроспор и созревания пыльцевых зерен. Обработка бутонов петунии фертильного клона ингибитором синтеза этилена NBD на ранней стадии развития (до инициации Me) приводила к полной остановке развития пыльника и мужского гаметофита. Гибель мужского гаметофита у стерильного клона происходила в профазе мейоза вследствие преждевременного разрушения тапетума и сопровождалась всплеском образования этилена. Высокие концентрации экзогенного этилена приводили к деградации и смерти мужских генеративных клеток фертильного клона на ранних стадиях развития (от мейоза до выхода микроспор из тетрады).

Полагаем, что этилен включается в координацию последовательных событий в пыльнике, необходимых для развития мужского гаметофита, участвуя в инициации ПКС, прежде всего в клетках тапетума.

Согласно полученным в работе данным, *in vitro* прорастание мужского гаметофита петунии сопровождается выделением этилена, образующимся из АЦК, накопленной на завершающих стадиях созревания пыльцевого зерна. Ингибитор синтеза этилена NBD ингибирует прорастание пыльцы.

После опыления пыльцевые зерна прорастают на воспринимающей поверхности рыльца, пыльцевые трубки растут в межклеточном пространстве проводниковой ткани столбика, входят в завязь, доставляя спермии к семязпочке. Компоненты межклеточного матрикса проводниковой ткани пестика чрезвычайно важны для успешного полового воспроизведения. Синтез этилена сопровождается прорастанием и ростом пыльцевых трубок в тканях пестика. Полагаем, что этилен контролирует рост пыльцевых трубок. Кроме этого, наши данные свидетельствуют о возможном участии этилена в механизме гаметофитной самонесовместимости, одного из основных барьеров самооплодотворения.

Суммируя полученные данные, полагаем, что этилен является регулятором гаметофитно-спорофитных взаимодействий в прогамной фазе оплодотворения.

Работа выполнялась при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (гранты № 06-04-48870 и № 10-04-00356).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Добровольская А.А., Родионова Г.Б., Воронков А.С., Ковалева Л.В. Спорофитно-гаметофитные взаимодействия в системе пыльник—мужской гаметофит у петунии // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 437–444.
- Матвеева Н.П., Старостенко Н.В., Тулеева М.И. и др. Изменение пути развития микроспор табака под влиянием внеклеточных факторов, выделяемых *in vitro* // Физиология растений. 1998. Т. 45. С. 730–734.
- Ракитин В.Ю., Ракитин Л.В. Определение газообмена и содержание этилена, двуокиси и кислорода в тканях растений // Физиология растений. 1986. Т. 33. С. 403–413.
- Резникова С.А. Цитология и физиология развивающегося пыльника. М.: Наука, 1984. 270 с.
- Achard P., Baghour M., Chapple A. et al. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem – identity genes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 6484–6489.
- Bleecker A.B., Kende H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants // Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 2000. V. 16. P. 1–18.
- Bui A.Q., O'Neill S.D. Three 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 419–428.
- Butenko M.A., Stenvik G.-E., Alm V. et al. Ethylene-dependent and -independent pathways controlling floral abscission are revealed to converge using promoter::reporter gene constructs in the *ida* abscission mutant // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 3627–3637.
- de Nettancourt D. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Berlin: Springer-Verlag, 2001. 322 p.
- Goldberg R.B., Beals T.P., Sanders P.M. Anther development: basic principles and practical applications // Plant Cell. 1993. V. 5. P. 1217–1229.
- Hirano K., Aya K., Hobo T. et al. Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice // Plant Cell Physiol. 2008. V. 49. P. 1429–1450.
- Hoekstra A.F., Weges R. Lack of control by early pistillate ethylene of the accelerated wilting of *Petunia hybrida* flowers // Plant Physiol. 1986. V. 80. P. 403–408.
- Holden M.J., Marty J.A., Singh-Cundy A. Pollination-induced ethylene promotes the early phase of pollen tube growth in *Petunia inflata* // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 261–269.
- Hua Z.-H., Fields A., Kao T.-h. Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility // Molecular Plant. 2008. V. 1. P. 575–585.
- Ishimaru K., Takada K., Watanabe S. et al. Stable male sterility induced by the expression of mutated melon ethylene receptor genes in *Nicotiana tabacum* // Plant Sci. 2006. V. 3. P. 355–359.
- Kende H. Ethylene biosynthesis // Annu. Rev. Plant Physiol. 1993. V. 44. P. 283–307.
- Koltunow A.M., Truettner J., Cox K.H. et al. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development // Plant Cell. 1990. V. 2. P. 1201–1224.
- Kovaleva L., Zakharova E. Hormonal status of the pollen-pistil system at the progamic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *Petunia hybrida* L. // Sex. Plant Reprod. 2003. V. 16. P. 191–196.
- Lin Z., Zhon S., Grierson D. Recent advances in ethylene research // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 3311–3336.
- Liu X., Shiomi S., Nakatsuka A. et al. Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit // Plant Physiol. 1999. V. 121. P. 1257–1265.
- Lizada M.C., Yang S. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid // Anal. Biochem. 1979. V. 100. P. 140–145.
- Nadeau J.A., Zhang X.S., Nair H. et al. Temporal and spatial regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in the pollination-induced senescence of orchid flowers // Plant Physiol. 1993. V. 103. P. 31–39.
- O'Neill S.D., Nadeau J.A., Zhang X.S. et al. Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination // Plant Cell. 1993. V. 5. P. 419–432.
- Rieu I., Wolters-Arts M., Derksen J. et al. Ethylene regulates the timing of anther dehiscence in tobacco // Planta. 2003. V. 217. P. 131–137.
- Rogers H.J. Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? // Ann. Botany. 2006. V. 97. P. 309–315.
- Serrano I., Salvatore P., Adela O. Programmed-cell-death hallmarks in incompatible pollen and papillar stigma cells of *Olea europaea* L. under free pollination // Plant Cell Rep. 2010. V. 29. P. 561–572.
- Shibuya K., Barry K.G., Ciardi J.A. et al. The central role of *PhEIN2* in ethylene responses throughout plant development in petunia // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 2900–2912.
- Singh A., Evensen K.B., Kao T.-h. Ethylene synthesis and floral senescence following compatible and incompatible pollinations in *Petunia inflata* // Plant Physiol. 1992. V. 99. P. 38–45.
- Tang X., Gomes A.M.T.R., Bhatia A. et al. Pistil-specific and ethylene-regulated expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase genes in petunia flowers // Plant Cell. 1994. V. 6. P. 1227–1239.
- Tang X., Woodson W.R. Temporal and spatial expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase mRNA following pollination of immature and mature petunia flowers // Plant Physiol. 1996. V. 112. P. 503–511.
- Trusov Y., Botella J.R. Silencing of the ACC synthase gene *ACS2* causes delayed flowering in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 3953–3960.
- Wang C.-l., Xu G.-H., Jiang X.-T. et al. S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia in vitro* // Plant Journal. 2009. V. 57. P. 220–229.
- Weterings K., Pezzotti M., Cornelissen M. et al. Dynamic 1-aminocyclopropane-1-carboxylate-synthase and -oxidase transcript accumulation patterns during pollen tube growth in tobacco styles // Plant Physiology. 2002. V. 130. P. 1190–1200.
- Whitehead C.S., Fujino D.W., Reid M.S. Identification of the ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-

carboxylic acid (ACC), in pollen // *Sci. Hortic.* 1983. V. 21. P. 291–297.

Woltering E.J., de Jong A.J., Yakimova E.T. Apoptotic cell death in plants: the role of ethylene / *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene.* Dordrecht: Kluwer, 1999. P. 209–216.

Woltering E.J., Somhorst D., van der Veer P. The role of ethylene in interorgan signaling during flower senescence // *Plant Physiol.* 1995. V. 109. P. 1219–1225.

Xue J., Li Y., Tan F. et al. Expression of ethylene biosynthetic and receptor genes in rose floral tissues during ethylene enhanced flower opening // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 2161–2169.

Role of Ethylene in the Control of Gametophyte-Sporophyte Interactions in the Course of the Progamic Phase of Fertilization

L. V. Kovaleva, G. V. Timofeeva, G. B. Rodionova, E. V. Zakharova, and V. Yu. Rakitin

*Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, ul. Botanicheskaya 35, Moscow, 127276 Russia
e-mail: kovaleva_l@mail.ru*

Abstract—We investigated dynamics of the content of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ethylene production in male gametophyte development and germination in fertile (self-compatible and self-incompatible) and sterile clones of petunia. Fertile male gametophyte development was accompanied by two peaks of ethylene production by anther tissues. The first peak occurred during the microspore development simultaneously with the degeneration of both the tapetal tissues and the middle layers of the anther wall. The second peak coincided with dehydration and maturation of pollen grains. In the anther tissues of the sterile line of petunia, tenfold higher ethylene production was observed at the meiosis stage compared with that in fertile male gametophytes. This fact correlated with the degeneration of both microsporocytes and tapetal tissues. Exogenously applied ethylene (1–100 ppm) induced a degradation of the gametophytic generation at the meiosis stage. According to the obtained data, ethylene synthesis in germinating male gametophyte is provided by a 100-fold ACC accumulation in mature pollen grains. The male gametophyte germination, both in vitro, on the culture medium, and in vivo, on the stigma surface, was accompanied by an increase in ethylene production. Depending on the type of pollination, germination of pollen on the stigma surface and the pollen tube growth in the tissues of style were accompanied by various levels of ACC and ethylene release. The male gametophyte germination after self-compatible pollination was accompanied by higher content of ACC as compared with the self-incompatible clone, whereas, after the self-incompatible pollination, we observed a higher level of ethylene production compared with compatible pollination. For both types of pollination, ACC and ethylene were predominantly produced in the stigma tissues. Inhibitor of ethylene action, 2,5-norbornadiene (NBN), blocked both the development and germination of the male gametophyte. These results suggest that ethylene is an important factor in male gametophyte development, germination, and growth at the progamic phase of fertilization.

Keywords: ethylene, male gametophyte, differentiation, germination, growth, sterility, self-incompatibility, petunia.

УДК 581.1

РОСТ И РАЗВИТИЕ ОГУРЦА *CUCUMIS SATIVUS* L. В ПРЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПЕРИОД В УСЛОВИЯХ ДЛИННЫХ ФОТОПЕРИОДОВ

© 2013 г. Т. Г. Шибаета, Е. Ф. Марковская*

Институт биологии Карельского научного центра РАН
185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11

*Петрозаводский государственный университет
195910 Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33

E-mail: kharkina@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 13.03.12 г.
Окончательный вариант получен 01.11.12 г.

При выращивании растений в условиях защищенного грунта увеличение фотопериода и в т.ч. круглосуточное освещение является одним из путей повышения продуктивности растений и экономии энергоресурсов. Однако, у ряда культур в условиях длинных фотопериодов развиваются признаки светового повреждения листьев и снижается продуктивность. Изучали влияние фотопериода (8, 12, 16, 20 и 24 ч) и плотности потока фотонов (60, 120, и 160 мкмоль/м² с ФАР) на растения огурца *Cucumis sativus* L. в прегенеративный период. Показано, что в ответную реакцию растений огурца на продолжительность фотопериода более 20 ч, включая круглосуточное освещение, в зависимости от возраста растения и условий освещенности, могут быть включены эпинастическая реакция листьев, активация механизма нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла и/или обратимое фотоингибирование реакционных центров фотосистемы II, развитие обратимого хлороза, редукция светособирающего комплекса и повышение содержания каротиноидов. Реакция иматурных и виргинильных растений на длинные фотопериоды отличалась, что свидетельствует о необходимости экспериментального разделения прегенеративного периода развития по возрастным состояниям и учета этого при составлении технологических программ выращивания.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L., иматурная, виргинильная фаза, фотопериод, круглосуточное освещение, фотоингибирование, хлороз.

DOI: 10.7868/S0475145013020092

ВВЕДЕНИЕ

Свет функционально необходим для фотосинтезирующих организмов, трансформирующих и запасующих энергию солнечной радиации в химических связях органического вещества. Вместе с тем, свет является агрессивным фактором способным, при определенном сочетании других факторов среды, вызывать фотоингибирование, фотодинамическое разрушение фотосинтетического аппарата (ФСА) и даже гибель клеток (Demmig-Adams, Adams, 1992; Long et al., 1994; Рубин, 1995; Muraoka et al., 1998). Эта проблема актуальна при выращивании растений в условиях защищенного грунта, где увеличение фотопериода и в т.ч. круглосуточное освещение является одним из путей повышения продуктивности растений (Demers et al., 1998; Sysoeva et al., 2010; Velez-Ramirez et al., 2011), особенно в зимнее время (Dorais, Gosselin, 2002). Зимняя продукция тепличных культур полностью зависит от дополнительного освещения. Чтобы минимизировать за-

траты на обогрев в ночной период, потери энергии и CO₂, необходимый интеграл света от искусственных источников должен быть распределен в течение как можно большего времени в сутках. Однако, в литературе имеются многочисленные данные о негативном влиянии длинных фотопериодов (более 17–20 ч) на рост и продуктивность растений (Demers, Gosselin, 1999; Sysoeva et al., 2010; Velez-Ramirez et al., 2011). Для растений огурца показано, что круглосуточное освещение, применяемое в послерассадный период, приводит к уменьшению площади ассимилирующей поверхности, снижению хлорофилльного индекса (Pettersen et al., 2010), развитию хлороза листьев и снижению урожая плодов (Wolff, Langerud, 2006). Несмотря на многочисленные исследования, механизмы, участвующие в отклике растения на длинные фотопериоды и в т.ч. непрерывное освещение, остаются непонятны.

Целью настоящей работы было изучение влияния длинных фотопериодов на рост, развитие и

состояние ФСА растений огурца в прегенеративный период.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения огурца (*Cucumis sativus* L.) гибрид Зозуля F1 проращивали в термостате при 28°C в течение двух суток, затем высаживали в контейнеры и выращивали методом песчаной проливной культуры в камерах искусственного климата ВКШ-73 при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха 60–70%. Растения поливали полным питательным раствором Кнопа с добавлением микроэлементов (рН 6.2–6.4). Растения выращивали при фотопериодах разной продолжительности (8, 12, 16, 20 и 24 ч) и разной плотности потока фотонов – 60, 120, и 160 мкмоль/м² с ФАР. Далее в тексте данные уровни плотности потока фотонов будем называть “низким”, “средним” и “высоким”. Источник света – лампы ДРЛ-400.

Для анализа использовали растения в двух возрастных состояниях: имматурном (2–3 настоящих листа, 14 день от посадки) и виргинильном (6–8 настоящих листьев, 21 и 28 день от посадки). Визуально определяли появление признаков хлороза. Определяли площадь листьев и сухую биомассу растений (DW) (по фракциям корни, стебли, листья). Относительную скорость роста растений (ОСР, мг/г сут) рассчитывали по формуле:

$$\text{ОСР} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1),$$

где W_1 и W_2 – сухая масса растения в периоды времени t_1 и t_2 .

Рассчитывали удельную площадь листьев (см²/мг), удельную поверхностную плотность листьев (УППЛ, мг/см²), отношение площади листьев к биомассе растения (см²/мг), чистую продуктивность фотосинтеза (ЧПФ, мг/дм² сут). Пластохрон определяли как отрезок времени между достижением двумя последовательными листьями эталонной длины (10 см) (Марковская, Харькина, 1997).

Для измерений флуоресценции хлорофилла (Хл) использовали анализатор фотосинтеза с импульсно-модулированным освещением (MINI-PAM, Walz, Германия). Измерения проводили на активно растущих листьях (1–2 лист у имматурных растений и 3–5 лист у виргинильных растений). Кроме того, на втором, третьем и четвертом листьях измерения проводили каждые 7 дней. Определяли следующие параметры флуоресценции хлорофилла: потенциальный квантовый выход фотохимической активности фотосистемы II (ФС II) (F_v/F_m), относительную скорость транспорта электронов (ETR), коэффициенты фотохимического (qP) и нефотохимического (NPQ) тушения.

Для исследования содержания фотосинтетических пигментов брали пробы из 1–2 листа у имматурных растений и 3–5 листьев у виргинильных растений. Содержание Хл *a* и *b* и каротиноидов (Кар) определяли с помощью спектрофотометра СФ-2000 (Спектр, Россия) в экстракте 96%-ным этиловым спиртом и рассчитывали по известным формулам (Lichtenthaler, Wellburn, 1983). Долю хлорофиллов в ССК рассчитывали, приняв что практически весь хлорофилл *b* находится в ССК, а соотношение хлорофиллов *a* и *b* в этом комплексе составляет 1.2 (Lichtenthaler, 1987). Измерения проводили в 4 биологических и 3 аналитических повторностях.

Все эксперименты, представленные в работе, были проведены в 2-кратной повторности. В таблицах представлены средние значения и их стандартные отклонения. Разницу между средними значениями считали значимой при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Феноменологические наблюдения

У растений огурца обоих возрастных состояний (имматурного и виргинильного) в условиях фотопериодов 20 и 24 ч при всех уровнях плотности потока фотонов наблюдалась эпинастия активно растущих листьев. Механизм эпинастических движений связан с активизацией роста верхней поверхности листа (за счет перераспределения ауксина), что приводит к опусканию листьев и уклонению их от прямого действия света (парагелиотропизм). Это позволяет избегать избыточного поглощения световой энергии листьями и предотвращать фототингирование ФСА растений (Powles, Björkman, 1981; Pastenes et al., 2005). У виргинильных растений, выращиваемых при длинных фотопериодах (20 и 24 ч) при всех плотностях потока фотонов наблюдались визуальные признаки фотоповреждения листьев – хлороз. Чем длиннее был фотопериод и выше плотность потока фотонов, тем раньше и сильнее проявлялись признаки хлороза. Хлороз отмечался на активно растущих листьях. Со временем, у заканчивающих рост листьев наблюдалось частичное устранение признаков хлороза и восстановление их зеленой окраски, в то время как новые активно растущие листья приобретали более выраженные признаки хлороза.

Показатели роста и развития

Анализ ростовых показателей выявил различную реакцию растений разного возрастного состояния в прегенеративный период развития на действие фотопериода и плотности потока фотонов. Так, у растений в имматурном возрастном состоянии показано увеличение ОСР в условиях длинных фотопериодов, включая круглосуточное

Таблица 1. Показатели роста и развития растений *C. sativus* разных возрастных состояний в зависимости от фотопериода и интенсивности освещения

Освещенность, мкмоль/м ² с	Фотопериод, ч	ОСР, мг/г сут	DW, мг сухой массы	ЧПФ, мг/дм ² сут	Площадь листьев, см ²	УППЛ, мг/см ²	Пластохрон, сут
Имматурные растения							
60	8	0.15 ± 0.02	67 ± 2	16 ± 1	32 ± 2	1.3 ± 0.1	1.92 ± 0.07
	12	0.19 ± 0.01	114 ± 4	15 ± 1	58 ± 6	1.3 ± 0.1	1.39 ± 0.05
	16	0.20 ± 0.01	131 ± 4	16 ± 1	62 ± 3	1.5 ± 0.1	1.37 ± 0.05
	20	0.21 ± 0.01	150 ± 7	17 ± 1	64 ± 8	1.7 ± 0.1	1.33 ± 0.04
	24	0.22 ± 0.01	171 ± 12	19 ± 1	68 ± 7	1.8 ± 0.1	1.35 ± 0.04
120	8	0.23 ± 0.01	211 ± 7	16 ± 1	88 ± 9	1.6 ± 0.1	1.79 ± 0.12
	12	0.28 ± 0.02	383 ± 13	17 ± 1	154 ± 11	1.8 ± 0.1	1.56 ± 0.04
	16	0.29 ± 0.01	451 ± 18	17 ± 1	181 ± 14	1.9 ± 0.1	1.47 ± 0.04
	20	0.30 ± 0.01	518 ± 23	18 ± 1	195 ± 24	2.1 ± 0.1	1.39 ± 0.04
	24	0.32 ± 0.01	687 ± 29	24 ± 1	192 ± 19	2.3 ± 0.1	1.33 ± 0.05
160	8	0.29 ± 0.01	431 ± 17	23 ± 2	136 ± 21	2.0 ± 0.1	1.44 ± 0.03
	12	0.34 ± 0.02	780 ± 33	24 ± 2	235 ± 25	2.2 ± 0.1	1.33 ± 0.03
	16	0.35 ± 0.01	921 ± 43	24 ± 2	277 ± 37	2.4 ± 0.1	1.23 ± 0.04
	20	0.36 ± 0.01	1105 ± 35	25 ± 2	319 ± 41	2.6 ± 0.1	1.20 ± 0.03
	24	0.37 ± 0.01	1227 ± 42	26 ± 2	341 ± 38	2.7 ± 0.2	1.16 ± 0.04
Виргинильные растения							
60	8	0.14 ± 0.03	156 ± 13	17 ± 1	83 ± 17	1.2 ± 0.1	1.43 ± 0.06
	12	0.20 ± 0.02	371 ± 23	22 ± 2	194 ± 14	1.3 ± 0.1	1.05 ± 0.05
	16	0.22 ± 0.02	505 ± 44	30 ± 2	207 ± 36	1.7 ± 0.2	0.93 ± 0.06
	20	0.26 ± 0.02	723 ± 26	35 ± 2	276 ± 15	1.7 ± 0.1	0.78 ± 0.03
	24	0.22 ± 0.02	628 ± 27	37 ± 2	208 ± 21	1.9 ± 0.2	0.71 ± 0.03
120	8	0.15 ± 0.02	516 ± 20	16 ± 1	271 ± 21	1.5 ± 0.1	1.00 ± 0.01
	12	0.24 ± 0.01	1613 ± 42	37 ± 2	476 ± 35	1.7 ± 0.2	0.66 ± 0.02
	16	0.24 ± 0.01	1898 ± 47	37 ± 2	560 ± 64	2.1 ± 0.2	0.68 ± 0.01
	20	0.25 ± 0.01	2303 ± 110	48 ± 3	526 ± 58	2.6 ± 0.1	0.70 ± 0.01
	24	0.18 ± 0.02	2048 ± 125	37 ± 3	526 ± 70	2.5 ± 0.1	0.70 ± 0.01
160	8	0.13 ± 0.01	925 ± 36	28 ± 2	249 ± 35	1.6 ± 0.1	1.20 ± 0.03
	12	0.16 ± 0.01	2054 ± 72	44 ± 3	415 ± 47	1.7 ± 0.1	0.97 ± 0.03
	16	0.22 ± 0.02	3423 ± 114	65 ± 6	551 ± 49	2.2 ± 0.1	0.80 ± 0.02
	20	0.21 ± 0.01	3970 ± 102	83 ± 7	490 ± 47	2.5 ± 0.1	0.85 ± 0.02
	24	0.18 ± 0.01	3686 ± 119	77 ± 7	454 ± 43	2.5 ± 0.1	0.91 ± 0.02

освещение при более высоких значениях плотности потока фотонов (табл. 1). Анализ компонентов ОСР показал, что отмеченный результат связан с компенсаторными взаимодействиями отдельных составляющих: с увеличением фотопериода отмечено увеличение значений ЧПФ, которые сочетались со снижением удельной площади листьев и, соответственно снижением отношения площади листьев к биомассе растения. Повышение ОСР за счет ЧПФ при круглосуточ-

ном освещении отмечалось и у других видов культурных растений (Inada, Yabumoto, 1989). Накопление биомассы у имматурных растений возрастало с увеличением плотности потока фотонов и при увеличении фотопериода от 8 до 24 ч (табл. 1). При этом наблюдалась и тенденция к увеличению УППЛ с увеличением продолжительности фотопериода (табл. 1). В условиях длинных фотопериодов в расчете на единицу поверхности листа синтезируется большая биомасса, что косвенно ука-

зывает на большую эффективность процессов фотосинтеза. Величина пластохрона у имматурных растений уменьшалась с увеличением фотопериода от 8 до 16 ч, но дальнейшее увеличение фотопериода до 20 и 24 ч не приводило к достоверным изменениям (табл. 1), однако можно отметить тенденцию к ускорению развития в условиях длинных фотопериодов.

У более взрослых растений, в виргинильном возрастном состоянии, были получены несколько иные зависимости. Прежде всего, отмечалось некоторое уменьшение значений ОСР по сравнению с имматурными растениями, что связано с онтогенетическими изменениями. Увеличение фотопериода от 8 до 20 ч приводило к увеличению накопления биомассы, повышая ОСР, но продление фотопериода до 24 ч не привело к дальнейшему увеличению накопления биомассы, т.к. значения ОСР снижались при всех уровнях плотности потока фотонов (табл. 1). Анализ компонентов ОСР показал, что снижение в условиях круглосуточного освещения вызвано снижением значений ЧПФ, более не компенсировавших снижение отношения площади листьев к биомассе растения и удельной площади листьев, как это происходило у имматурных растений. В условиях круглосуточного освещения значения УППЛ у виргинильных растений не отличались от таковых у растений, выращенных при фотопериоде 20 ч (табл. 1). Реакция величины пластохрона на фотопериод у виргинильных растений зависела от уровня плотности потока фотонов. Так, при низкой плотности потока фотонов величина пластохрона уменьшалась с увеличением фотопериода и достигала минимальных значений при круглосуточном освещении. При средней и высокой плотности потока фотонов минимум достигался при фотопериоде 16 ч и дальнейшее увеличение фотопериода либо не изменяло достоверно величину пластохрона (при средней плотности потока фотонов), либо приводило к некоторому замедлению развития (при высокой плотности потока фотонов) (табл. 1). Т.к. круглосуточное освещение не приводило к значительным изменениям величины пластохрона по сравнению с фотопериодом 20 ч, то уменьшение площади листьев у виргинильных растений при круглосуточном освещении по сравнению с фотопериодом 20 ч происходило не за счет разного количества листьев на растении, а за счет уменьшения площади индивидуальных листьев.

Активность ФСА растений

У имматурных растений всех вариантов опыта не было достоверных различий по значениям F_v/F_m , которые находились в области от 0.79 до 0.81, что соответствует полноценно функционирующей ФС II. Однако, в условиях круглосуточ-

ного освещения по сравнению с фотопериодом 20 ч при всех уровнях плотности потока фотонов были отмечены более низкие значения ETR (на 13–20%) и qP (на 18–35%), но более высокие значения NPQ (на 30–70%) (табл. 2). Содержание Хл *a* и *b* у имматурных растений было минимальным при фотопериоде 8 ч, а при фотопериодах от 12 до 24 ч достоверно не отличалось, хотя и прослеживалась тенденция к снижению при круглосуточном освещении (данные не приведены). Достоверных изменений в содержании Кар отмечено не было.

В начале виргинильного периода у активно растущих листьев в условиях средней и высокой плотности потока фотонов при круглосуточном освещении значения F_v/F_m начали снижаться, достигая значений 0.62–0.74, что указывало на изменения в активности реакционных центров ФСII. В условиях всех других фотопериодов значения F_v/F_m сохранялись в пределах 0.79–0.81.

У виргинильных растений в фазе 7–8 листьев в условиях длинных фотопериодов (20 и 24 ч) при средней и высокой плотности потока фотонов величина F_v/F_m у активно растущих листьев значительно снижалась, достигая самых низких значений (0.6–0.63) в условиях круглосуточного освещения. У всех растений ETR была почти вдвое ниже, чем у имматурных растений, а при фотопериоде 24 ч и высокой плотности потока фотонов это снижение составило более 50%. При всех уровнях плотности потока фотонов у виргинильных растений, как и у имматурных, отмечалось снижение значений ETR и qP в условиях круглосуточного освещения, однако, в отличие от имматурных растений, значительно снижались и значения NPQ (табл. 2). Следует отметить, что эти значения NPQ соответствовали таковым у имматурных растений при более коротких фотопериодах (16 и 20 ч).

У листьев, рост которых был уже замедлен или прекращен, наблюдалось восстановление значений F_v/F_m . Так, например, в условиях фотопериода 24 ч и высокой плотности потока фотонов наблюдалось снижение F_v/F_m на третьей неделе выращивания (рис. 1), что совпадало по времени с наиболее выраженными признаками хлороза, однако уже через неделю значения F_v/F_m возрастали, что совпадало с визуальной оценкой частичного устранения хлороза.

У виргинильных растений развитие хлороза при круглосуточном освещении подтвердилось данными о снижении общего содержания Хл *a* и *b* (рис. 2). У растений в условиях фотопериода 20 ч значительного снижения содержания зеленых пигментов отмечено не было, хотя слабый хлороз листьев наблюдался. Изменения в пигментном комплексе происходили в основном за счет снижения содержания Хл *b*, что привело к увеличе-

Таблица 2. Параметры флуоресценции хлорофилла и отношение фотосинтетических пигментов у растений *C. sativus* разных возрастных состояний в зависимости от фотопериода и интенсивности освещения

Освещенность, мкмоль/м ² с	Фотопериод, ч	F_v/F_m	ETR	qP	NPQ	Хл a/b	ССК, %	Хл/Кар
Имматурные растения								
60	16	0.79a	89a	0.83a	0.44a	2.6a	61a	6.8a
	20	0.81b	95a	0.82a	0.44a	2.3a	65a	5.5a
	24	0.81b	79b	0.67b	0.72b	2,2a	69a	7.0a
120	16	0.79a	76a	1.02a	0.38a	2.8a	58a	5.0a
	20	0.79a	81a	0.96a	0.30a	2.6a	61a	4.8a
	24	0.79a	65b	0.62b	0.51b	2.3a	71b	4.7a
160	16	0.80a	75a	0.78a	0.40a	1.8a	88a	7.9a
	20	0.80a	80a	0.68a	0.46a	1.9a	87a	6.5b
	24	0.79a	70a	0.56b	0.60b	1.9a	85a	6.6b
Виргинильные растения								
60	16	0.81a	47a	0.63a	0.86a	2.1a	72a	7.8a
	20	0.79a	45a	0.62a	0.70b	2.5b	67b	5.8b
	24	0.79a	41b	0.61a	0.58c	2.7b	60c	3.6c
120	16	0.74a	54a	1.00a	0.59a	2.1a	83a	5.9a
	20	0.71b	47b	1.14b	0.46b	2.6b	74b	4.6b
	24	0.63c	35c	0.98a	0.35c	2.7b	74b	3.7c
160	16	0.78a	68a	0.78a	0.82a	2.0a	84a	5.8a
	20	0.71b	50b	0.60b	0.38b	2.5b	80b	5.2b
	24	0.60c	29c	0.32c	0.27c	3.1c	71c	3.1c

Разные буквы указывают на достоверные различия ($P \leq 0.05$).

нию соотношения Хл a/b в условиях длинных фотопериодов (табл. 2). Наряду с уменьшением общего содержания Хл, наблюдалось некоторое снижение доли Хл, принадлежащего ССК (табл. 2). Также в условиях длинных фотопериодов происходило некоторое увеличение содержания Кар (рис. 3), в результате чего соотношение Хл/Кар уменьшилось (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что растения огурца в обоих возрастных состояниях реагируют на длинные фотопериоды при любой плотности потока фотонов. Даже в условиях невысокой плотности потока фотонов при длине фотопериода 20 ч и более у имматурных растений наблюдались эпинастические движения листьев. Известно, что эпинастические движения у растений связаны с избеганием избыточной освещенности, а в наших опытах они наблюдались даже в условиях невысокой освещенности. Учитывая, что величина интеграла суточной радиации в

условиях фотопериода 24 ч для варианта с плотностью потока фотонов 120 мкмоль/м²с составляла 10.3 моль/м²сут, варианта 160 мкмоль/м²с – 13.8 моль/м²сут, что значительно ниже уровня интеграла суточной радиации, рекомендуемого для культуры огурца – 25 моль/м²сут (Мое et al., 2006), можно предположить, что эпинастия листьев в данном случае является реакцией на длительный фотопериод, нежели на поступление избыточной световой энергии. В этих условиях растения вырабатывают защитные приспособления, которые позволяют им уберечься от условий длительного поступления световой энергии. У виргинильных растений в условиях длинных фотопериодов развивались признаки светового повреждения листьев – хлороза. Ранее также было показано, что хлороз листьев появлялся у растений огурца после смены фотопериода 18 ч в послерассадном периоде на круглосуточное освещение (Wolf, Langerud, 2006).

В настоящей работе показано увеличение накопления биомассы у имматурных растений в

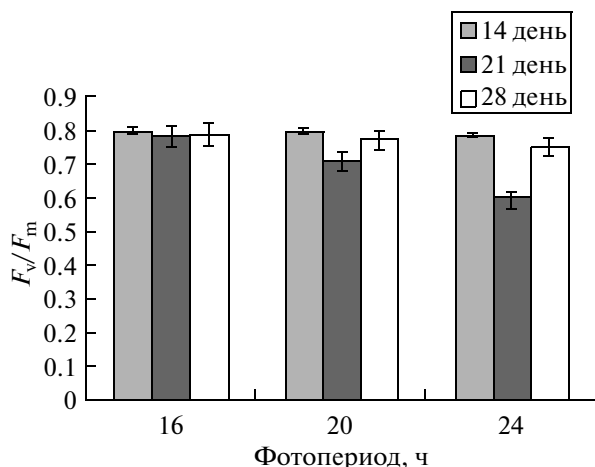


Рис. 1. Динамика изменения потенциального квантового выхода фотохимической активности ФС II (F_v/F_m) второго листа в условиях высокой плотности потока фотонов при разных фотопериодах.

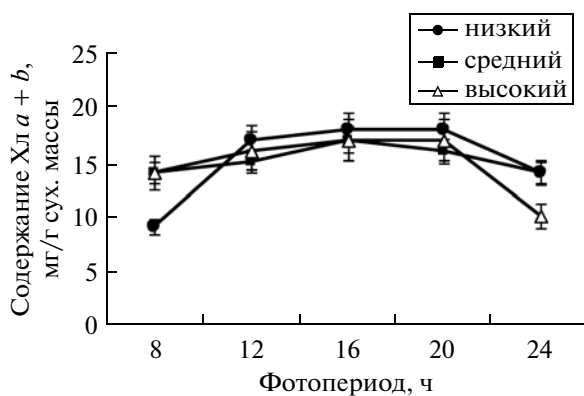


Рис. 2. Содержание хлорофиллов (*a*, *b*) в листьях виргинильных растений *Cucumis sativus* в условиях низкой, средней и высокой плотности потока фотонов и разной продолжительности фотопериода.

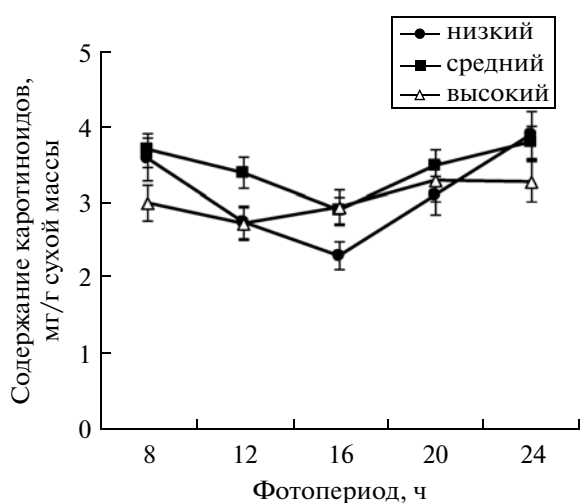


Рис. 3. Содержание каротиноидов в листьях виргинильных растений *Cucumis sativus* в условиях низкой, средней и высокой плотности потока фотонов и разной продолжительности фотопериода.

условиях длинных фотопериодов, которое происходило за счет повышения ЧПФ на фоне уменьшения размеров ассимилирующей поверхности. Возможно, снижение удельной площади листьев с увеличением фотопериода в наших опытах связано с увеличением интеграла света, что согласуется с ранее полученными для огурца данными (Lorenz, 1980), в т.ч. при круглосуточном освещении (Warrington, Norton, 1991). Увеличение же накопления биомассы может быть связано с увеличением скорости фотосинтеза, обусловленным развитием палисадной ткани и соответственно увеличением УППЛ, которое наблюдали у иматурных растений в условиях длинных фотопериодов.

Феномен эпинастии, который отмечали у иматурных растений в условиях круглосуточного освещения, сопровождался значительным повышением NPQ, что хорошо укладывается в существующие представления о механизме защиты фотосинтезирующих клеток с помощью тепловой диссипации избытка поглощенной антенными Хл световой энергии (Adams et al., 2006), что предотвращает фотоинактивацию и фотоповреждение ФСII. Процесс нефотохимического тушения возбужденных состояний Хл восстанавливает энергетический баланс на уровне ФСА, что приводит к отсутствию стрессовой реакции организма, о чем можно судить по величине F_v/F_m , которая у иматурных растений оставалась близкой к норме (около 0.8) и стимуляции процессов роста и развития в условиях длинных фотопериодов.

У виргинильных растений, наряду с эпинастической реакцией отмечалось развитие хлороза. Снижение значений F_v/F_m при средней и высокой плотности потока фотонов на длинных фотопериодах 20 и 24 ч свидетельствовали о значимых нарушениях в работе ФСА (фотоингибировании) (Lichtenthaler et al., 2004). Значения NPQ сохранялись высокими во всех вариантах опыта, за исключением круглосуточного освещения с высокой плотностью потока фотонов, т.е. как и у иматурных растений, ликвидация избыточно поглощенной световой энергии происходила за счет активации механизмов NPQ. В условиях же круглосуточного освещения при высокой плотности потока фотонов происходило снижение значений ETR, qP и NPQ. В условиях круглосуточного освещения происходило снижение содержания Хл, что, по-видимому, и привело с одной стороны к уменьшению NPQ почти вдвое, а с другой – к снижению показателей функциональной активности – ETR и qP и развитию хлороза. Снижение концентрации зеленых пигментов в листьях направлено на уменьшение эффективности абсорбции света ФСА на единицу площади растений (Öquist, Huner, 2003) и может служить одним из способов защиты от избыточной инсоляции. Такой механизм был обнаружен у листьев

зимнелетних растений, произрастающих на полном солнечном свете (Adams et al., 2002; Дымова, Головки, 2007). Наряду с уменьшением общего содержания фотосинтетических пигментов, наблюдалось увеличение соотношения Хл a/b и редукция ССК, что для C_3 -видов характерно при адаптации к высокой освещенности (Björkman, Holmgren, 1963).

Известно, что фотоингибирование реакционного центра (РЦ) ФС II, вызванное действием видимого света высокой интенсивности на ФСА, может быть обратимым (“динамическим”) и необратимым (“хроническим”) (Gomez et al., 1998). В наших экспериментах, судя по восстановлению значений F_v/F_m у листьев закончивших активный рост, процесс фотоингибирования ФС II связан только с инактивацией РЦ ФС II, а не его повреждением при круглосуточном освещении и оказался обратимым. По всей видимости, у растущих листьев в условиях избыточной радиации усиливаются деструктивные процессы в ФСII, которые по мере завершения роста листа уравниваются репаративными процессами, в результате чего величина F_v/F_m приближается к норме.

Наблюдаемое снижение соотношения зеленых и желтых пигментов при круглосуточном освещении, свидетельствующее об относительно более высоком содержании Кар в фонде фотосинтетических пигментов, вероятно, связано с их протекторной функцией при адаптации ФСА растений к избыточной радиации (Demmig-Adams, Adams, 1992; Demers, Gosselin, 2002).

Результаты настоящей работы показали, что у имматурных растений во всех вариантах опыта работа ФСА коррелировала с ростовыми процессами и с увеличением плотности потока фотонов и фотопериода накопление биомассы увеличивалось. В случаях, когда поглощение ФСА световой энергии превышало ее использование для ассимиляции CO_2 (в условиях круглосуточного освещения) ФСА этих растений проявлял устойчивость к избыточной ФАР, в основном, за счет активации механизмов NPQ. У виргинильных растений в условиях длинных фотопериодов также происходило поглощение избыточной световой энергии и для обеспечения процессов нормальной жизнедеятельности работал механизм NPQ, однако растения в условиях круглосуточного освещения оказались в стрессовой ситуации, сопровождаемой фотоингибированием, о чем свидетельствовали низкие значения F_v/F_m . У этих растений отмечалось снижение общего содержания Хл, редукция ССК, что привело, соответственно, к снижению ETR, qP и NPQ и, как следствие, должно было привести к снижению продуктивности. Однако в наших опытах существенного снижения продуктивности у растений в условиях круглосуточного освещения по сравнению с другими длинными фотопериодами не

произошло. Возможно, это связано со способностью листьев переходить в состояние “временного функционального хлороза”, который проходит, когда лист прекращает рост. Этот процесс можно рассматривать как один из путей адаптации растений защищенного грунта к круглосуточному освещению. Из литературы известно, что одним из путей снижения суммарного поглощения световой энергии у растений Крайнего севера в условиях круглосуточного освещения является уменьшение содержания Хл (Любименко, 1963; Шмакова, Марковская, 2010), но оно в природе не приводит к понижению функциональной активности. Кроме того, вопрос о том, является ли фотоингибирование стресс-реакцией или это регуляторный процесс, направленный на согласование световых реакций фотосинтеза со сложной и разветвленной последовательностью реакций метаболизма, остается дискуссионным (Osmond, Forster, 2006).

Полученные в настоящей работе данные дают основание для гипотезы о системной ответной реакции, которая может формироваться при выращивании растений огурца при фотопериодах длиннее 20 ч, в т.ч. при круглосуточном освещении. В ответную реакцию огурца на длинные фотопериоды, в зависимости от возраста растения (нельзя исключить фактор длительности воздействия) и условий освещенности, могут быть включены эпинастическая реакция листьев для избегания поглощения избыточной радиации, активация механизма NPQ для рассеивания избыточно поглощенной энергии, и/или обратимое фотоингибирование РЦ ФС II, развитие обратимого хлороза, редукция ССК, повышение содержания Кар. Сочетание всех этих процессов формирует динамическую системную реакцию организма на длинный фотопериод у сельскохозяйственных растений, чувствительных к непрерывному освещению, выращиваемых в защищенном грунте в условиях высоких широт.

Проведенные исследования показали, что использование фотопериодов более 20 ч в технологии выращивания растений огурца в прегенеративный период имеет определенные ограничения. Для имматурных растений, т.е. в предрасадный период, распределение интеграла света в течение 20–24 ч может быть выгодным как с точки зрения экономии энергоресурсов, так и способствовать увеличению продуктивности. Для виргинильных растений такой световой режим с очень длинными фотопериодами не будет приводить к увеличению продуктивности, но, в случае каких-либо технических ограничений или необходимости (напр., для избегания резких снижений температуры в зимний период), этот прием возможен в течение ограниченного времени. Настоящие опыты показали разную реакцию растений огурца на разных этапах онтогенеза, что сви-

детельствует о необходимости экспериментального разделения прегенеративного периода развития по возрастным состояниям и включение этого в технологические программы выращивания.

Авторы выражают благодарность И.И. Слободяник за помощь в проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дымова О.А., Головкин Т.К. Состояние пигментного аппарата растений живучки ползучей в связи с адаптацией к световым условиям произрастания // Физиология растений. 2007. Т. 54. С. 521–528.
- Любименко В.Н. Избранные труды. Т. 2. Работы по фотосинтезу и приспособлению растений к свету. Киев: Изд-во АН УССР, 1963. С. 328–402.
- Марковская Е.Ф., Харьковина Т.Г. Временная организация процесса формирования листовой поверхности *Cucumis sativus* L. // Онтогенез. 1997. Т. 28. № 2. С. 83–87.
- Рубин А.Б. Принципы организации и регуляции первичных процессов фотосинтеза // Тимирязевские чтения LV. Пушино: ОНТИ ПНЦРАН, 1995. 38 с.
- Шмакова Н.Ю., Марковская Е.Ф. Фотосинтетические пигменты растений и лишайников арктических тундр Западного Шпицбергена // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 6. С. 764–769.
- Adams W.W., Demmig-Adams B., Rosenstiel T.N. et al. Photosynthesis and photoprotection in overwintering plants // Plant Biol. 2002. V. 4. P. 545–557.
- Adams W.W. III, Zarter C.R., Much K.E. et al. Energy dissipation and photoinhibition: a continuum of photoprotection // Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment / Eds. Demmig-Adams B., Adams W.W. III, Mattoo A.K., Dordrecht: Springer-Verlag, 2006. P. 49–64.
- Björkman O., Holmgren P. Adaptability of the photosynthetic apparatus to light intensity in ecotypes from exposed and shaded habitats // Physiol. Plant. 1963. V. 16. P. 889–914.
- Demers D.A., Gosselin A. Supplemental lighting of greenhouse vegetables: limitations and problems related to long photoperiods // Acta Hort. 1999. V. 481. P. 469–473.
- Demers D.A., Gosselin A. Growing greenhouse tomato and sweet pepper under supplemental lighting: optimal photoperiod, negative effects of long photoperiod and their causes // Acta Hort. 2002. V. 580. P. 83–88.
- Demers D.A., Wien H.C., Gosselin A. Effects of supplemental light duration on greenhouse sweet pepper plants and fruit yields // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1998. V. 123. P. 202–207.
- Demmig-Adams B., Adams W.W. III. Photoprotection and other responses of plants to high light stress // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992. V. 43. P. 599–626.
- Dorais M., Gosselin A. Physiological response of greenhouse vegetable crops to supplemental lighting // Acta Hort. 2002. V. 580. P. 59–67.
- Gomez I., Porez-Rodriguez E., Vinegla B. et al. Effects of solar radiation on photosynthesis, UV-absorbing compounds and enzyme activities of the green alga *Dasycladus vermicularis* from Southern Spain // J. Photochem. and Photobiol. B: Biol. 1998. V. 47. P. 46–57.
- Hay R.K.M., Heide O.M. Specific photoperiodic stimulation of dry matter production in high-latitude cultivar of *Poa pratensis* // Physiol. Plant. 1983. V. 57. P. 135–142.
- Heide O.M., Bush M.G., Evans L.T. Interaction of photoperiod and gibberellin on growth and photosynthesis of high-latitude *Poa pratensis* // Physiol. Plant. 1985a. V. 65. P. 135–145.
- Heide O.M., Hay R.K.M., Baugeröd H. Specific day length effects on leaf growth and photosynthesis of high-latitude grasses // Ann. Bot. 1985b. V. 55. P. 579–586.
- Inada K., Yabumoto Y. Effect of light, quality, daylength and periodic temperature variation on the growth of lettuce (*Lactuca sativa*) and radish (*Raphanus sativus*) plants // Jap. J. Crop Sci. 1989. V. 58. № 4. P. 689–694.
- Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods Enzymol. 1987. V. 148. P. 350–382.
- Lichtenthaler H., Buschmann C., Knapp M. Measurement of chlorophyll fluorescence kinetics (Kautsky effect) and the chlorophyll fluorescence decrease ratio (RFD-Values) with the PAM-fluorometer // Analytical methods in plant stress biology / Eds. Filek M., Biesaga-Kościelnik J., Marcińska I. Kraków, 2004. P. 93–111.
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents // Biochem. Soc. Trans. 1983. V. 603. P. 591–592.
- Long S.P., Humphries S., Falkowski P.G. Photoinhibition of photosynthesis in nature // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1994. V. 45. P. 633–662.
- Lorenz H.P. Modelluntersuchungen zur Klimareaktion von Wachstumskomponenten am Beispiel junger Salatgurkenpflanzen (*Cucumis sativus* L.): ein Beitrag zur Temperaturführung in Gewächshäusern. Hannover, 1980. 138 p.
- Moe R., Grimstad S., Gislørød H.R. The use of artificial light in year round production of greenhouse crops in Norway // ISHS Acta Hort. 2006. V. 711: V International Symposium on Artificial Lighting in Horticulture. P. 35–42.
- Muraoka H., Takenaka A., Tang Y. et al. Flexible leaf orientations of *Arisema heterophyllum* maximize light capture in a forest understory and excess irradiance at defrosted site // Ann. Bot. 1998. V. 82. P. 297–307.
- Öquist G., Huner N.P.A. Photosynthesis of overwintering evergreen plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2003. V. 54. P. 329–355.
- Osmond B., Forster B. Photoinhibition: then and now // Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment / Eds. Demmig-Adams B., Adams W.W. III, Mattoo A.K. Dordrecht: Springer-Verlag, 2006. P. 11–22.
- Pastenes C., Pimentel P., Lillo J. Leaf movements and photoinhibition in relation to water stress in field-grown beans // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 425–433.
- Pettersen R.I., Torre S., Gislørød H.R. Effects of leaf aging and light duration on photosynthetic characteristics in a cucumber canopy // Sci. Hort. 2010. V. 125. № 2. P. 82–87.

- Powles S.B., Björkman O. Leaf movement in the shade species *Oxalis oregana*. II. Role in protection against injury by intense light // Carnegie Inst. Wash. Yearb. 1981. V. 80. P. 63–66.
- Solhaug K.A. Influence of photoperiod and temperature on dry matter production and chlorophyll content in temperate grasses // Norweg. J. Agric. Sci. 1991. V. 5. P. 365–383.
- Sysoeva M.I., Markovskaya E.F., Shibaeva T.G. Plants under continuous light: a review // Plant Stress. 2010. V. 4. № 1. P. 5–17.
- Velez-Ramirez A.I., van Ieperen W., Vreugdenhil D. et al. Plants under continuous light // Trends in plant science. 2011. V. 16. № 6. P. 310–318.
- Warrington I.J., Norton R.A. An Evaluation of plant growth and development under various daily quantum integrals // J. Am. Soc. Hortic. Sci. 1991. V. 116. P. 544–551.
- Wolff S.A., Langerud A. Fruit yield, starch content and leaf chlorosis in cucumber exposed to continuous lighting // Europ. J. Hortic. Sci. 2006. V. 71. P. 259–261.

Growth and Development of Cucumber *Cucumis sativus* L. in the Prereproductive Period under Long Photoperiods

T. G. Shibaeva^a and E. F. Markovskaya^b

^a Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Sciences, ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia

^b Petrozavodsk State University, pr. Lenina 33, Petrozavodsk, 195910 Russia
e-mail: kharkina@krc.karelia.ru

Abstract—When plants are grown in a greenhouse, an increase in the photoperiod, as well as continuous lighting, is one of the ways to improve plant productivity and energy savings. However, a number of crops under long photoperiods develop signs of light damage to leaves, and productivity is reduced. We studied the effect of the photoperiod (8, 12, 16, 20, and 24 h) and photon flux densities (60, 120, and 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ with PAR) on cucumber plants *Cucumis sativus* L. in a prereproductive period. We show that the response of the cucumber plants to a photoperiod duration of more than 20 h, including continuous lighting, depending on the plant age and lighting conditions, may include epinastic reaction of the leaves, activation of a mechanism of nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching, and/or reversible photoinhibition of a reaction center of photosystem II, development of reversible chlorosis, reduction of a light-harvesting complex, and increase in the content of carotenoids. Reaction of immature and virginile plants to long photoperiods was different, which highlights the need for experimental separation of the prereproductive period of development in terms of age states and consideration of this when preparing programs of cultivation.

Keywords: *Cucumis sativus* L., immature, virginile phase, photoperiod, continuous lighting, photoinhibition, chlorosis.

УДК 581.1:577.214.625:578.853

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *AINTEGUMENTA* РАПСА ПОД КОНТРОЛЕМ ПРОМОТОРА ВИРУСА МОЗАИКИ ГЕОРГИНА

© 2013 г. Б. Р. Кулуев, А. В. Князев, А. В. Чемерис, В. А. Вахитов

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,
450054 Уфа, ул. Проспект Октября, д. 71
E-mail: kuluev@bk.ru

Поступила в редакцию 26.04.12 г.
Окончательный вариант получен 25.10.12 г.

Получены трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *AINTEGUMENTA* рапса под контролем 35S промотора и промотора вируса мозаики георгина. Трансгенные растения характеризовались увеличением длины листьев, размеров цветка, высоты стебля и массы семян, причем степень увеличения была больше в случае использования в качестве регулятора транскрипции промотора вируса мозаики георгина. Эктопическая экспрессия гена *AINTEGUMENTA* способствовала пролонгации роста листьев, при этом размеры клеток эпидермиса листьев оставались неизменными.

Ключевые слова: размеры органов, *AINTEGUMENTA*, трансгенные растения, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*.

DOI: 10.7868/S0475145013020080

ВВЕДЕНИЕ

Создание трансгенных растений с увеличенными размерами органов представляет большой интерес для сельского и лесного хозяйств. Одним из перспективных методов получения таких растений являются манипуляции с уровнем экспрессии различных транскрипционных факторов, участвующих в регуляции роста и развития растений. Ген *AINTEGUMENTA* (*ANT*) кодирует транскрипционный фактор, относящийся к семейству AP2/ERF, подсемейству AP2, к группе ANT (Kim et al., 2006). Одной из мишеней ANT является ген *CYCLIND3;1*, который регулирует клеточное деление и способствует поддержанию клеток органа на стадии S (Mizukami, Fischer, 2000). Транскрипция гена *ANT* стимулируется белком ARGOS, экспрессия которого, в свою очередь, индуцируется ауксином (Hu et al., 2003). Было показано, что трансгенные растения, сверхэкспрессирующие ген *ANT* под контролем 35S промотора, характеризуются несколько большими размерами не только генеративных (Krizek, 1999), но и вегетативных органов (Mizukami, Fischer, 2000). У рапса обнаружены два гена-кандидата *ANT* с названиями *BnaX.ANT.a* (DQ211969) и *BnaX.ANT.b* (DQ211970) (Chen et al., 2010). Исходя из литературных данных следует, что повышение уровня экспрессии гена *ANT* вполне может стать одним из методов создания трансгенных растений с увеличенными размерами листьев, стеблей, цветков, плодов и семян (Mizukami, Fischer, 2000). Для по-

вышения уровня экспрессии целевых генов в трансгенных растениях чаще всего применяют 35S промотор, однако на практике применение данного промотора часто оказывается неэффективным (Mitsuhara et al., 1996). В связи с этим, нами ранее был выделен промотор вируса мозаики георгина (ВМГ), который в трансгенных растениях табака оказался немного сильнее 35S промотора (Кулуев и др., 2010). В данной работе с целью получения трансгенных растений с увеличенными размерами органов нами был использован полноразмерный ген *ANT* рапса, а именно *BnaX.ANT.b*, в сочетании как с 35S промотором, так и с промотором вируса мозаики георгина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Участок ДНК, содержащий ген *BnaX.ANT.b*, был амплифицирован из геномной ДНК рапса при помощи праймеров ANTRapF ACAATG-GAGTCTTTTGTGATAATG и ANTRapR ACAT-CAAGAATCAGCCCAAGCAG. Затем ген *BnaX.ANT.b* выщепили из вектора pKRX по сайту *BsePI* и осуществили его ненаправленное клонирование в бинарных векторах pCambia 2201 с 35S промотором и pCambia 2301 (CAMBIA, Австралия) с промотором вируса мозаики георгина (Кулуев и др., 2011). Для поиска целевых клонов содержащих ген *BnaX.ANT.b* в смысловой ориентации при лигировании в векторе pCambia 2201, использовали праймер 35SCambF: AGAGGAC-

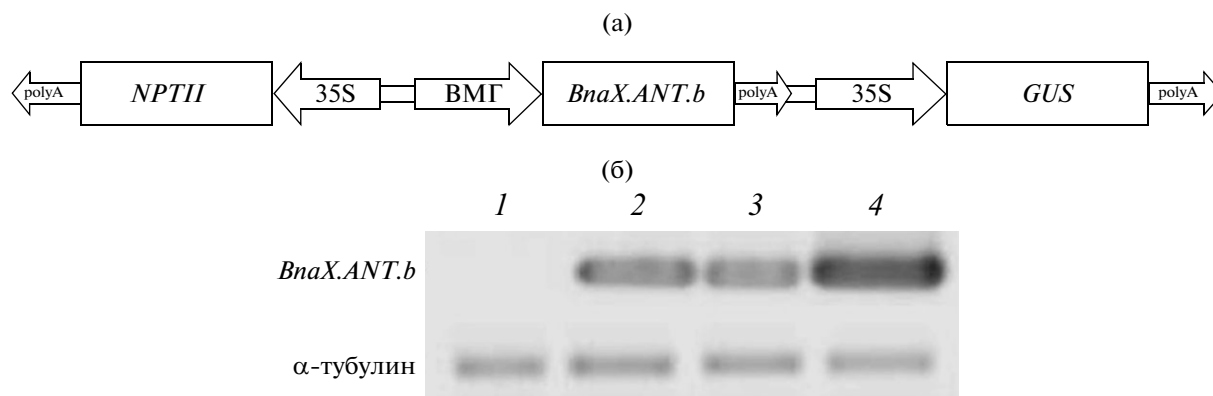


Рис. 1. а – Генно-инженерная конструкция Т-ДНК бинарного вектора рCambia 2301, состоящая из селективного и репортерного генов, а также целевого гена *BnaX.ANT.b* под контролем промотора вируса мозаики георгина. 35S – 35S промотор; BMГ – промотор вируса мозаики георгина; *NPTII* – ген неомицинфосфотрансферазы II; *GUS* – ген β -глюкуронидазы; polyA – сайт полиаденилирования вируса мозаики цветной капусты. б – Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР гена *BnaX.ANT.b* в исследуемых линиях трансгенных растений: 1 – контрольное растение; 2 – трансгенное растение линии 2201/BnANT № 21; 3 – трансгенное растение линии 2201/BnANT № 23; 4 – трансгенное растение линии 2301/BnANT № 67.

СТААСАГААСТСГ, а при лигировании в векторе рCambia 2301 использовали праймер DMVF ATCAACGGAGAAACAAAGAT. После полной проверки, полученные в ходе работы две генно-инженерные конструкции с геном *BnaX.ANT.b* под контролем 35S промотора и промотора BMГ (рис. 1а) были введены в клетки *A. tumefaciens*.

Трансгенные формы табака (*Nicotiana tabacum* L. Petit Havana SR-1) получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков (Кулуев и др., 2011). Растения трансгенных линий и контрольные растения культивировали в вегетационных сосудах объемом 450 мл, заполненных универсальным грунтом (Гера, Россия) на светоплощадке при температуре 26°C с фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота) и освещенностью около 10 клк. Проростки выращивали в течение 20-ти дней на агаризованной среде МС, затем определяли длину гипокотыля и корешков и пересаживали их на почву. Замеры величины листьев производили только после пересадки в почву, через 30, 45 дней и в период цветения, в итоге было осуществлено 3 замера. По каждому варианту было отобрано по 5 растений, у которых определяли среднюю длину, площадь трех нижних листьев и высоту стебля. Отмечали время перехода к цветению, определяли длину цветка, начиная от цветоножки и заканчивая краем желобка венчика. Измеряли длину 3-х цветков с каждого растения начиная от цветоножки и заканчивая краем желобка венчика и вычисляли среднее значение. У трансгенных растений собирали семена, распределяли их по 30 штук, измеряли их массы и определяли среднее значение, при этом выборка состояла из 10-ти групп семян. Для изучения вли-

яния конститутивной экспрессии целевого гена на размеры клеток, проводили измерения площади клеток нижнего эпидермиса листьев одного возраста при помощи универсального флуоресцентного микроскопа модели Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия). В качестве контроля использовали трансгенные растения табака, трансформированные Т-ДНК бинарного вектора рCambia 2301 без вставки целевого гена. Для ОТ-ПЦР гена *BnaX.ANT.b* использовали праймеры GTTTCTCTAGGGGTGCTTCCATCT и AGCG-GTTTCCTCGTCGTTATTGT. Для ОТ-ПЦР мРНК гена, кодирующего α -тубулин табака использовали праймеры tubAF CAAGGTG-CAAAGGGCTGTATGTATGA и tubAR GCAC-CAACTTCCTCGTAATCSTTTTC.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Целевой генно-инженерной конструкцией гена *BnaX.ANT.b* в векторе рCambia 2201 были проведены две агробактериальные трансформации листовых дисков табака и на селективной среде отобрано 90 первичных трансформантов. Из них укоренились на среде МС с канамицином 12 растений, из которых лишь три показали активность репортерного гена *GUS* в листьях. Эти три растения были акклиматизированы к условиям почвы, доведены до цветения с целью получения семян. Таким образом, были получены три линии трансгенных растений с номерами 11, 21 и 23. Из этих отобранных растений табака была выделена геномная ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие гена *BnaX.ANT.b* и 35S промотора. Было показано, что все три растения содержат в своем геноме как целевой ген, так и 35S промотор.

Морфологические параметры контрольной группы, содержащей Т-ДНК бинарного вектора pCambia 2301 и трансгенных растений табака поколения T₁, экспрессирующих ген *BnaX.ANT.b* рапса

Параметр	Линия контрольных растений pCambia 2301	Линии трансгенных растений табака, экспрессирующих ген <i>BnaX.ANT.b</i>		
		2201/BnANT № 21	2201/BnANT № 23	2301/BnANT № 67
<i>Длина листьев, см</i>				
через 30 дней	3.9 ± 0.3	4.8 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.0 ± 0.1
через 45 дней	9.1 ± 0.8	9.9 ± 0.2	9.4 ± 0.2	9.1 ± 0.4
В период цветения	15.7 ± 0.7	18.2 ± 0.5	17.9 ± 0.5	19.6 ± 0.3
<i>Средняя площадь трех нижних листьев, см²</i>	137 ± 10	143 ± 5	143 ± 10	151 ± 4
<i>Площадь клеток эпидермиса листьев, мкм²</i>	18271 ± 624	17029 ± 620	14609 ± 515	19564 ± 135
<i>Высота стебля, см</i>	82.5 ± 1.9	103.3 ± 4.5	98.0 ± 6.2	110.7 ± 4.3
<i>Длина цветка, см</i>	4.46 ± 0.02	4.74 ± 0.05	4.75 ± 0.04	4.85 ± 0.09
<i>Длина корней через 20 дней после посева на среду МС, см</i>	1.10 ± 0.06	1.20 ± 0.11	1.03 ± 0.09	1.70 ± 0.12
<i>Длина гипокотилей через 20 дней после посева на среду МС, мм</i>	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.6 ± 0.1	2.8 ± 0.2
<i>Масса 30-ти семян, г</i>	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2	2.3 ± 0.4

В ходе агробактериальной трансформации табака конструкцией гена *BnaX.ANT.b* в векторе pCambia 2301 на селективной среде было отобрано 67 первичных побегов. Из них 6 трансформантов укоренилось на среде с канамицином, при этом лишь последнее во всей группе растение под номером 67 показало высокую активность репортерного гена *GUS*. Данное растение было доведено до цветения, а семена были отобраны для дальнейшей работы.

Семена трех линий трансгенных растений 2201/BnANT второго поколения были высеваны на селективную среду, где только растения линий № 21 и 23 показали классическое соотношение выживших и погибших 3 : 1, что косвенно предполагает наличие единичной копии встроенного трансгена. Семена трансгенных растений pCambia 2301/BnANT № 67 на селективной среде МС также показали расщепление 3 : 1. По длине корня и гипокотила между опытными и контрольными растениями разница была обнаружена лишь для линии № 67, причем было отмечено их удлинение на 55 и 56% соответственно (таблица). Далее по 5 растений трех отобранных линий № 21, 23 и 67 были акклиматизированы к условиям почвы для проведения дальнейших экспериментов по их морфологической характеристике. В качестве контроля использовали линию трансгенных

растений, содержащих Т-ДНК бинарного вектора pCambia 2301 без целевого гена. Через 30 и 45 дней после акклиматизации опытные и контрольные растения практически не отличались по длине листьев (табл.). В то же время в период цветения листья у опытных растений были длиннее, чем у контрольных на 14–25% (таблица), что может говорить о пролонгировании времени роста листьев под влиянием эктопической экспрессии гена *BnaX.ANT.b*. По площади листьев лишь трансгенные растения 2301/BnANT №67 характеризовались небольшим их увеличением (таблица). По высоте стебля опытные растения были выше контрольных, и разница составляла у линии № 23 – 19%, у линии № 21 – 25%, а у линии № 67 – 28%. По длине цветка различия между опытными и контрольными растениями были небольшими и в целом составили от 6% у линии № 21 до 9% у линии № 67 (таблица). По форме листьев, стебля и цветков опытные и контрольные растения не различались. Большинство растений были фертильными, пропорции между размерами чашелистиков, лепестков, тычинок и плодолистиков по сравнению с контролем оставались в пределах нормы. Было показано влияние эктопической экспрессии гена *BnaX.ANT.b* на массу семян (таблица), причем наибольшая разница была характерна для линии 2301/BnANT № 67. Для выяс-

нения возможных причин увеличения размеров листьев, нами были проведены микроскопические исследования клеток эпидермиса листьев. Размеры органов трансгенных растений могли увеличиваться как за счет возрастания размеров отдельных клеток, так и за счет увеличения количества клеток. Оказалось, что размеры клеток эпидермиса листьев у опытных растений не только не увеличивались, но у линий № 21 и 23 даже немного уменьшились (таблица). Это означает, что длина листьев опытных растений, вероятнее всего, увеличивалась за счет стимулирования клеточного деления, а не процессов клеточного роста.

Методом полуколичественной ОТ-ПЦР было проведено исследование экспрессии гена *BnaX.ANT.b* в трех линиях трансгенных растений. Было показано, что уровень экспрессии трансгена наиболее высок у растений линии № 67 (рис. 1б), которые содержат в качестве регулятора транскрипции целевого гена промотор вируса мозаики георгина. Таким образом, повышение уровня экспрессии гена *BnaX.ANT.b* отразилось в трансгенных растениях в виде увеличения размеров листьев, стебля и цветков.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ген *ANT* кодирует один из важнейших транскрипционных факторов, принимающих участие в росте и развитии, обнаруживается у всех исследуемых высших растений и является одним из претендентов на использование в качестве универсального гена для создания хозяйственно важных трансгенных растений с увеличенными размерами органов (Mizukami, Fischer, 2000). Однако влияние повышенного и пониженного уровня экспрессии этого гена на размеры органов было достаточно хорошо исследовано лишь на модельном объекте *A. thaliana*, а изучение данного гена у каждого растения требует много времени и может представлять определенные трудности. В связи с этим вызывает интерес исследование эктопической экспрессии ортологов гена *ANT*, нуклеотидные последовательности которых известны, в гетерологических условиях. В данной работе для создания трансгенных растений нами были использованы модельные растения табака и ген *BnaX.ANT.b* рапса, который до этого не использовался для трансформации растений. Предполагалось, что если целевой ген *BnaX.ANT.b* будет эффективно работать в табаке, то он вполне может быть использован для создания других хозяйственно важных растений с увеличенными размерами органов. Эктопическая экспрессия гена *BnaX.ANT.b* способствовала увеличению разме-

ров ряда органов табака (таблица), причем в отличие от *A. thaliana* (Mizukami, Fischer, 2000), большинство полученных растений были фертильными. Как и в случае с *A. thaliana* (Mizukami, Fischer, 2000), нами получены данные, свидетельствующие о влиянии продукта гена *ANT* на клеточное деление, что, видимо, способствует пролонгированию времени роста листьев. В отличие от *A. thaliana*, где сверхэкспрессия гена *ANT* наиболее сильно влияла на размеры органов цветка (Krizek, 1999), в случае с табаком разница в величине цветков составила лишь 6–9%. При этом наибольшие изменения нами были зафиксированы при измерении высоты стебля и массы семян (таблица). Поэтому, предполагается, что исследованный нами ген может быть применен на практике, прежде всего с целью увеличения размеров данных органов. Степень изменения величины органов был больше в случае использования вместо 35S промотора его гомолога, выделенного нами ранее из вируса мозаики георгина (Кулуев и др., 2010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кулуев Б.Р., Князев А.В., Лебедев Я.П. и др. Конструирование гибридных промоторов каулимовирусов и анализ их активности в трансгенных растениях // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 4. С. 623–632.
- Кулуев Б.Р., Князев А.В., Ильасова А.А. и др. Конститутивная экспрессия гена *ARGOS* в растениях табака под контролем промотора вируса мозаики георгина // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 3. С. 443–452.
- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 4692–4693.
- Chen B., Wang T., Wang H. et al. Cloning and expression level analysis of two *BnaANT* candidate genes in *Brassica napus* // Agric. Sci. China. 2010. V. 9. P. 488–496.
- Hu Y., Xie Q., Chua N. The *Arabidopsis* auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1951–1961.
- Kim S., Soltis P.S., Wall K. et al. Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family // Mol. Biol. Evol. 2006. V. 23. P. 107–120.
- Krizek B.A. Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs // Dev. Genet. 1999. V. 25. P. 224–236.
- Mitsuhara I., Ugaki M., Hirochika H. et al. Efficient promoter cassettes for enhancer expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants // Plant Cell Physiol. 1996. V. 37. P. 49–59.
- Mizukami Y., Fisher R.L. Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 942–947.

Morphological Features of Transgenic Tobacco Plants Expressing the *AINTEGUMENTA* Gene of Rape under Control of the Dahlia Mosaic Virus Promoter

B. R. Kuluev, A. V. Knyazev, A. V. Chemeris, and V. A. Vakhitov

*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
ul. Prospekt Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia
e-mail: kuluev@bk.ru*

Abstract—Transgenic tobacco plants expressing the *AINTEGUMENTA* gene of rape under control of the 35S promoter and the promoter of dahlia mosaic virus were obtained. The transgenic plants were characterized by increase in the length of the leaves, flower sizes, stem height, and weight of seeds; at the same time, the degree of increase was greater in the case of use of the dahlia mosaic virus promoter as a regulator of transcription. Ectopic expression of the *AINTEGUMENTA* gene promoted prolongation of leaf growth, while sizes of epidermal cells of the leaves remained unchanged.

Keywords: organ sizes, *AINTEGUMENTA*, transgenic plants, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*.

УДК 593.714.1

ЭСТАФЕТНЫЙ СПОСОБ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ ГИДРОПЛАЗМЫ В КОЛОНИЯХ ГИДРОИДНЫХ ПОЛИПОВ

© 2013 г. Ю. Б. Бурыкин

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

119992 Москва, ГСП-2, Ленинские горы

E-mail: burykin.ub@gmail.com

Поступила в редакцию 18.05.12 г.

Окончательный вариант получен 20.09.12 г.

В настоящей работе автором продолжено исследование распределительной системы колониальных гидроидов в процессе ее развития, начиная с ее возникновения в период метаморфоза планулы и кончая сформировавшейся колонией. Изучена схема гидроплазматических течений (ГПТ) у двух видов колониальных гидроидов – *Perigonimus abyssi* G.O. Sars, 1874 и *Stauridia producta* Wright, 1858. Выяснено, что основной способ перемещения гидроплазмы в этих колониях, не имеющих побегов, – эстафетный: от одного гидранта к другому через соединяющий их участок столона или через гидрант к следующему и т.д. Показано, что эффективность проводящей (распределительной) системы не зависит от уровня сложности колониального строения. Полученные данные подтверждают отсутствие общеколониальных процессов интеграции и саморегуляции у гидроидных полипов.

Ключевые слова: колониальные гидроиды, распределительная система, гидроплазматические течения, общеколониальные процессы.

DOI: 10.7868/S047514501302002X

Вслед за Беклемишевым (1964) принято считать, что повышение уровня колониальной организации у беспозвоночных животных зависит, прежде всего, от степени физиологической интеграции колонии (Марфенин, 1993). Поскольку у большинства колониальных организмов единая нервная система отсутствует (в т.ч. в колониях гидроидов), а формирование большинства общеколониальных аппаратов слабо выражено, их физиологическое единство обеспечивается главным образом функцией распределения (Беклемишев, 1964).

У колониальных гидроидов распределительная система базируется на перемещениях гидроплазмы в гастроваскулярной полости с переносом пищевых частиц и дедифференцированных клеток рассасывающихся тканей по всей колонии. На гидроиде *Gonothyraea loveni* (Allm., 1859) было показано, что гидроплазматические течения в колонии никак не синхронизированы, а их совокупность представлена огромным разнообразием сменяющих друг друга вариантов, что указывает на отсутствие каких-либо регуляторных механизмов в работе распределительной системы и свидетельствует, очевидно, об отсутствии физиологической интеграции колонии (Бурыкин, 2008, 2010). Установленный при этом гидравлический принцип, определяющий постепенное перераспределение

объемов гидроплазмы (Бурыкин, 2010), позволяет, вместе с тем, оценивать с помощью ряда критериев эффективность проводящей системы в колониях с разным строением. В данной работе изучена система течений гидроплазмы у гидроидных полипов, имеющих наиболее просто устроенные колонии, и сделана сравнительная оценка эффективности проводящей (распределительной) системы у разных видов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования выполнены на Беломорской биостанции им. Н.А. Перцова (МГУ им. М.В. Ломоносова) на двух видах колониальных гидроидов, состоящих из растущих по субстрату столонов и сидящих на них полипов (гидрантов).

Perigonimus abyssi G.O. Sars, 1874¹ впервые для Белого моря идентифицирован Маргулис (1982) в материале проб, взятых из верхней сублиторали в проливе Великая Салма вблизи островов Еремеевских. В дальнейшем, этот вид был обнаружен на Еремеевском пороге, на бурых водорослях в зоне нижней литорали (Марфенин, Карлсен, 1983). Там же, на *Ascophyllum nodosum*, был взят материал для

¹ Названия видов даны по Наумову (1960).

настоящих исследований. Мелкие полипы без выраженной ножки, высотой 0.4–0.5 мм, имели 8 нитевидных щупалец (у молодых 2–4) и морщинистую “псевдогидротекту” (термин Наумова, 1960), закрывавшую большую часть их тела. После рассасывания полипов их пустые “псевдогидротекты” легко отваливаются от столона, а новые гидранты образуются всегда в новых местах, причем не только на концах растущих столонов, но и в междоузлиях между полипами на произвольном удалении от каждого из них. Расстояние между гидрантами на столоне колебалось от 0.4 до 7.8 мм при средних значениях 2.3 ± 0.3 мм ($n = 135$).

Полипы *Stauridia producta* Wright, 1858 долгое время были известны для Белого моря лишь по двум находкам (Mereschkowsky, 1879 — цит. по: Перцова, 1979; Шидловский, 1902). В 1973 году они снова были найдены Бурыкиным в пробах, взятых из верхней сублиторали пролива Великая Салма (Перцова, 1979). В последние годы полипы этого вида неоднократно находили в районе уже упомянутого Еремеевского порога в зоне нижней литорали. Здесь же взяты и колонии, использованные в настоящем исследовании, на тех же талломах *A. nodosum*, что и предыдущий вид. Полипы красноватого цвета, высотой 2–2.5 мм, имеют в расправленном состоянии цилиндрическое тело, переходящее в покрытую перисарком ножку. По телу разбросаны короткие головчатые щупальца, под которыми расположен базальный венчик из 4 нитевидных щупалец. Новые гидранты образуются на концах растущих столонов и ножек рассосавшихся полипов, реже в междоузлиях столонов. Верхушка столона непосредственно дифференцируется в зачаток полипа, в основании которого через несколько часов образуется новая верхушка. Расстояние между гидрантами 2.8 ± 0.1 мм (1.2–5.0 мм, $n = 92$).

Материал содержали в проточном аквариуме при 11.8–16.6°C; опыты проводили при температуре около 20°C с кормлением свежевывлупившимися науплиусами *Artemia salina*. Колонии для опытов выращивали на предметных стеклах из прикрепленных к ним ниткой фрагментов колоний, снятых с талломов *A. nodosum*. Эти фрагменты вместе с нитками удаляли после образования на стеклах растущих столонов с несколькими гидрантами (Бурыкин и др., 1984). В опытах использованы однолучевые колонии с (4)5 гидрантами на столоне. Регистрацию гидроплазматических течений (ГПТ) осуществляли под микроскопом ЛОМО МИКМЕД-1 (окуляр 10x, объектив 8x): пластиковую чашку Петри (с колонией на предметном стекле в морской воде) закрепляли на препаратодателе подвижного столика и перемещали ее во время наблюдений ГПТ в двух взаимоперпендикулярных направлениях двумя винтами под столиком. Направление и протяженность ГПТ отме-

чали на схемах колоний, а их продолжительность фиксировали по секундомеру электронных часов. Через 1.5 часа после кормления и позже отмечали плотность окраски тканей различных областей колонии, которая указывала на степень захвата пищевых частиц гастродермой. Скорость ГПТ измеряли в середине колонии (второе или третье междоузлие столона), на участке длиной 1.3–1.4 мм. Время прохождения контрольного участка частицами средних размеров регистрировали с помощью ручного секундомера, проводя подряд по нескольку измерений для каждого очередного течения. Вычисленную затем максимальную скорость каждого ГПТ условно принимали за скорость данного потока гидроплазмы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

***Perigonimus abyssi* G.O. Sars, 1874.** В первые 1.5–2 часа после кормления, когда гастродерма ценосарка захватывает наибольшее количество пищевых частиц (Бурыкин, 1998), сквозные течения гидроплазмы в колониях этого гидроида практически отсутствуют. Поэтому для выявления общей направленности в перераспределении ее объемов необходимо рассмотреть всю совокупность локальных течений, выходящих из разных гидрантов и конца столона. Как и в случае с *G. loveni* (Бурыкин, 2010), проглотившие добычу полипы преимущественно выталкивают гидроплазму в полость ценосарка, а остальные гидранты и конец столона преимущественно ее принимают (рис. 1).

После кормления *проксимального* полипа гидранты принимают гидроплазму, идущую в основном от проксимального конца колонии, а выталкивают ее преимущественно в дистальном направлении. Редкие сквозные течения также имеют, как правило, дистальную направленность (рис. 1а). Поскольку средняя скорость идущих по столону течений в обоих направлениях одинакова (рис. 3), избыточный объем гидроплазмы, насыщенный пищевыми частицами, постепенно перемещается от проксимального конца колонии к дистальному (рис. 1а). При этом более половины всех ГПТ в колониях не распространяются за пределы одного междоузлия столона, а еще 29% охватывают лишь два междоузлия (рис. 6а). Следовательно, гидроплазма с пищей перемещается эстафетно: из проксимального гидранта в соседний, из него, частично возвращаясь обратно, — в следующий за ним и/или через него в еще более дистальный гидрант и т.д. Временами, этот эстафетный способ перемещения гидроплазмы в колонии можно наблюдать в пределах одного цикла (рис. 2а). В связи с мелкими размерами гидрантов проксимальному полипу, перегруженному пищей, затруднительно вытолкнуть гидроплазму далее ближайшего гидранта, которо-

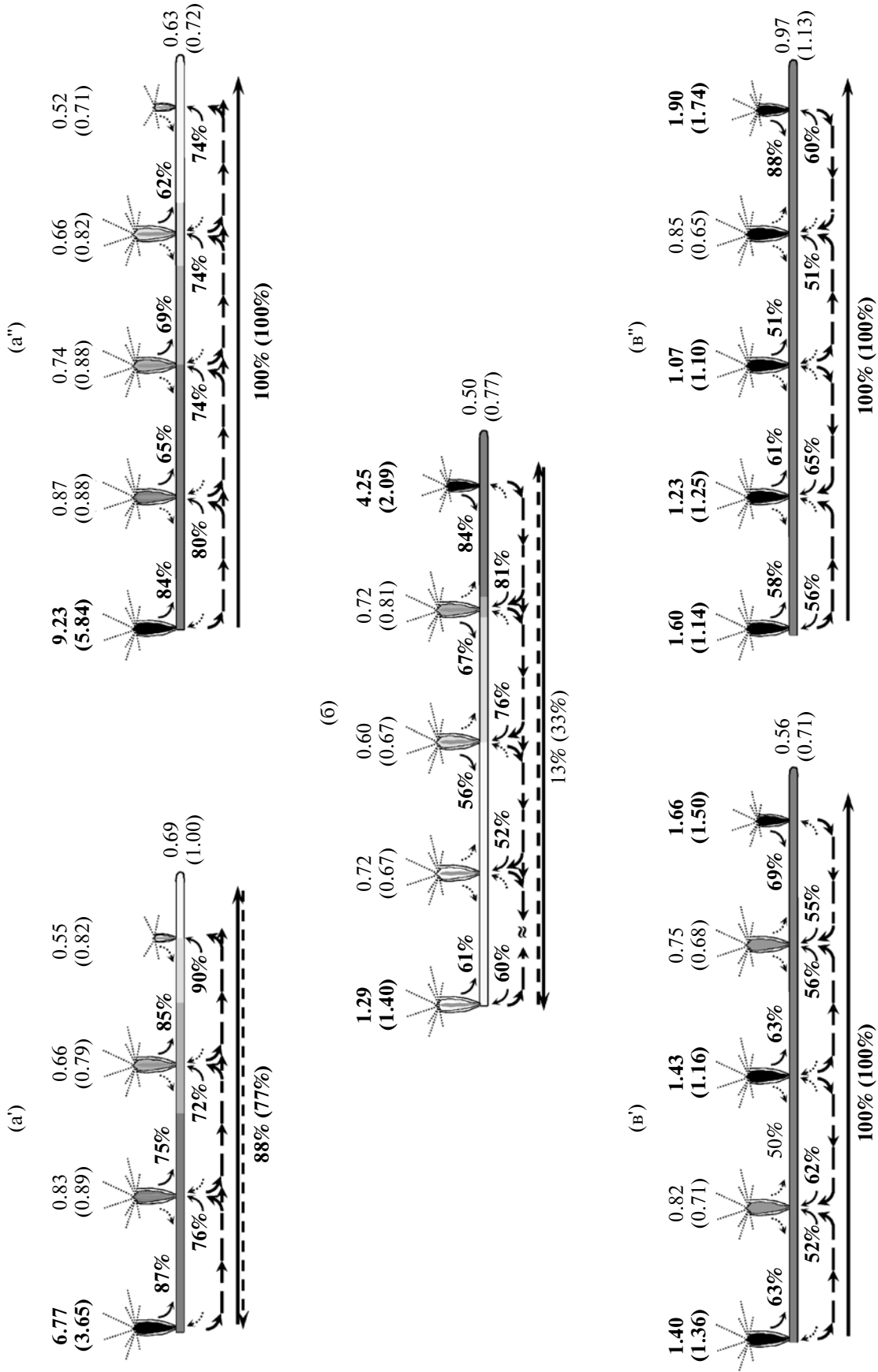


Рис. 1. Соотношение продолжительности (числа) гидроплазматических течений (ГПП) в однолучевых колониях *P. abuxssi* через 0.5–1.5 часа после кормления: над гидрантами и возле верхушки столона – соотношение продолжительности (числа) выходящих/входящих ГПП, значения выше 1 выделены жирным; над столон – соотношение продолжительности ГПП, выходящих в столон из соседних гидрантов навстречу друг другу (в % для преобладающих ГПП возле жирной стрелки); под столон – соотношение продолжительности ГПП, входящих в соседние гидранты (то же); длинным пунктиром со стрелками показано результирующее перемещение объемов гидроплазмы в колонии; внизу – соотношение продолжительности (числа) *сквозных* ГПП с указанием доли дистальных течений (преобладающие течения показаны сплошной линией); гидранты, получившие пищу (1/2 науплиуса *A. salina*) – зачернены, для остальных колонии показана плотность окраски тканей через 1.5–2 часа после кормления.

а – Проксимальное кормление ($N = 5$, а' – дистальное кормление ($N = 5$); б – дистальное кормление ($N = 3$, в'; $N = 2$).

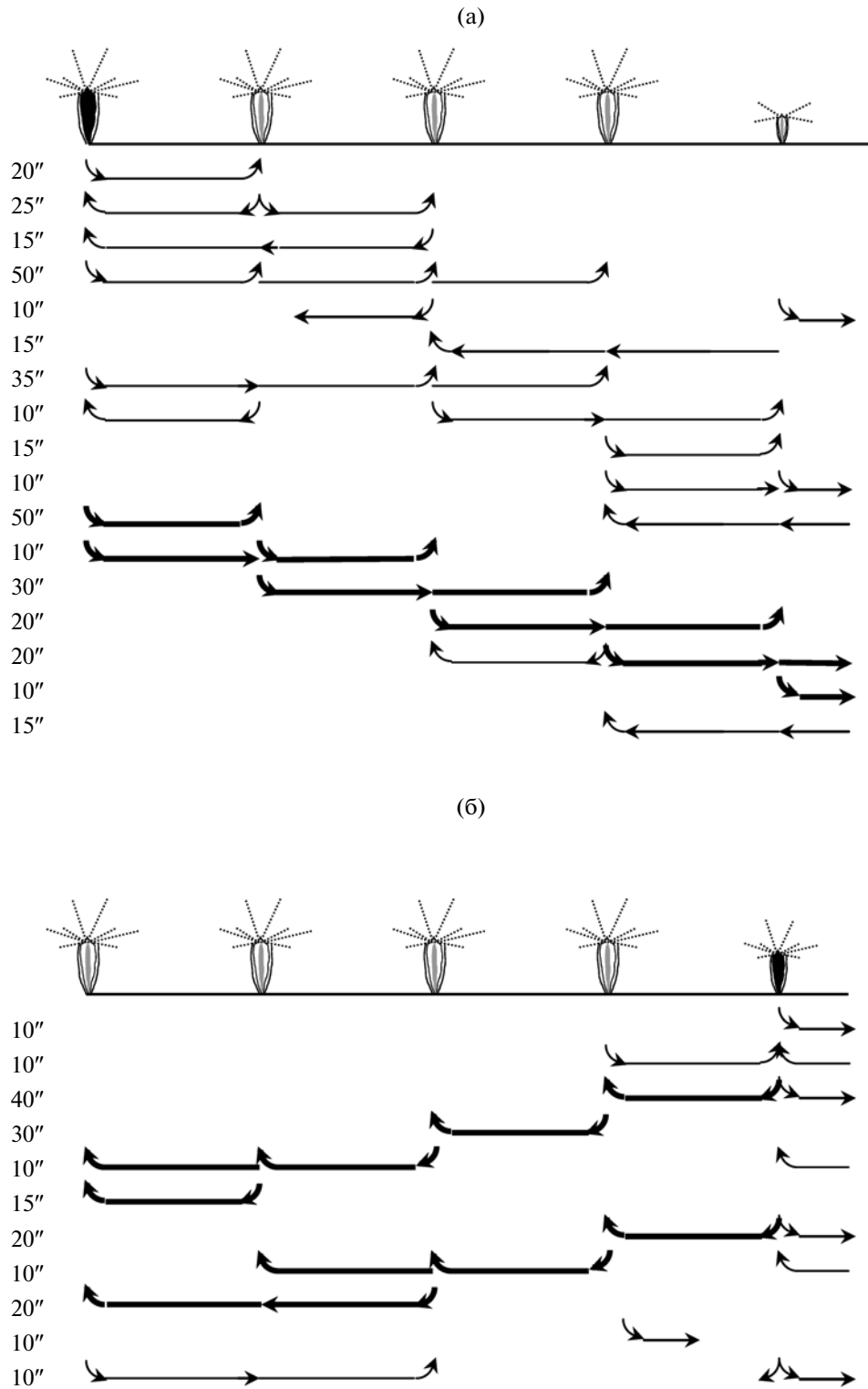


Рис. 2. Эстафетный способ перемещения гидроплазмы в колониях *P. abyssii* после кормления проксимального (а) и дистального (б) гидрантов (фрагменты регистрации ГПТ в опыте): слева – продолжительность течений, с.

му, в свою очередь, легче протолкнуть ее в направлении дистальной части колонии, где давление ниже, нежели обратно, в зону высокого давления и

т.д. Эффективность такого способа перемещения гидроплазмы вдоль колонии при почти отсутствующих сквозных течениях, очевидно, довольно

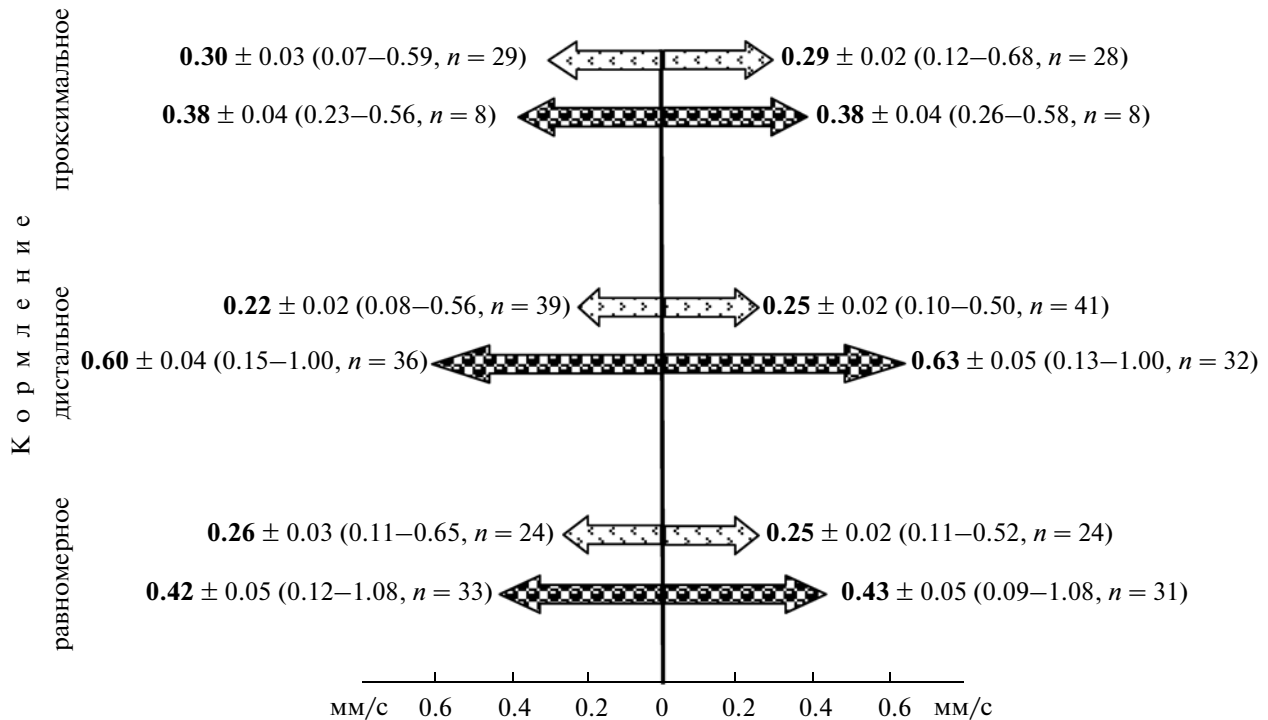


Рис. 3. Средняя скорость проксимальных (слева) и дистальных (справа) течений гидроплазмы в колониях с различным способом кормления через 0.5–1.5 часа после кормления:

← — *P. abyssi*, → — *S. producta*.

низкая: через 1.5–2 часа после кормления ткани в дистальной части колонии остаются почти прозрачными, в то время как наибольшая плотность их окраски, связанная с активным захватом пищевых частиц гастродермой, регистрируется в ее проксимальной половине (рис. 1а).

После кормления *дистального* полипа наблюдается, по существу, обратная картина. Отличие заключается лишь в том, что еще более мелкий, по сравнению с остальными, дистальный гидрант с проглоченной добычей еще слабее выталкивает гидроплазму с пищей, чем проксимальный в предыдущем случае; а в проксимальном полипе выходящие из него течения преобладают, в среднем, над входящими, противодействуя тем самым встречным проксимальным потокам. В результате, при почти одинаковой средней скорости ГПТ в обоих направлениях (рис. 3) результирующее перемещение избыточного объема гидроплазмы с пищевыми частицами охватывает, в основном, лишь дистальную половину колонии, слабо проникая в проксимальную, ткани которой через 1.5–2 часа после кормления остаются почти прозрачными, т.к. почти вся пища за это время уже захвачена гастродермой дистальной половины

(рис. 1б). Как и в предыдущем случае, время от времени можно наблюдать эстафетное перемещение гидроплазмы в пределах одного цикла (рис. 2б).

После *равномерного* кормления избыточная гидроплазма, насыщенная пищевыми частицами, постепенно перемещается, заполняя стolon, из проглотивших добычу полипов в непитававшиеся гидранты (рис. 1в'). В случае, когда все гидранты получают пищу, перераспределение объемов гидроплазмы в колонии выражено слабо, что находит отражение в незначительной разнице суммарной продолжительности противоположно направленных локальных течений (рис. 1в''). Ну а редкие сквозные течения в обоих случаях имеют, тем не менее, дистальную направленность, т.к. при периодических расслаблениях зоны пульсаций на конце stolona проникновение сюда сквозных ГПТ все-таки более вероятно, чем в забитый пищей желудок проксимального гидранта. Плотность окраски тканей при этом у всех колоний равномерно высокая.

***Stauridia producta* Wright, 1858.** Схема перераспределения объемов гидроплазмы в колониях этого гидроида принципиально та же, что и у

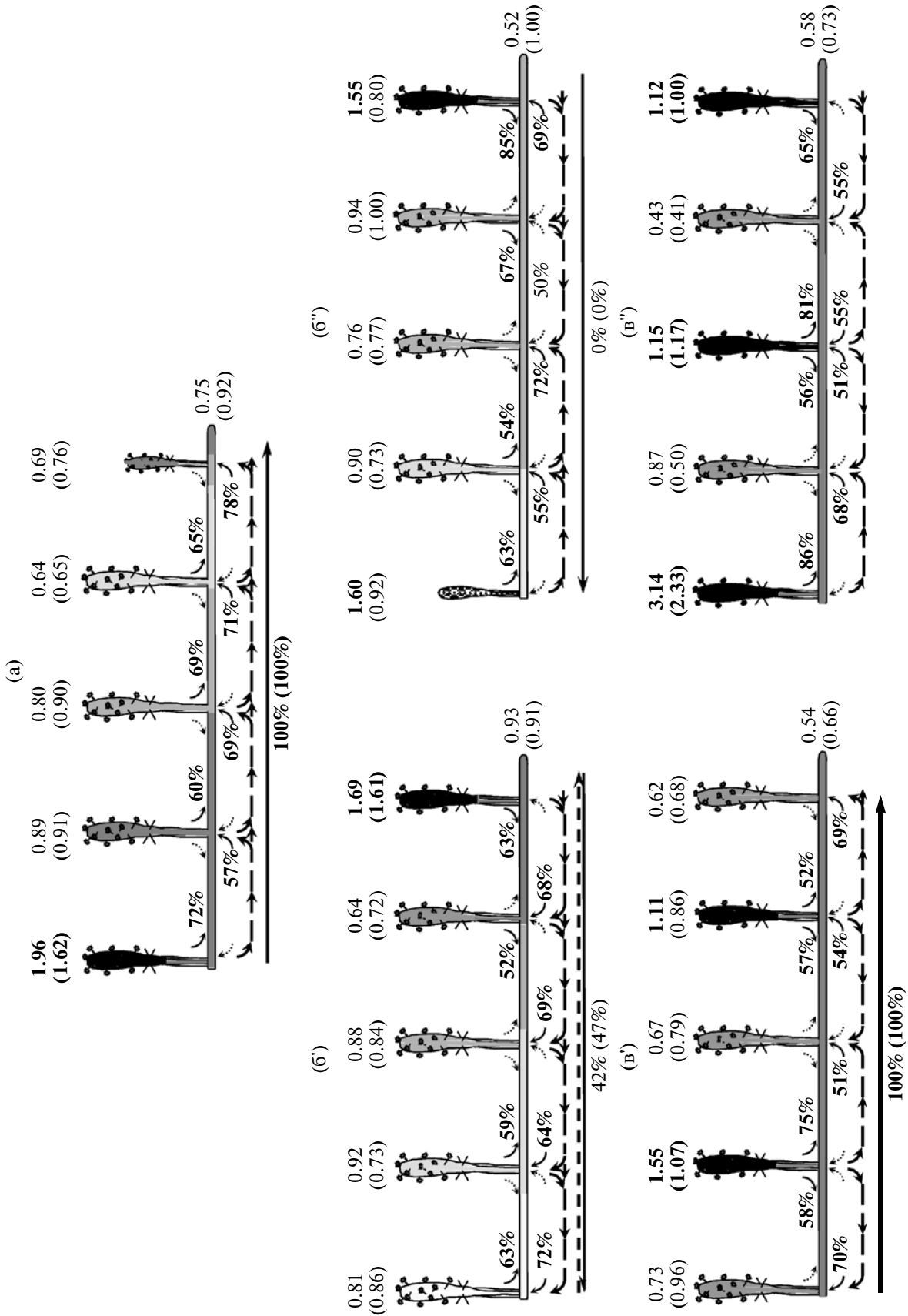


Рис. 4. Соотношение продолжительности (числа) ГПТ в однолучевых колониях *S. prodigiosa* через 0.5–1.5 часа после кормления: а – проксимальное кормление (N = 3); б' – дистальное кормление (N = 4); б'' – равномерное кормление (N = 4, v'; N = 1); обозначения см. рис. 1.

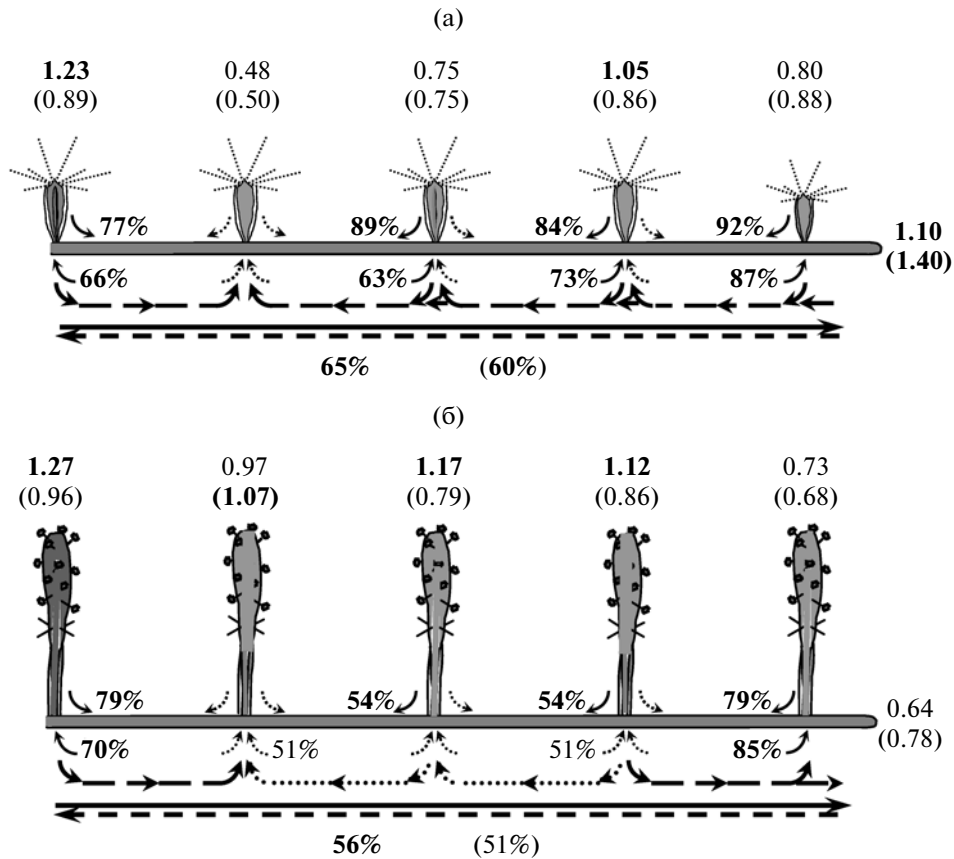


Рис. 5. Соотношение продолжительности (числа) ГПТ в однолучевых колониях через 2–3.5 часа после проксимального кормления:

а – *P. abyssi* ($N = 1$); б – *S. producta* ($N = 3$); обозначения – см. рис. 1.

предыдущего вида (рис. 4). Отличия же связаны с более крупными размерами гидрантов, которые в 4–5 раз превышают по высоте гидрантов *P. abyssi* и, вследствие этого, во время своих сжатий с большей силой выталкивают гидроплазму в столон: средняя скорость ГПТ, примерно одинаковая у потоков противоположной направленности, в целом существенно выше, чем в колониях предыдущего гидроида (рис. 3); доля более протяженных и сквозных течений тоже выше (рис. 6), хотя эстафетный способ перемещения гидроплазмы все так же является основным, однако менее выраженным (рис. 4а, 4б'). При том же строении колонии эффективность проводящей системы явно более высокая: через 1.5–2 часа после проксимального кормления окраска тканей конца столона и молодого дистального гидранта имеет такую же плотность, как и в проксимальной части колонии (рис. 4а), что свидетельствует об активном транспорте в эту зону пищевых частиц, а после дистального кормления зона потемневшей гастродермы с захваченными частицами пищи, в отличие от предыдущего вида (рис. 1б), охватывала значительно большую часть колонии (рис. 4б'). Если при

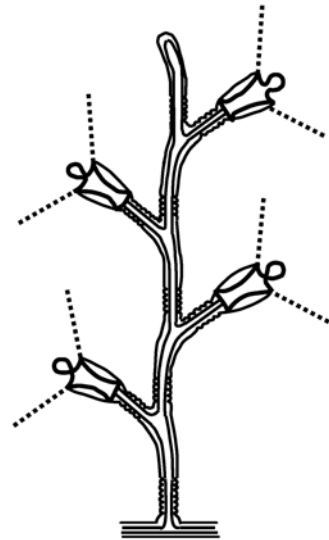
этом рассасывался проксимальный полип, его клеточный материал, поступая в гидроплазму, создавал в проксимальной зоне колонии также ее избыточный объем; в результате, под действием повышенного давления на обоих концах колонии избыточная гидроплазма, обогатившаяся пищей или дедифференцированными клетками (т.н. “вторичная пища”), перемещалась в ее срединную часть (рис. 4б').

Через 2–3.5 часа после кормления параметры, характеризующие соотношение противоположно направленных ГПТ в гидрантах и столоне, в значительной мере выравниваются, доля протяженных и сквозных течений (сохраняющих преимущественно дистальную направленность) и их средняя скорость существенно увеличиваются, сквозные ГПТ становятся более ритмичными, а плотность окраски тканей становится почти одинаковой по всей колонии при любом способе кормления (рис. 5, 6, таблица). Т.е. эффективность проводящей системы в это время резко возрастает у обоих гидроидов. Ранее выяснено (Бурыкин, 2010), что в условиях периодического кормления колониальных гидроидов протяженные ГПТ в них до начала

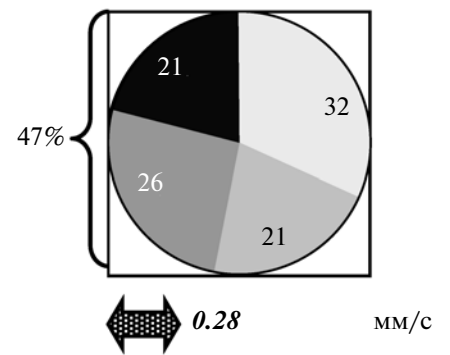
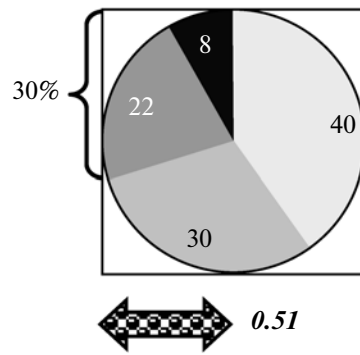
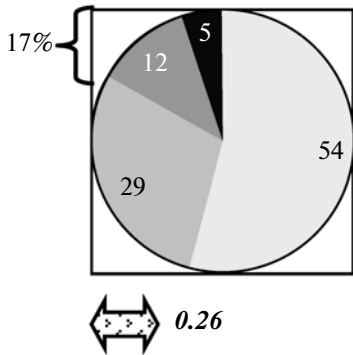
Perigonimus abyss

Stauridia producta

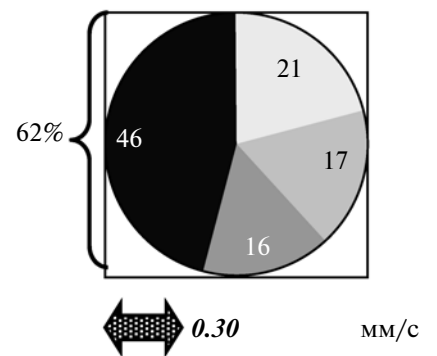
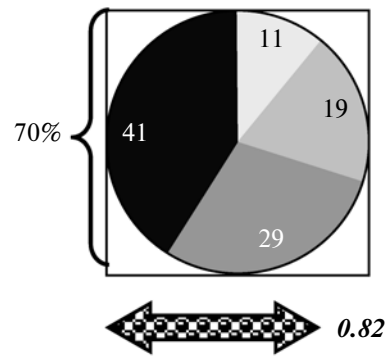
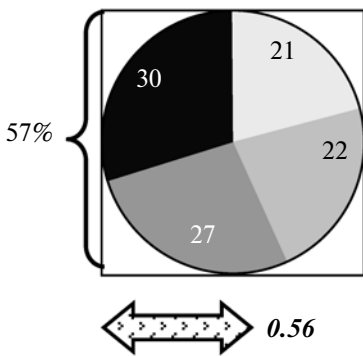
Gonothyrea loveni



(а) через 0.5–1.5 часа после кормления



(б) через 2–3.5 часа после кормления



ГПТ: сквозные протяженные средние короткие

Период сквозных ГПТ в однолучевых колониях с 5 гидрантами (побегами)

а) в течение двух часов после кормления

	Число колоний со сквозными ГПТ	Средние значения, мин	Лимиты (min–max), мин	n – число измерений	CV – коэффициент вариации
<i>Perigonimus abyssii</i>	10 из 21	29.3	2–92	19	101%
<i>Stauridia producta</i>	4 из 10	10.9	3–45	15	94%
<i>Gonothyrea loveni</i> *	18 из 19	17.6	5–98	55	95%

б) через два–три часа после кормления

	Число колоний со сквозными ГПТ	Средние значения, мин	Лимиты (min–max), мин	n – число измерений	CV – коэффициент вариации
<i>Perigonimus abyssii</i>	4 из 4	10.7	3–27	11	65%
<i>Stauridia producta</i>	4 из 4	3.4	1–11	33	66%
<i>Gonothyrea loveni</i> *	8 из 8	10.1	5–19	70	33%

* По: Бурькин, 2010, дополнительно полученные данные.

кормления, как правило, отсутствуют. Поэтому “прокачка” стоячего столба гидроплазмы в колониях, обусловленная активизацией сжатий пульсаторов, все более удаленных от мест поступления в колонию пищи, что сопровождается увеличением протяженности и скорости ГПТ, происходит постепенно. В результате, столб гидроплазмы в колонии “раскачивается” (Бурькин, 2010), а течения становятся более быстрыми и протяженными (рис. 6).

Поскольку, однако, большинство пищевых частиц к этому времени уже захвачено гастродермой полипов и ценосарка, то при небольшом количестве пищи преимущество в питании получают те участки колонии, которые находятся вблизи мест поступления в нее пищи и вблизи верхушек роста, где молодая гастродерма обладает наибольшей способностью к захвату пищевых частиц (Hale,

1964; Braverman, 1971, 1974; Бурькин, 1998). Поэтому наибольший интерес представляет собой оценка эффективности колониального распределительного аппарата как проводящей системы именно в первые 1.5–2 часа после кормления. Полученные данные показывают отсутствие корреляций между протяженностью и скоростью ГПТ у разных видов гидроидов и отсутствие зависимости этих параметров от степени архитектурной сложности колоний: наибольшая средняя протяженность течений гидроплазмы наблюдалась в колониях *G. loveni*, имеющих побеги, а наибольшая их скорость – в колониях *S. producta* с наиболее крупными среди этих видов гидрантами, сидящими на столоне (рис. 6).




Ранее на гидроиде *G. loveni* установлено, что течения гидроплазмы в колонии никак не синхронизированы, а их совокупность представлена огром-

Рис. 6. Доля различных по протяженности ГПТ и их средняя скорость в однолучевых колониях с (4)5 гидрантами (побегами) на столоне:

протяженные (более 2 междоузлий столона), средние (2 междоузлия столона), короткие (в пределах 1 междоузлия столона):

а – *P. abyssii*: $N = 20$, число всех ГПТ: $n = 1237$, их суммарная продолжительность $T = 417$ мин; *S. producta*: $N = 11$, $n = 558$, $T = 162$ мин; *G. loveni*: $N = 16$, $n = 659$, $T = 768$ мин; б – *P. abyssii*: $N = 5$, $n = 147$, $T = 56$ мин; *S. producta*: $N = 4$, $n = 121$, $T = 41$ мин; *G. loveni*: $N = 8$, $n = 455$, $T = 282$ мин;

средняя скорость ГПТ обоих направлений:

 – *P. abyssii*;  – *S. producta*;  – *G. loveni* (по: Бурькин, 2010, дополнительные данные)

а – *P. abyssii*: 0.26 ± 0.01 (0.07–0.68) мм/с, $n = 185$; *S. producta*: 0.51 ± 0.02 (0.09–1.08) мм/с, $n = 148$; *G. loveni*: 0.28 ± 0.01 (0.08–1.00) мм/с, $n = 260$; б – *P. abyssii*: 0.56 ± 0.02 (0.22–1.00) мм/с, $n = 70$; *S. producta*: 0.82 ± 0.03 (0.47–1.15) мм/с, $n = 52$; *G. loveni*: 0.30 ± 0.01 (0.07–0.70) мм/с, $n = 146$.

ным разнообразием неповторяющихся вариантов (Бурыкин, 2008, 2010). Это в полной мере относится и к колониям двух исследованных в данной работе видов. Период сквозных ГПТ у всех гидроидов колеблется в очень широких пределах и имеет крайне высокие значения коэффициента вариации (таблица). Все это указывает, очевидно, на отсутствие в работе распределительной системы каких-либо интеграционных процессов и регуляторных механизмов, что противоречит утверждениям Марфенина (1993, 1997, 2002, 2009 и др.) о наличии у гидроидов общеколонимальной интеграции и саморегуляции. Единственным физиологическим механизмом общеколонимальной интеграции автор считает “взаимоподстраивание независимых пульсаторов (гидрантов и верхушек роста)” (Марфенин, 2002). Однако, экспериментальные факты свидетельствуют о прямо противоположном (Hale, 1960; Бурыкин, 2006): независимые друг от друга сжатия многочисленных пульсаторов — движителей гидроплазмы в колониях — являются главным дезинтегрирующим фактором единственного общеколонимального аппарата гидроидных полипов.

Наличие очевидной кормидиальной интеграции у гидрозоев (сифонофоры, гидрокораллы) и возможность проявления локальных регуляций не обеспечивают, однако, существование этих явлений на общеколонимальном уровне. Видимо, гидравлический принцип функционирования распределительной системы — единственного колонимального аппарата у гидроидов — направляет у них развитие колонимальности, в противоположность мнению Беклемишева (1950, 1964), по нематазойному пути. При полном отсутствии в неинтегрированных колониях беспозвоночных животных регуляторных органов и регуляторных систем (Беклемишев, 1964) нематазойный (“растительный”) тип организации колонимального организма (разумеется, на основе животной природы протекающих в нем процессов) сочетается с метазойной организацией входящих в него интегрированных зооидов. В этом дуализме, очевидно, — суть колонимальной организации беспозвоночных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беклемишев В.Н. К проблеме индивидуальности в биологии. Колонии у двусторонне-симметричных животных // Успехи совр. биол. 1950. Т. 29. Вып. 1. С. 91–120.
- Беклемишев В.Н. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных. В 2 т. Т. 1. Проморфология. М.: Наука, 1964. 432 с.
- Бурыкин Ю.Б. О механизме накопления, перераспределения и использования пищи на рост в колониях гидроидных полипов // Мат-лы науч. конф., посвящ. 60-летию Беломорской биостанции им. Н.А. Перцова МГУ. М., 1998. С. 26–28.
- Бурыкин Ю.Б. О механизмах направленного перемещения гидроплазмы в колониях гидроидных полипов // Тр. Беломор. биостанции им. Н.А. Перцова МГУ. Т. 10. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2006. С. 19–43.
- Бурыкин Ю.Б. Формирование распределительной системы в процессе развития колоний гидроидных полипов // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 3. С. 212–221.
- Бурыкин Ю.Б. Основы функционирования распределительной системы колонимальных гидроидов // Онтогенез. 2010. Т. 41. № 4. С. 300–311.
- Бурыкин Ю.Б., Марфенин Н.Н., Карлсен А.Г. Опыт содержания морского колонимального гидроида *Dypatena pumila* (L.) в лабораторных условиях // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. 1984. № 1. С. 102–106.
- Маргулис Р.Я. Гидроиды, новые для фауны СССР и Белого моря // Зоол. журн. 1982. Т. 61. № 1. С. 133–135.
- Марфенин Н.Н. Феномен колонимальности. М.: МГУ, 1993. 239 с.
- Марфенин Н.Н. Механизмы регуляции роста колонии гидроидов // Мат-лы II науч. конф. Беломор. биостанции им. Н.А. Перцова МГУ. М., 1997. С. 44–45.
- Марфенин Н.Н. Децентрализованная саморегуляция целостности колонимальных организмов // Журн. общ. биологии. 2002. Т. 63. № 1. С. 26–39.
- Марфенин Н.Н. Принципы организации и функционирования сетевой структуры в пределах колонии гидроидов // Мат-лы Всеросс. научн. конф. “Науки о жизни и образование. Фундаментальные проблемы интеграции”, посв. памяти проф. М.В. Гусева. М.: МАКС Пресс, 2009. С. 317–321.
- Марфенин Н.Н., Карлсен А.Г. Состояние фауны гидроидов Еремеевского порога Белого моря ранней весной // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. 1983. № 2. С. 26–30.
- Наумов Д.В. Гидроиды и гидромедузы морских, солоноватоводных и пресноводных бассейнов СССР. М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1960. 626 с.
- Перцова Н.М. Некоторые данные по экологии гидроидных медуз в Белом море // Компл. исслед. природы океана. 1979. Вып. 6. С. 231–242.
- Шидловский А. Материалы по фауне гидроидов арктических морей. I. Гидроиды Белого моря у берегов Соловецких островов // Тр. общ. испыт. прир. Харьк. ун-та. 1902. Т. 36. Вып. 1. С. 3–268.
- Braverman M. Studies on hydroid differentiation. VI. Regulation of hydranth formation in *Podocoryne carnea* // J. Exp. Zool. 1971. V. 176. № 3. P. 361–382.
- Braverman M. The cellular basis for colony form in *Podocoryne carnea* // Amer. Zool. 1974. V. 14. № 2. P. 673–698.
- Hale L.J. Contractility and hydroplasmic movements in the hydroid *Clytia johnstoni* // Quart. J. Micr. Sci. 1960. V. 101. Pt. 3. P. 339–350.
- Hale L.J. Cell movements, cell division and growth in the hydroid *Clytia johnstoni* // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1964. V. 12. № 2. P. 517–538.

Relay-Ray Way of Hydroplasm Movement in Hydroid Colonies

Yu. B. Burykin

Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

e-mail: burykin.ub@gmail.com

Abstract—In this study, we continued the investigation of the distribution system of colonial hydroids in the course of its development, starting with its emergence during the planula metamorphosis and ending with the formed colony. The hydroplasmic stream system of two species of colonial hydroids—*Perigonimus abyssi* G.O. Sars, 1874, and *Stauridia producta* Wright, 1858—was studied. We found that the main principle by which hydroplasma moves in these colonies, which form no shoots, is the relay-race from one hydranth to another through a stolon fragment connecting them or directly from one hydranth to the next one, etc. We show that the efficiency of the conducting (distribution) system does not depend on the level of complexity of the colonial structure. The results of this study confirm the absence of general colonial processes of integration and self-regulation in hydroid polyps.

Keywords: colonial hydroids, distribution system, hydroplasmic flow, general colonial processes.

РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И УСТАНОВЛЕНИЕ СВЯЗЕЙ

УДК 591

РАЗВИТИЕ ХАБЕНУЛО-ИНТЕРПЕДУНКУЛЯРНОГО ТРАКТА У КРЫС

© 2013 г. А. А. Клепуков, И. Г. Макаренко

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: imakarenk@mail.ru

Поступила в редакцию 03.09.11 г.

Окончательный вариант получен 16.11.11 г.

Исследование развития хабенулоинтерпедункулярного тракта (ХИТ) проводили на фиксированном мозгу плодов крыс на 21 день эмбрионального развития и неонатальных животных с 0 по 9 день постнатального развития с помощью метода диффузии липофильного флуоресцентного карбоцианинового красителя Ди-Ай (1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат) по мембранам нейронов. Маркер наносили в ядра уздечки, интерпедункулярное ядро, а также на область ядер шва. Нейроны и волокна, содержащие Ди-Ай, выявляли на вибратомных срезах с помощью флуоресцентного и конфокального микроскопов. Было обнаружено, что реципрокные связи латерального ядра уздечки с ядрами шва формируются пренатально к Э21. Нейроны, иннервирующие ядра шва располагались в дорсо- и венрокаудальных отделах латерального ядра уздечки. Проекция медиального ядра уздечки на интерпедункулярное ядро обнаруживаются лишь постнатально с П2. Нейроны – источники данных проекций формируют внутри медиального ядра уздечки характерные скопления. Таким образом, настоящая работа впервые описывает гетерогенное формирование отдельных проекционных систем, входящих в состав ХИТ у крыс в процессе перинатального онтогенеза.

Ключевые слова: уздечка, средний мозг, ядра шва, интерпедункулярное ядро, хабенулоинтерпедункулярный тракт, аксональные связи, карбоцианиновый краситель Ди-Ай, онтогенез, крысы.

DOI: 10.7868/S0475145013020031

Уздечка (Habenula) это парная структура промежуточного мозга, локализованная в дорсальной части таламуса. Вместе с шишковидным телом уздечка образует эпителиамус (Raxinos, 2004; Савельев, Негашева, 2005). В соответствии с терминологией Паксиноса (Raxinos, Watson, 1998) и на основе сведений о цитоархитектонике уздечки в ее составе было выделено медиальное и латеральное ядра (Andres et al., 1999). В свою очередь медиальное ядро уздечки включает в себя пять субъядер, а латеральное ядро уздечки делится на медиальную и латеральную части, включающие в себя до пяти субъядер.

Уздечка является важным звеном переключения в составе дорсальной проводящей системы мозга, связывающим посредством двух компактных трактов – медулярной полоски (МП) и хабенуло-интерпедункулярного тракта (ХИТ), лимбические структуры переднего мозга и базальные ганглии со средним мозгом. Причем, если МП является строго афферентным путем к уздечке, то в состав ХИТ входят, как афферентные, так и эфферентные волокна. С помощью

метода прижизненного транспорта пероксидазы хрена, было установлено, что большинство нейронов медиального ядра уздечки посылает аксоны в интерпедункулярное ядро (ИПЯ) среднего мозга (Herkenham, Nauta, 1979). Было показано существование определенной топографической организации хабенулоинтерпедункулярных проекций: дорсальная часть медиального ядра уздечки дает эфферентные волокна, оканчивающиеся в вентральной части ИПЯ, латеральная часть медиального ядра уздечки иннервирует дорсальный регион ИПЯ (Contestabile, Flumerfelt, 1981; Sutherland, 1982). Несмотря на то, что основные проекции на ИПЯ происходят из медиального ядра уздечки (Herkenham, Nauta, 1977), существуют данные, указывающие на то, что и латеральное ядро уздечки так же посылает аксоны в ИПЯ. Возможность связи латерального ядра уздечки с ИПЯ была показана косвенным методом разрушения латерального ядра уздечки с последующим измерением уровня ацетилхолинтрансферазы и ацетилхолинэстеразы в ИПЯ (McGeer et al., 1979). Изменения концентрации этих ферментов в ИПЯ свидетельствовали о сня-

тии влияния латерального ядра уздечки, которое было бы возможно только при наличии прямых связей между латеральным ядром уздечки и ИПЯ. В многочисленных работах было показано, что эфферентные волокна латерального ядра уздечки преимущественно идут в структуры ствола мозга в составе ХИТ, их главными целями являются ядра, содержащие моноаминэргические нейроны, такие как дофаминсодержащая вентральная тегментальная область (ВТО) и черная субстанция (Beckstead et al., 1979; Phillipson, Rusock, 1982), а также серотонинсодержащие дорсальное и медианное ядра шва (Herkenham, Nauta, 1977; Klemm, 2004).

ХИТ также содержит и афферентные волокна, идущие из дорсального и медианного ядер шва к ядрам уздечки (Pasquier et al., 1976; Kalen et al., 1989). Также было установлено, что некоторые нейроны в ВТО проецируются назад в латеральное ядро уздечки (Gruber et al., 2007).

Несмотря на большое количество работ о связях уздечки с ИПЯ и структурами ствола, картина развития проводящих систем уздечки отсутствует, тогда как исследование ранних постнатальных этапов развития внутримозговых связей представляет большой интерес и может внести существенный вклад в представления о развитии нервной системы в целом.

Цель настоящей работы – подробное исследование формирования основного проводящего пути, связывающего уздечку со средним мозгом – ХИТ, в процессе раннего постнатального развития у крыс. В работе использован метод антероградной и ретроградной диффузии липофильного карбоцианинового красителя 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианина перхлората по липидному слою мембран нейронов (Vercelli et al., 2000) – один из немногих, позволяющих изучать внутримозговые связи у плодов и неонатальных животных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на крысах Вистар полученных из Научного центра Биомедицинских технологий Российской Академии Медицинских Наук (поселок Столбовая), содержащихся в условиях вивария ИБР РАН с естественным освещением. Для получения датированной беременности самцов подсаживали на ночь в клетку к самкам. День обнаружения спермы во влагалище самки считали нулевым днем эмбрионального развития (Э0), а день рождения – нулевым днем постнатального развития (П0). Для исследования использовали животных на разных сроках развития Э21 (n4), П0 (n2), П2 (n3), П4 (n1),

П6 (n4), П9 (n1). Крысят перед перфузией наркотизировали введением внутривенно раствора нембутала в физиологическом растворе (0.9%-ный раствор хлористого натрия в дистиллированной воде) из расчета 4 мг на 100 г веса животного. Животных перфузировали через левый желудочек сердца сначала физиологическим раствором для удаления крови из кровеносных сосудов, а затем 4% раствором параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере (ПФА), декапитировали, мозг извлекали из черепа и помещали в ПФА при комнатной температуре на 12–20 часов. Далее на фиксированный мозг наносили кристаллы липофильного карбоцианинового красителя 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианина перхлората (Ди-Ай, DiI “Molecular Probes” Inc., США). Поскольку структуры мозга, на которые планировалось нанести маркер, располагаются в толще мозга близко к средней линии мозга, то в большинстве случаев мозг разрезали пополам сагиттально. Ди-Ай наносили в проколы на поверхности среза в области уздечки (разная глубина аппликации кристаллов позволяла метить избирательно медиальное ядро уздечки или оба ядра уздечки одновременно), ИПЯ и область ядер шва среднего мозга (рис. 1а, 1б). Мозг с маркером хранили в ПФА в темноте при комнатной температуре от 6 до 12 месяцев, в течение которых происходила диффузия липофильного маркера по липидному слою мембран нейронов в ретроградном и антероградном направлениях от места нанесения. Наложения маркера на уздечку и интерпедункулярное ядро приводили к четкому мечению ХИТ, который был виден даже под лупой на всех использованных сроках развития. Дальнейшее исследование проводили на сериях вибротомных коронарных или сагиттальных срезов, толщиной 80–100 мкм, натянутых кисточкой на предметные стекла и заключенных в полимеризующую среду мовиол (“Calbiochem”, Германия). Препараты анализировали в фотомикроскопе Leica DM RXA2 (Германия) с системой фильтров для выявления оранжево-красной родаминовой флуоресценции, характерной для Ди-Ай. После оценки распределения кристаллов маркера в месте введения с использованием ультрафиолетового фильтра серии срезов мозга последовательно просматривали, описывая локализацию окрашенных Ди-Ай нервных волокон и нейронов. Фотосъемку препаратов проводили с помощью цифровой фотокамеры Olympus DP70 (Япония) и специальной компьютерной программы для съемки, поставляемой вместе с ней (DP controller и DP manager). Обработку и монтаж цифровых изоб-

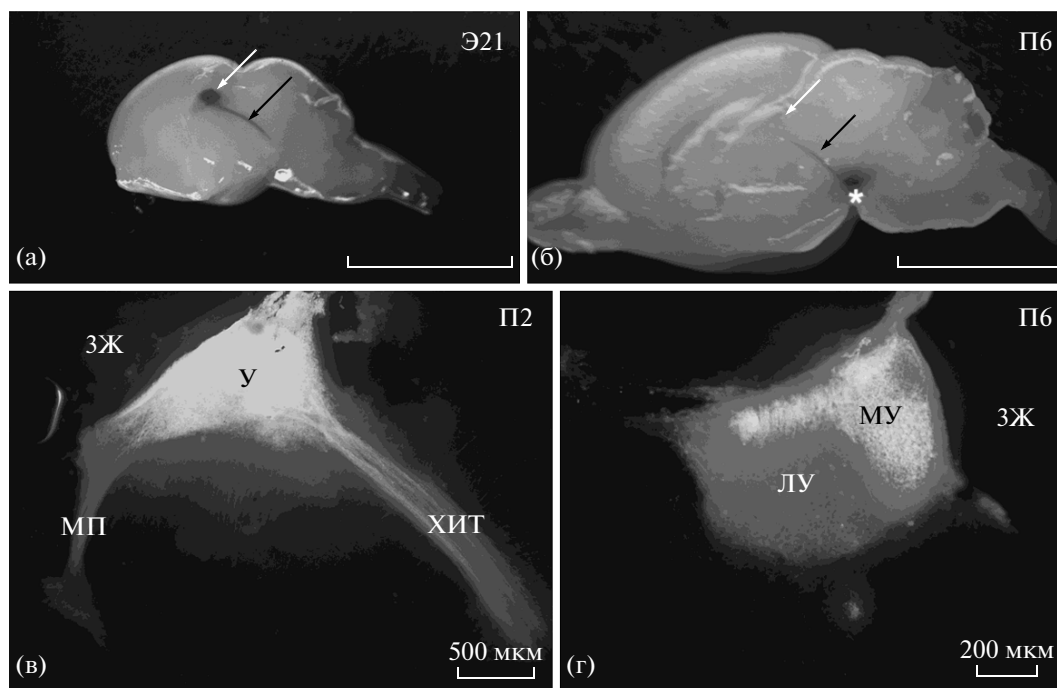


Рис. 1. Распределение Ди-Ай в области его нанесения на уздечку (а) и на интерпедункулярное ядро (б) сагиттально разрезанного фиксированного мозга, а также на сагиттальном (в) и коронарном (г) вибротомных срезах при нанесении маркера на уздечку. МП – медулярная полоска, МУ – медиальное ядро уздечки, ЛУ – латеральное ядро уздечки, У – уздечка, ХИТ (черная стрелка) – хабенулоинтерпедункулярный тракт, Зж – полость третьего желудочка, белая стрелка – нанесение на уздечку, звездочка – нанесение на интерпедункулярное ядро. Масштаб а–б – 5 мм.

ражений для иллюстрации полученных результатов осуществляли при помощи компьютерной программы Photoshop 7.0 (“Adobe”, США). Идентификацию отделов и ядер мозга проводили с использованием атласов развивающегося мозга (Altman, Bayer, 1986; Paxinos et al., 1991) и мозга взрослой крысы (Paxinos, Watson, 1998).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение Ди-Ай в месте его нанесения

Исследование каждого мозга начиналось с анализа распространения маркера в области его нанесения. Степень диффузии Ди-Ай в местах нанесения кристаллов варьировала в зависимости от области мозга и возраста животного. Так, помещение кристаллов Ди-Ай в ядра уздечки приводило к распространению маркера по всему объему уздечки, но на пренатальных и ранних постнатальных стадиях (Э21 и П2) наблюдалась незначительная диффузия красителя в прилежащие к уздечке с вентральной стороны отделы таламуса (рис. 1в). Позже на П6 и П10 точечные нанесения маркера в толщу медиального ядра уздечки такой диффузии за ее пределы не давали и Ди-Ай распространялся строго в пределах ядер уздечки (рис. 1г). Нанесение Ди-Ай на ИПЯ на

Э21 и П0 приводило к распространению маркера по всему ядру с диффузией в прилежащую дорсальнее вентральную тегментальную область. Начиная с П2, поскольку кристаллы маркера наносили на медиальный срез ИПЯ, то в случае локальных нанесений распределение Ди-Ай происходило преимущественно в медиальных отделах.

Распределение структур меченых Ди-Ай при нанесении маркера на уздечку

На всех исследованных сроках нанесение Ди-Ай на уздечку приводило к мечению нервных волокон в обоих трактах уздечки (рис. 1в), причем они были видны даже под лупой на сагиттально разрезанном мозге (рис. 1а). На Э21, П0–П2 многочисленные меченые волокна ХИТ были ориентированы параллельно и прослеживались в виде компактного пучка вплоть до ИПЯ, где они веерообразно расходились, вращаясь в ядро. На Э21 и П2, когда количество волокон в ХИТ еще не очень велико, в ИПЯ выявлялись многочисленные тонкие волокна ветвящиеся в ядре (рис. 2а). Сканирование в конфокальном микроскопе показало, что часть этих волокон пересекала ИПЯ и прослеживалась в дорсокаудальном направлении (рис. 2б). Позже, начиная с П6, из-за обилия меченых структур иннервацию ИПЯ выявить было

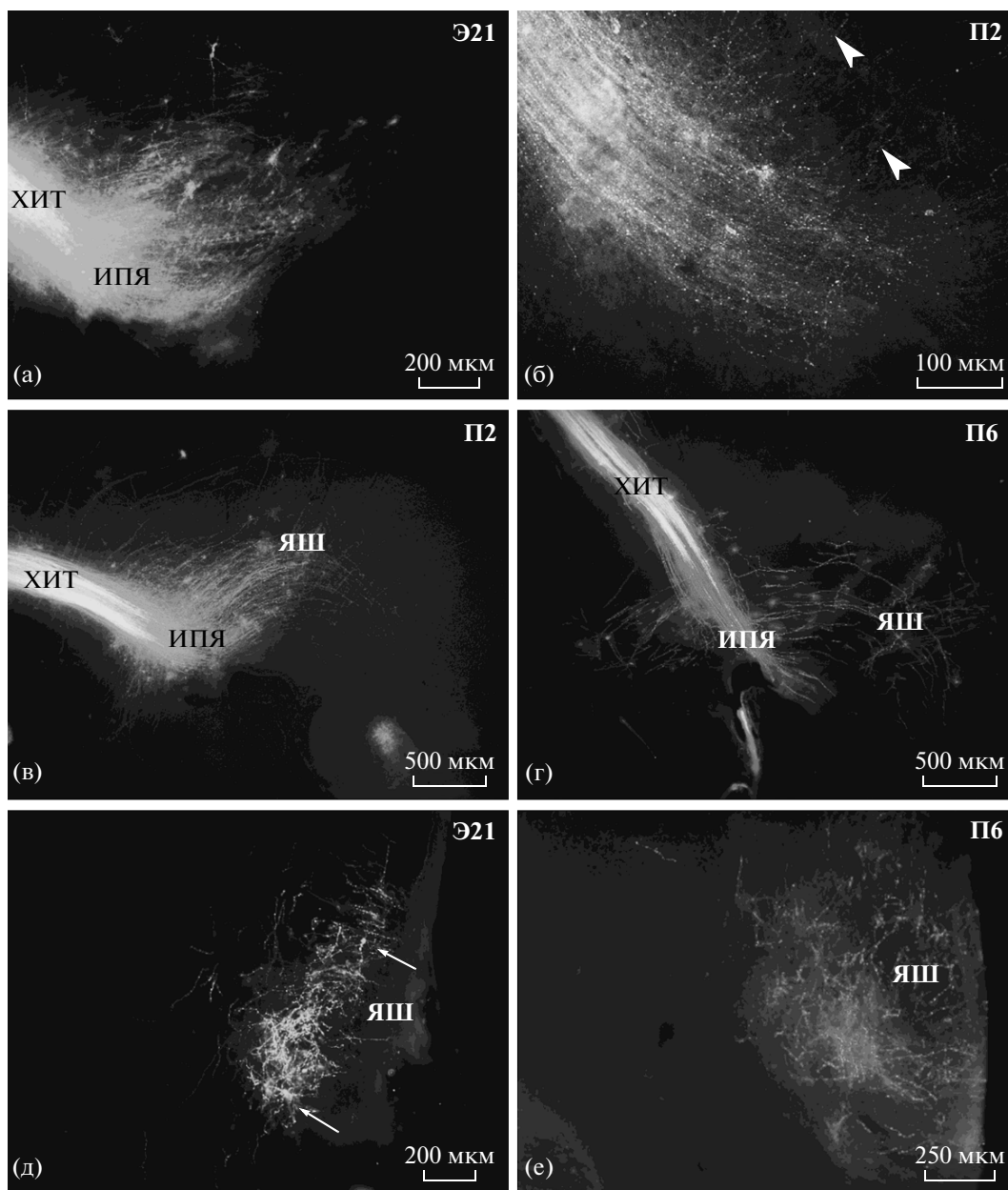


Рис. 2. Меченые структуры выявленные в среднем мозге после наложения Ди-Ай на уздечку на разных сроках перинатального развития. Меченые волокна ХИТ врастающие в ИПЯ на сагиттальных срезах мозга (а–г) прослеживаются параллельно вентральному изгибу среднего мозга достигая области ядер шва (в, г). Терминальная сеть меченых волокон и единичные нейроны на коронарном срезе среднего мозга на уровне ядер шва после обширного нанесения Ди-Ай на уздечку (д). Мечение в области ядер шва после локального нанесения маркера на медиальное ядро уздечки (е). ИПЯ – интерпедункулярное ядро; ХИТ – хабенулоинтерпедункулярный тракт; ЯШ – Ядра шва; наконечник стрелки – отдельные меченые волокна прорастающие из ИПЯ в направлении ЯШ на конфокальном изображении сагиттального среза мозга (б); белые стрелки – меченые нейроны (д).

сложнее, поскольку сплетение меченых волокон заполняло весь объем ядра. Кроме того в той части среднего мозга, где ХИТ пронизывал ВТО, наблюдались волокна ориентированные перпендикулярно основному тракту и распределялись в среднем мозге параллельно его вентральному изгибу. Дру-

гая часть волокон вентрального отдела ХИТ изгибалась в дорсокаудальном направлении в области вентральных отделов ВТО и прослеживалась до области ядер шва (рис. 2в, 2г).

После нанесения Ди-Ай в ядра уздечки на Э21–П2, кроме волокон были обнаружены ме-

ченные тела нейронов без отростков в ВТО, где их выявление было затруднено большим числом меченых волокон, проходящих через эту область (рис. 2а, 2в). В области ядер шва среднего мозга нейроны и сплетение меченых нервных волокон выявлялись уже на E21, причем мечеными структурами охватывалась вся область ядер шва, включающая как дорсальное, так и медианное ядра. В ядрах шва при этом выделялось заметное сплетение меченых волокон, среди которых с трудом просматривались немногочисленные меченые тела нейронов (рис. 2д). Позже были обнаружены различия в характере распределения меченых структур в ядрах шва, в зависимости от топографии распределения маркера в ядрах уздечки. Так на П6 при мечении в области обоих ядер уздечки в медианном ядре шва обнаруживалась четкая группа клеток с развитыми дендритами, ориентированными перпендикулярно вентральной поверхности среднего мозга (рис. 2г). В тех случаях (П6), когда Ди-Ай был преимущественно локализован в медиальном ядре уздечки, в медианном ядре шва было обнаружено только сплетение терминальных волокон (рис. 2е).

Распределение структур меченых Ди-Ай при нанесении маркера на интерпедункулярное ядро, вентральную сегментальную область и ядра шва

Для выявления меченых тел нейронов в ядрах уздечки использовались нанесения Ди-Ай на ИПЯ на мозг, разрезанный сагиттально по средней линии. На E21–P0 ретроградно меченые нейроны выявлялись в обоих ядрах уздечки но весьма неравномерно. На коронарных срезах было заметно, что в латеральном ядре уздечки концентрация нейронов значительно выше, чем в медиальном ядре уздечки, в котором выявляются лишь единичные тела нейронов (рис. 3а, 3б). Начиная с P2 в медиальном ядре уздечки было выявлено значительное количество меченых нейронов с четким топографическим распределением внутри ядра, что на коронарных срезах имело вид дорсальной и более многочисленной вентромедиальной групп (рис. 3в). На сагиттальных срезах было выявлено, что обнаруженные группы не обособлены, а соединяются между собой в узкой медиальной зоне медиального ядра уздечки, где наблюдается максимальная концентрация тел нейронов (рис. 3г). Дорсальный слой клеток медиального ядра уздечки, посылающих аксоны в ИПЯ, расширяется в ростральном и каудальном отделах ядра (рис. 3д). Такое распределение нейронов в медиальном ядре

уздечки обнаруживалось и на всех последующих сроках развития.

В отличие от медиального ядра уздечки в латеральном ядре уздечки уже на E21 было выявлено значительное количество нейронов (рис. 4а). Они располагались преимущественно в дорсокаудальной и в меньшей степени вентрокаудальной областях ядра, в центральной же части латерального ядра уздечки меченые структуры практически не выявлялись. В ростральной области латерального ядра уздечки меченых структур выявлено не было. В тех случаях (П4), в которых при нанесении Ди-Ай на ИПЯ наблюдалась диффузия в ВТО, в латеральном ядре уздечки дополнительно выявлялась группа нейронов, сосредоточенная в ростральной части (рис. 4б).

Исходя из того, что в составе ХИТ афферентные волокна к уздечке идут не только из ИПЯ, но и из ядер шва были проанализированы дополнительные нанесения Ди-Ай на эти структуры на П6 и П9. В результате были выявлены многочисленные меченые нейроны в вентральной и дорсокаудальной частях латерального ядра уздечки, распределение которых в значительной степени совпадало с таковым при нанесении на ИПЯ (рис. 4в).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние несколько десятилетий основным подходом к исследованию внутримозговых связей у взрослых животных являются методы прижизненного транспорта различных маркеров, таких как пероксидаза из хрена, флюороголд, холерный цитотоксин Б и др., вводимых в мозг стереотаксически (Klemm, 2004). Однако данные маркеры неприменимы для исследования внутримозговых связей на пренатальных и ранних постнатальных сроках. Как было показано нами ранее, использование липофильного карбоцианинового красителя Ди-Ай, дает хорошие результаты для решения подобных задач, что описано в литературе (Villani, 1996) и подтверждено нами на примере исследования развития ряда проводящих систем гипоталамуса (Makarenko et al., 2000, 2001; Makarenko, 2008).

В настоящей работе нанесение Ди-Ай осуществлялось на поверхность или в проколы уздечки на мозге, разрезанном пополам сагиттально. Это обеспечивало мечение либо медиального ядра уздечки, либо обоих ядер. Наличие диффузии маркера за пределы ядер уздечки на пренатальных и ранних постнатальных сроках развития крыс объясняется формированием волокнистой капсулы, окружающей данную структуру (Andres et al., 1999), которая на более поздних

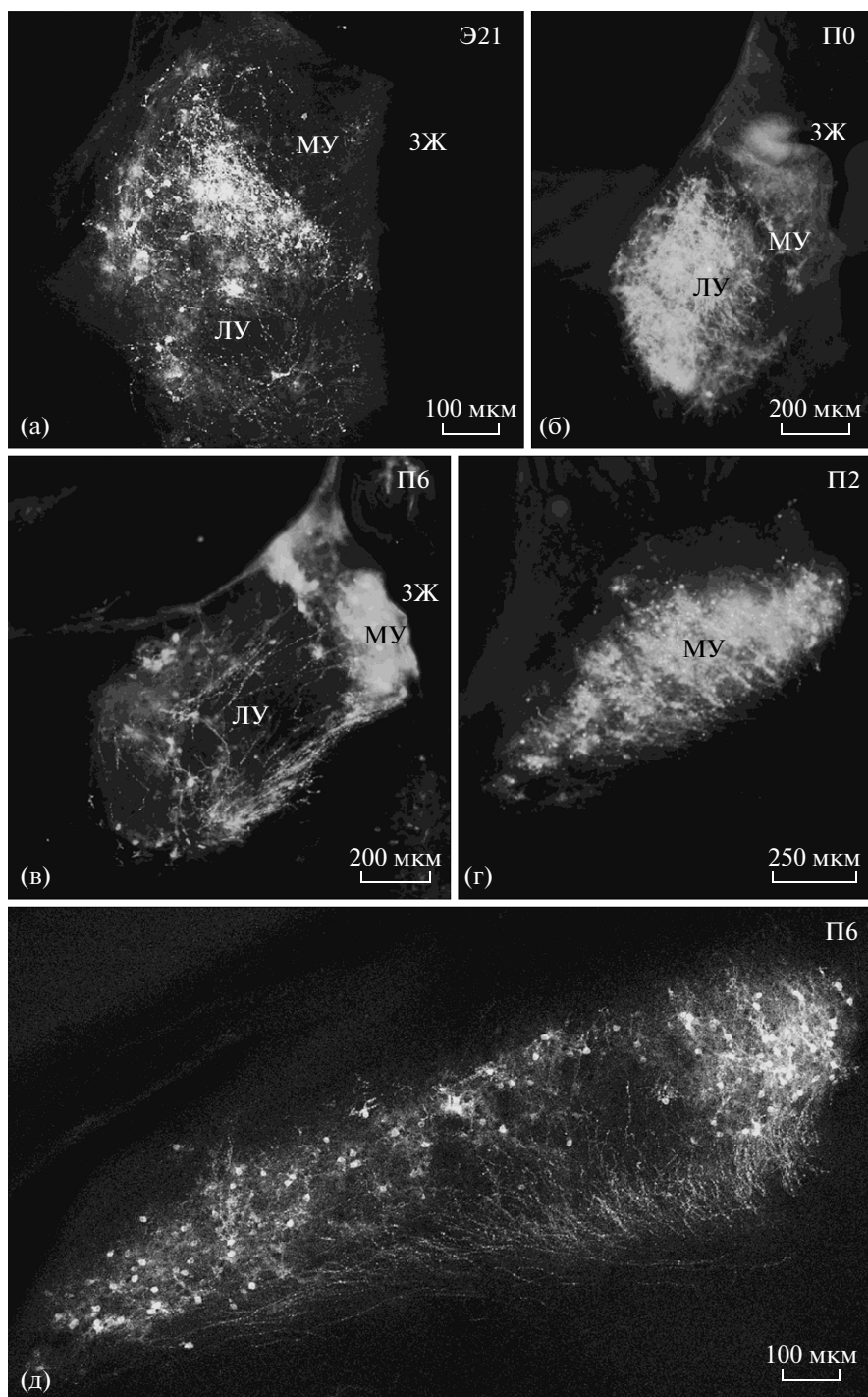


Рис. 3. Распределение меченых тел нейронов и волокон в медиальном и латеральном ядрах уздечки при нанесении Ди-Ай на ИПЯ на разных сроках развития: а – конфокальное изображение коронарного среза уздечки на Э21; б–в – коронарные срезы уздечки на П0, П6; г – сагиттальный срез медиального ядра уздечки на П2; д – конфокальное изображение медиального ядра уздечки на П6. МУ – медиальное ядро уздечки, ЛУ – латеральное ядро уздечки, ЗЖ – полость третьего желудочка.

постнатальных сроках является барьером, препятствующим распространению красителя за пределы уздечки. Подобная картина описана ранее в случаях с нанесением Ди-Ай в мамилляр-

ные ядра гипоталамуса (Алпеева, Макаренко, 2007; Alpeeva, Makarenko, 2009). Диффузия Ди-Ай за пределы медиального и латерального ядер уздечки на сроках Э21–П2 не может оказать вли-

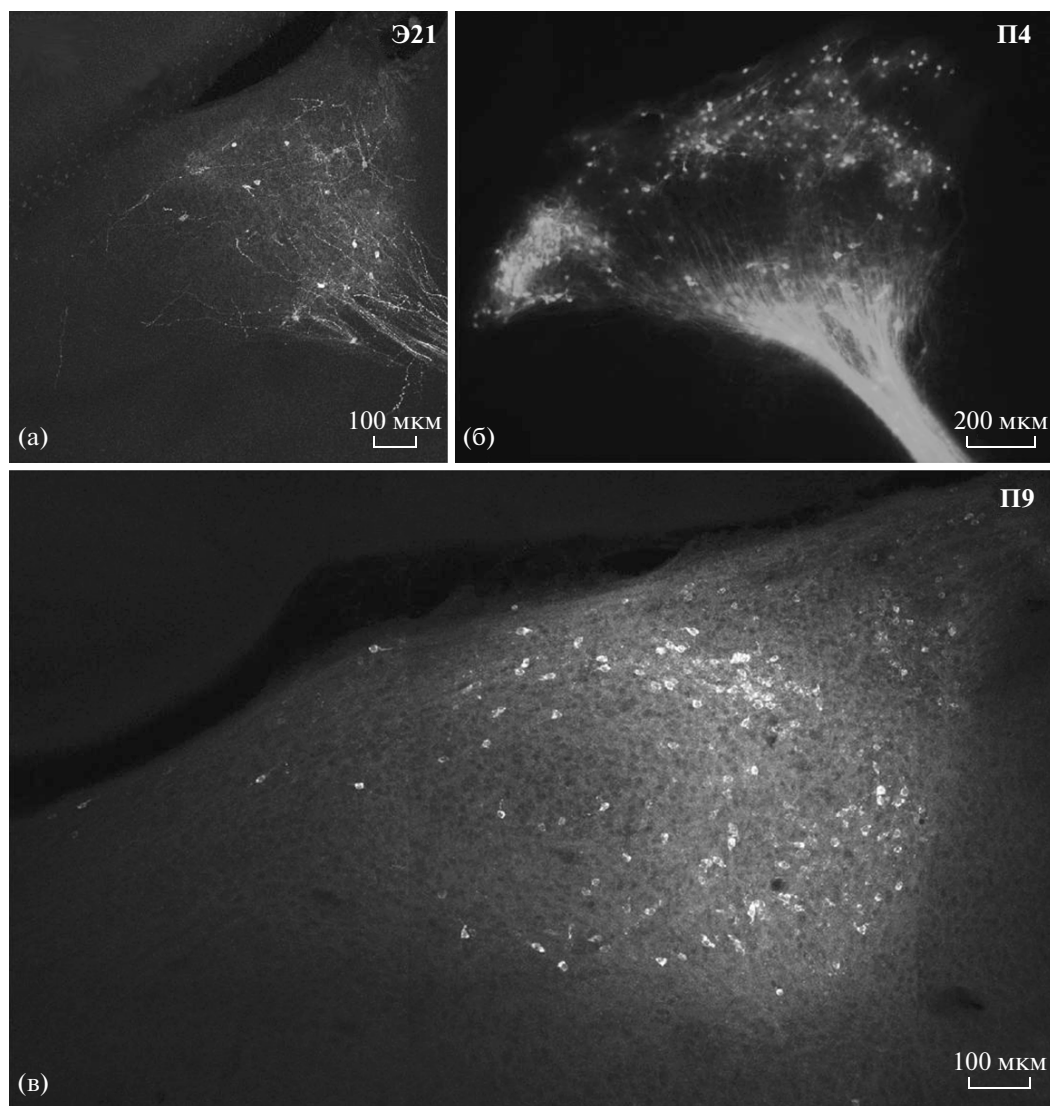


Рис. 4. Меченые тела нейронов, выявляемые в латеральном ядре уздечки после нанесения Ди-Ай на ИПЯ (а), ИПЯ и ВТО (б), область ядер шва (в): а – конфокальное изображение сагиттального среза уздечки на Э21; б – сагиттальный срез латерального ядра уздечки на П4; в – конфокальное изображение латерального ядра уздечки на П9. ХИТ – хабе-нулоинтерпедункулярный тракт.

яние на результаты выявления проекций на ИПЯ, поскольку связи прилежащих к уздечке ядер таламуса с интерпедункулярным ядром не описаны (Paxinos, 2004).

Использованный методический подход позволил впервые описать перинатальное развитие различных проводящих систем, образующих ХИТ, подробно изученный у взрослых животных (Araki et al., 1988; Contestabile, Flumerfelt, 1981). Поскольку меченые волокна были обнаружены в ХИТ на всех исследованных сроках развития, и учитывая особенность данного маркера, диффундировать как ретроградно, так и антероградно, потребовался специальный анализ для того

чтобы установить, какие именно нейроны являются источниками этих волокон.

Известно, что ХИТ является основным трактом, связывающим уздечку с интерпедункулярным ядром, и источником этих проекций являются преимущественно именно нейроны медиального ядра уздечки (Herkenham, Nauta, 1979). Однако наши нанесения на ИПЯ на Э21 и П0 выявляли в медиальном ядре уздечки лишь единичные меченые клетки, тогда как в латеральном ядре уздечки меченых нейронов и волокон было обнаружено довольно много. Проекции из латерального ядра уздечки в ИПЯ были ранее описаны лишь в единичных работах, где авторы

подчеркивали их малочисленность (Contestabile, Flumerfelt, 1981; Kim, 2009). По нашим данным распределение нейронов меченых Ди-Ай в латеральном ядре уздечки при нанесении на ИПЯ было неравномерным. Максимальная концентрация клеток наблюдалась в дорсо- и вентрокаудальных отделах латерального ядра уздечки, а ростральные и центральные области ядра не содержали меченых нейронов. Следовательно, встал вопрос, куда кроме ИПЯ следуют обнаруженные волокна из латерального ядра уздечки. Мы обнаружили, что с самых ранних из исследованных сроков в вентральной части ХИТ на уровне ВТО и ИПЯ часть меченых волокон отделялись от основного тракта и прослеживались дорсокаудально в направлении ядер шва, где ветвились и образовывали сплетение. Обнаруженная нами локализация нейронов в латеральном ядре уздечки, посылающих аксоны в медианное ядро шва, совпадает с данными (Behzadi et al., 1990), полученными с помощью транспорта холерного цитотоксина Б из медианного ядра шва к уздечке у взрослых крыс. Наши контрольные случаи (П6, П9) с нанесением маркера на медианное ядро шва выявили аналогичную картину распределения нейронов в латеральном ядре уздечки. Таким образом, результаты с выявлением нейронов в латеральном ядре уздечки, полученные нами в случае наложения на ИПЯ, можно трактовать как выявление не только проекций собственно на ИПЯ, но и в большей степени как мечение аксонов латерального ядра уздечки, иннервирующих ядра шва.

Кроме волокон в медианном ядре шва уже на Э21 выявлялись меченые тела нейронов. На более поздних постнатальных сроках (П6), когда удалось сделать локальные нанесения в отдельные ядра уздечки, было обнаружено, что нейроны в медианном ядре шва выявляются лишь в том случае, когда маркер был нанесен в латеральное ядро уздечки, являющееся по данным литературы основной мишенью нейронов медианного ядра шва (Vertes et al., 1999). Полученные данные свидетельствуют о том, что реципрокные связи латерального ядра уздечки с медианным ядром шва формируются уже в перинатальном периоде развития.

Что касается медиального ядра уздечки — основной структуры, иннервирующей ИПЯ у взрослых животных (Herkenham, Nauta, 1977), то первые волокна, врастающие в область этого ядра, обнаруживаются уже на сроках Э21–П2, полностью занимая объем ИПЯ к П6. Соответственно, возникает закономерный вопрос, когда обнаруживаются и как распределяются нейроны в медиальном ядре уздечки при нанесении Ди-Ай

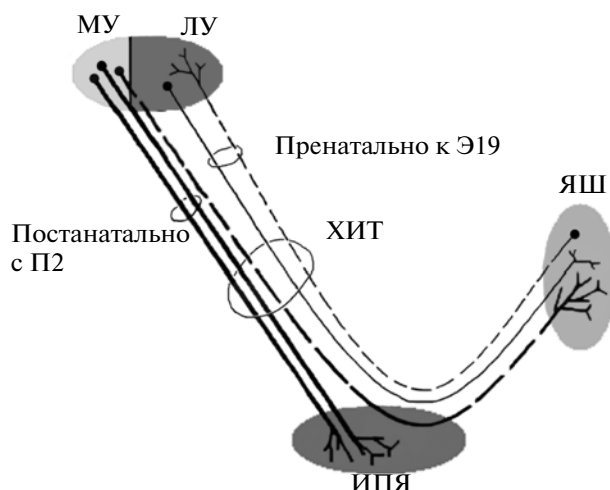


Рис. 5. Схема развития отдельных проекционных систем в составе ХИТ. ИПЯ — интерпедункулярное ядро; МУ — медиальное ядро уздечки; ЛУ — латеральное ядро уздечки; ХИТ — хабенулоинтерпедункулярный тракт; ЯШ — ядра шва; толстая непрерывная линия — эфферентные волокна из МУ в ИПЯ; толстая пунктирная линия — эфферентные волокна из МУ в ЯШ; тонкая непрерывная линия — эфферентные волокна из ЛУ в ЯШ; тонкая пунктирная стрелка — афферентные волокна в ЛУ из ЯШ.

на ИПЯ. Согласно данным литературы, в медиальном ядре уздечки выявляют 4 группы нейронов, иннервирующих разные отделы ИПЯ (Contestabile, Flumerfelt, 1981). Мы обнаружили, что на Э21 и П0 при нанесении Ди-Ай на область ИПЯ, при котором маркер распространялся по всему ядру, в медиальном ядре уздечки обнаруживались лишь единичные тела нейронов. Однако нельзя утверждать, что они посылают аксоны именно в ИПЯ, поскольку описаны также немногочисленные проекции медиального ядра уздечки на медианное ядро шва у взрослых крыс (Behzadi et al., 1990), и по нашим данным на этих сроках развития в медианном ядре шва обнаруживаются меченые аксоны от нейронов уздечки.

Начиная с П2 и далее на П6 в медиальном ядре уздечки уже выявлялось значительное количество меченых тел нейронов с характерным топографическим распределением внутри ядра. При обширном мечении ИПЯ, в котором затрагивались как центральная, так и латеральные отделы этого ядра, в медиальном ядре уздечки выявлялись нейроны, которые образовывали на коронарных срезах 2 заметных скопления: крупное — вентральное, занимавшее всю вентральную часть медиального ядра уздечки, и дорзальное с меньшим числом клеток. На сагиттальных срезах нами так же было обнаружено, что дорзальное скопление нейронов не является непрерывным, а делится на две

группы, сосредоточенные в ростральном и каудальном отделах медиального ядра уздечки. Эти данные свидетельствуют о том, что все основные группы нейронов медиального ядра уздечки, иннервирующие разные отделы ИПЯ, обнаруживаются лишь со второго дня постнатального развития.

Таким образом, настоящая работа впервые описывает гетерогенное формирование отдельных проекционных систем, входящих в состав ХИТ у крыс в процессе перинатального онтогенеза. Реципрокные связи латерального ядра уздечки с ядрами шва формируются пренатально. Проекции медиального ядра уздечки на интерпедункулярное ядро обнаруживаются лишь постнатально с П2. Полученные результаты о сроках развития суммированы в виде схемы (рис. 5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Савельев С.В., Негашева М.А.* Практикум по анатомии мозга человека. М.: Веди, 2005. 200 с.
- Алпеева Е.В., Макаренко И.Г.* Перинатальное развитие маммилло-теgmentальных связей у крыс // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 2. С. 1–8.
- Alpeeva E.V., Makarenko I.G.* Perinatal Development of the mammillothalamic tract and innervations of the anterior thalamic nuclei // Brain Res. 2009. V. 1248. P. 1–13.
- Altman J., Bayer S.A.* Atlas of prenatal rat brain development. London etc.: CRC Press Boca Raton, 1986.
- Andres K.H., During M.V., Ven R.W.* Subnuclear organization of the rat habenular complexes // J. Comp. Neurol. 1999. V. 407. P. 130–150.
- Araki M., McGeer P.L., Kimura H.* The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method // Brain Res. 1988. V. 441. P. 319–330.
- Beckstead R.M., Domesick V.B., Nauta W.J.* Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat // Ibid. 1979. V. 175. P. 191–217.
- Behzadi G., Kalen P., Parvopassu F., Wiklund L.* Afferents to the median raphe nucleus of the rat: retrograde cholera toxin and wheat germ conjugated horseradish peroxidase tracing, and selective D-[3H]aspartate labelling of possible excitatory amino acid inputs // Neuroscience. 1990. V. 37. P. 77–100.
- Contestabile A., Flumerfelt B.A.* Afferent connections of the interpeduncular nucleus and the topographic organization of the habenulo-interpeduncular pathway: an HRP study in the rat // J. Comp. Neurol. 1981. V. 196. P. 253–270.
- Gruber C., Kahl A., Lebenheim L., Kowski A., Dittgen A., Veh R.W.* Dopaminergic projections from the VTA substantially contribute to the mesohabenular pathway in the rat // Neurosci. Lett. 2007. V. 427. P. 165–170.
- Herkenham M., Nauta W.J.* Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem // J. Comp. Neurol. 1977. V. 173. P. 123–146.
- Herkenham M., Nauta W.J.* Efferent connections of the habenular nuclei in the rat // Ibid. 1979. V. 187. P. 19–48.
- Kalén P., Strecker R.E., Rosengren E., Björklund A.* Regulation of striatal serotonin release by the lateral habenula-dorsal raphe pathway in the rat as demonstrated by *in vivo* microdialysis: role of excitatory amino acids and GABA // Brain Res. 1989. V. 492. P. 187–202.
- Kim U.* Topographic commissural and descending projections of the habenula in the rat // J. Comp. Neurol. 2009. V. 513. P. 173–187.
- Klemm W.R.* Habenular and interpeduncularis nuclei: shared components in multiple-function networks // Med. Sci. Moint. 2004. Nov; 10(11). P. 261–273.
- Makarenko I.G., Ugrumov M.V., Derer P., Calas A.* Projections from the hypothalamus to the posterior lobe in rats during ontogenesis: 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate tracing study // J. Comp. Neurol. 2000. V. 422. № 3. P. 327–337.
- Makarenko I.G., Ugrumov M.V., Calas A.* Axonal Projections from the hypothalamus to the median eminence in rats during ontogenesis: DiI tracing study // Anat. Embryol. (Berl.) 2001. V. 204. № 3. P. 239–252.
- Makarenko I.G.* Prenatal carbocyanine dye tracing of septo-hypothalamic connections // Brain Res. 2007. V. 1130. P. 38–47.
- Makarenko I.G.* DiI tracing is a useful tool for studies of the hypothalamic connections during perinatal development // In Neural Pathways Research. Chapter II. F.L. Pichler, Ed. New-York: Nova Sci. Publishers, 2008. P. 31–71.
- McGeer E.G., Scherer-Singler U., Singh E.A.* Confirmatory data on habenular projections // Brain Res. 1979. V. 168. P. 375–386.
- Pasquier D.A., Anderson C., Forbes W.B., Morgane P.J.* Horseradish peroxidase staining of the lateral habenular-midbrain raphe nuclei connections in the rat // Brain Res. Bull. 1976. V. 1. P. 443–451.
- Paxinos G.* The rat nervous system // Elsevier Academic Press, 2004. 1329 p.
- Paxinos G., Watson C.* The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates // New York: Academic Press, 1998. 71 p.
- Phillipson O.T., Pycock C.J.* Dopamine neurons of the ventral tegmentum project to both medial and lateral habenula, some implications for habenular function // Exp. Brain Res. 1982. V. 45. P. 89–94.
- Sutherland R.D.* The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex // Neurosci. Biobehav Rev. 1982. V. 6. P. 1–13.
- Vercelli A., Repici M., Garbossa D., Grimaldi A.* Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals // Brain Res. Bull. 2000. V. 51. № 1. P. 11–28.
- Vertes R.P., Fortin W.J., Crane A.M.* Projections of the median raphe nucleus in the rat // J. Comp. Neurol. 1999. V. 407. P. 555–582.
- Villani L.* The septointerpeduncular projection in the rat, tracing with the carbocyanine dye // Brain Res. Bull. 1996. V. 40. P. 279–282.

Development of the Habenulointerpeduncular Tract of Rats

A. A. Klepukov and I. G. Makarenko

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

Abstract—Development of the habenulointerpeduncular tract has been carried out on fixed brain preparations obtained from 21 day rat embryos and from neonatal animals on the 0 and 9 days of postnatal development by diffusion of lipophilic fluorescent carbocyanine dye DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) through neuron membranes. The marker was introduced into the nuclei of the habenula, the interpeduncular nucleus, and into the area of raphe nuclei. Neurons and fibers that contained DiI were identified on vibratome sections by fluorescent and confocal microscopy. We have found that reciprocal links between the lateral habenula nucleus and raphe nuclei are formed in the prenatal period by stage E21. Raphe nuclei innervating neurons were located in dorso- and ventrocaudal parts of the lateral habenula nucleus. Projections of the medial habenula nucleus onto interpeduncular nucleus were found only in the postnatal P2 period. Neurons that provide a source of these projections form characteristic assemblies inside the medial habenula nucleus. Therefore, the present study for the first time describes heterogenic formation of different projection systems that are involved in the habenulointerpeduncular tract of rats at perinatal ontogenesis.

Keywords: habenula, midbrain, raphe nuclei, interpeduncular nucleus, habenulointerpeduncular tract, axonal links, carbocyanine dye DiI, ontogenesis, rats.

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА
И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 62.018.2:017.12

ЭКСТРАТИМИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА
И АНТИГЕНРАСПОЗНАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ $\alpha\beta$ Т-ЛИМФОЦИТОВ
ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ У МЫШЕЙ

© 2013 г. Е. М. Куклина*, С. В. Ширшев, Н. С. Глебездина

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН,
614081 Пермь, ул. Голева, д. 13

*E-mail: ibis_07@mail.ru

Поступила в редакцию 12.08.11 г.

Окончательный вариант получен 17.11.11 г.

Изучена реактивность $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов беременных самок СВА в отношении антигенов самца, а также наличие процессов реаранжировки генов антигенного рецептора Т-клеток в периферических лимфоидных органах мышей при трех вариантах скрещивания: СВА \times BALB/c (нормальная аллогенная беременность), СВА \times СВА (сингенная беременность) и СВА \times DBA/2 (склонная к аборт комбинированная). Показано, что пролиферативный ответ $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов беременных самок СВА на клетки селезенки самца наиболее выражен при нормальной аллогенной беременности, в меньшей степени – при сингенной беременности, и не выявляется в комбинации СВА \times DBA/2. При этом клетки парааортальных лимфатических узлов (дренирующих матку) отвечают на антигены самца достоверно эффективнее, чем лимфоциты мезентериальных и подмышечных лимфатических узлов. Одновременная оценка экспрессии рекомбиназы RAG-1, ключевого фермента реаранжировки генов Т-клеточного рецептора, выявила аналогичные закономерности – преимущественную активность рекомбиназы в Т-лимфоцитах парааортальных лимфатических узлов беременных самок СВА, что указывает на связь экстратимической реаранжировки генов антигенного рецептора с изменением антигенраспознающего репертуара этих клеток. Обсуждается возможное биологическое значение выявленного феномена.

Ключевые слова: $\alpha\beta$ Т-лимфоциты, экстратимическая дифференцировка, реаранжировка генов TCR, антигенраспознающий репертуар, смешанная культура лимфоцитов, беременность.

DOI: 10.7868/S0475145013020079

Предыдущими исследованиями мы выявили неизвестный ранее феномен – индукцию реаранжировки генов Т-клеточного рецептора (T Cell Receptor, TCR) в периферических Т-лимфоцитах при беременности (Ширшев и др., 2007). В частности, мы показали экспрессию ключевого маркера реаранжировки, рекомбиназы RAG-1 (Recombination Activating Genes), в Т-клетках периферических лимфоидных органов беременных мышей. Теоретически, такой процесс должен сопровождаться появлением на мембране Т-лимфоцита нового антигенного рецептора, с измененной специфичностью (Куклина, 2006). А поскольку на периферии отсутствуют условия, обеспечивающие эффективную клональную селекцию вновь образующихся Т-клеток (как это в норме происходит в тимусе), реаранжировка генов TCR в периферических лимфоидных органах неизбежно должна сопровождаться изменением антигенраспознающего репертуара Т-лимфоцитов, в частности, появлением аутореактивных Т-клеточных клонов.

Целью настоящей работы было сопоставление антигенраспознающей активности $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов беременных мышей с таковой для небеременных, с одновременной оценкой рекомбиназной активности в этих клетках, при разных вариантах скрещивания – нормальном аллогенном, сингенном и в склонной к аборт комбинированной.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовались линейные самки мышей СВА, которых скрещивали с самцами разных линий – BALB/c (нормальная аллогенная беременность), СВА (нормальная сингенная беременность) и DBA/2 (склонная к аборт комбинированная) (Chaouat et al., 1983; Lin et al., 2004). Животные были получены из питомника РАМН (“Рапполово”, Санкт-Петербург). Беременность фиксировали по появлению вагинальной пробки. Срок беременности у животных (9-е сутки) подбирали в соответствии с тем, что у самок СВА \times DBA/2 аборты про-

исходят, как правило, на 10–14 день беременности (Chaouat et al., 1983; Lin et al., 2004).

Объектами исследования служили тимоциты и фракционированные периферические Т-лимфоциты, выделенные из лимфоузлов трех разных типов – парааортальных (дренирующих матку), а также мезентериальных и подмышечных (не дренирующих матку) (Lin et al., 2004). В основной серии экспериментов при фракционировании Т-лимфоцитов из клеточной суспензии, полученной в результате гомогенизации лимфоузлов, удаляли В-лимфоциты, способные в норме реаранжировать цепи антигенного рецептора на периферии (Hikida et al., 1996), – с помощью специфической антисыворотки к иммуноглобулинам мыши (“Медгамал”, Россия). В заключительной серии экспериментов для исключения влияния на результат минорной субпопуляции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, традиционно дифференцирующихся вне тимуса и также экспрессирующих белки RAG на периферии (Mincheva-Nilsson et al., 1997; Robey, Fowlkes, 1998) из клеточной суспензии направленно выделялись $\alpha\beta$ Т-лимфоциты – иммуномагнитным фракционированием с помощью моноклональных антител H57-597 к β -цепи TCR мыши (“Caltag”, США).

В клетках оценивали экспрессию мРНК рекомбиназы RAG-1, а также β -актина (положительный контроль на наличие мРНК в пробе).

Выделение РНК, обратную транскрипцию и амплификацию проводили с помощью соответствующих наборов (“Лаборатория Изоген”, Россия): для выделения тотальной РНК (Trizol RNA Prep 100), для обратной транскрипции (GenePak RT Core) и для амплификации (GenePak PCR Core). В работе использовались следующие специфические праймеры и соответствующие режимы амплификации: для RAG-1 – 5'-CATC-GAGACAGTCCCTTCC-3' и 5'-CGATAGAGC-CATCCCTTTC-3' (Vaitaitis et al., 2003), 92°C × 30 с, 60°C × 30 с, 72°C × 60 с, 35 циклов; для β -актина – 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' и 5'-TTTGATGTCACGCACGATTT-3' (подобраны с помощью программы Primer 3: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), 92°C × 30 с, 60°C × 30 с, 72°C × 60 с, 30 циклов.

Электрофорез проводили стандартным методом в 1.5% геле агарозы (“Serva”, Германия).

Антигенраспознающую активность Т-клеток при беременности оценивали по пролиферативному ответу фракционированных $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов лимфатических узлов беременных мышей (2×10^5 на пробу) на антигены самцов соответствующих линий и небеременных самок, в односторонней смешанной культуре лимфоцитов. В качестве стимулирующих клеток использовали клетки селезенки мышей, а также, в ряде экспериментов, фракционированные $\alpha\beta$ Т-лимфоциты подмышечных и мезентериальных лимфатических узлов

(2×10^5 на пробу), предварительно обработанных митомицином С (25 мкг/мл). Клетки культивировали 72 часа. Результаты оценивали в МТТ-тесте, основанном на определении количества жизнеспособных клеток в пробе (Wei et al., 2005). Для этого за 4 часа до окончания культивирования в пробы вносили МТТ (водорастворимая соль тетразолия, полное название – (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5)-diphenyltetrazolium bromide) в конечной концентрации 0.5 мг/мл. После культивирования пробы центрифугировали (1500 об./мин × 10 мин), удаляли супернатант и вносили изопропанол для солюбилизации формазана, образующегося из МТТ при разрезании тетразолиевого кольца дегидрогеназами и откладывающегося в клетке в виде гранул. Количество образовавшегося формазана оценивалось спектрофотометрически при длине волны 570 нм. Индекс пролиферации определялся как отношение соответствующих показателей оптической плотности для стимулированной (клетками самца) и не стимулированной проб.

Статистический анализ проводился с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ пролиферативного ответа $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов беременных самок СВА на антигены самцов соответствующих линий показал, что при нормальной беременности (и сингенной, и аллогенной) индекс пролиферации Т-клеток, определяемый как отношение показателей пролиферативной активности в стимулированной и нестимулированной пробах, выше, чем у небеременных животных (табл. 1), но зависит от происхождения Т-клеток – конкретно, от типа лимфатических узлов, из которых они получены. Наиболее выраженным этот эффект был при нормальной аллогенной беременности (СВА × BALB/c) для Т-лимфоцитов парааортальных лимфоузлов (дренирующих матку), существенно меньшим, но статистически значимым – для подмышечных, тогда как для Т-клеток мезентериальных лимфатических узлов ответ на антигены самца не отличался от такового для небеременных самок СВА. Более того, достоверные различия в индексах пролиферации были выявлены и в пределах одной группы животных: ответ Т-клеток у беременных самок СВА × BALB/c был выше в парааортальных лимфатических узлах по сравнению с мезентериальными (табл. 1). В отличие от нормальной беременности, в комбинации СВА × DBA/2, характеризующейся высоким уровнем спонтанных абортот, ответа периферических Т-клеток на антигены самцов DBA/2 не выявлено (табл. 1). Возможно, отсутствие ответа в данной модели и является одной из причин предрасположенности к абортот, поскольку, согласно современным представлениям, для успешной имплантации и плацентации необ-

Таблица 1. Проллиферативный ответ периферических $\alpha\beta$ T-лимфоцитов самок СВА на антигены самца в односторонней смешанной культуре лимфоцитов

Отвечающие клетки ($\alpha\beta$ T-лимфоциты самки)		Индекс стимуляции ($M \pm m$)		
		Стимулирующие клетки (клетки селезенки самца)		
		BALB/c	СВА	DBA/2
Небеременные самки СВА	парааортальные ЛУ	1.47 \pm 0.081	н.д.	1.19 \pm 0.074
	мезентериальные ЛУ	1.39 \pm 0.089		1.18 \pm 0.062
	подмышечные ЛУ	1.37 \pm 0.109		1.21 \pm 0.048
Беременные самки СВА \times BALB/c	парааортальные ЛУ	2.09 \pm 0.222*		
	мезентериальные ЛУ	1.49 \pm 0.124		
	подмышечные ЛУ	1.69 \pm 0.196*		
Беременные самки СВА \times СВА	парааортальные ЛУ		1.72 \pm 0.183	
	мезентериальные ЛУ		1.66 \pm 0.178	
	подмышечные ЛУ		1.46 \pm 0.138	
Беременные самки СВА \times DBA/2	парааортальные ЛУ			1.083 \pm 0.042 ^{a, b}
	мезентериальные ЛУ			1.11 \pm 0.045 ^b
	подмышечные ЛУ			1.01 \pm 0.035 ^{a, b}

Примечания: в каждой группе 8–10 животных; ЛУ – лимфатические узлы; н.д. – нет данных; индекс пролиферации определялся как отношение соответствующих показателей оптической плотности для стимулированной (клетками селезенки самца) и не стимулированной проб.

* $p < 0.05$ (сопоставление с ответом Т-клеток соответствующих лимфатических узлов небеременных самок).

^a $p < 0.05$ (сопоставление с соответствующим показателем для беременности СВА \times BALB/c).

^b $p < 0.05$ (сопоставление с соответствующим показателем для беременности СВА \times СВА).

ходим достаточный уровень иммунореактивности материнского организма в отношении отцовских и фетальных антигенов – цитокины, секретируемые в ходе иммунного ответа, оказывают трофическое действие на плаценту и плод (Wegmann et al., 1993).

В целом, вычленив из всего многообразия выявленных эффектов данные, соответствующие целям и задачам настоящей работы, можно сказать, что при нормальной аллогенной беременности (СВА \times BALB/c) $\alpha\beta$ T-лимфоциты дренирующих матку (парааортальных) лимфатических узлов отвечают на антигены самца достоверно эффективнее Т-клеток лимфоузлов, не дренирующих матку, – мезентериальных и подмышечных. Возможно, данный эффект связан с локальным изменением антигенраспознающего репертуара этих клеток. Однако, строго говоря, он может иметь и альтернативное объяснение, основанное на существовании характерного для беременности феномена – фетального микрохимеризма, т.е. персистенции фетальных клеток в материнском организме (Bianchi et al., 1996; O'Donoghue et al., 2004). Следствием микрохимеризма является примирование материнских лимфоцитов антигенами плода, которое происходит преимущественно в лимфатических узлах, дренирующих матку. Именно с этим феноменом связан, по-видимому, показанный в настоящей работе более высокий Т-клеточный ответ на антигены самца у беременных самок

по сравнению с небеременными. Им же можно объяснить и различия в ответе на антигены самца Т-лимфоцитов разных лимфатических узлов при нормальной аллогенной беременности.

Чтобы нивелировать влияние эффекта примирования при беременности Т-клеток лимфатических узлов фетальными антигенами, мы определили пролиферативный ответ Т-лимфоцитов беременных самок СВА \times BALB/c на клетки селезенки небеременных самок СВА. В результате были выявлены следующие закономерности: индекс пролиферации Т-клеток парааортальных лимфатических узлов у этих животных был достоверно выше такового для Т-лимфоцитов мезентериальных лимфатических узлов, а также Т-лимфоцитов парааортальных лимфоузлов небеременных самок (рисунок). Поскольку в данной модели возможность предварительного примирования Т-клеток существенно снижена, появление реактивности Т-лимфоцитов парааортальных лимфоузлов в отношении собственных клеток связано, вероятнее всего, именно с изменением антигенраспознающего репертуара, в частности, с появлением новых аутореактивных Т-клеточных клонов.

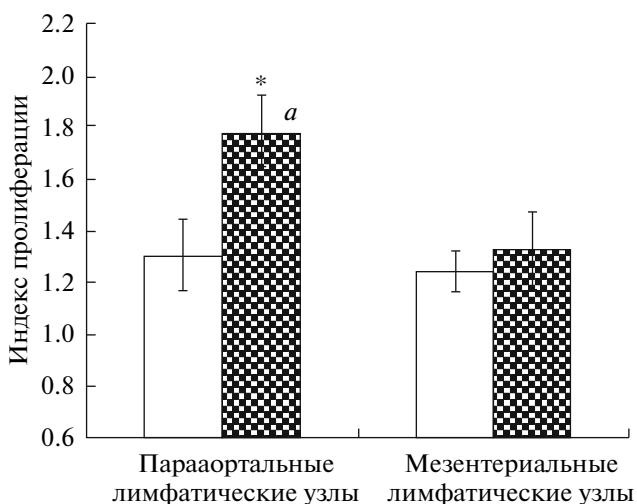
Одновременная оценка наличия процессов реаранжировки генов TCR в периферических Т-лимфоцитах беременных самок СВА в целом подтвердила полученные нами ранее результаты (Ширшев и др., 2007). Как видно из таблицы 2,

Таблица 2. Экспрессия RAG-1 $\alpha\beta$ T-лимфоцитами мышей при беременности

Животные	Процент животных с экспрессией мРНК RAG-1 в $\alpha\beta$ T-лимфоцитах		
	Источник $\alpha\beta$ T-клеток		
	Парааортальные ЛУ	Мезентериальные ЛУ	Подмышечные ЛУ
Небеременные самки СВА	12.5	0	0
Беременные самки СВА \times BALB/c	88.8	14.3	44.4
Беременные самки СВА \times СВА	25	0	25
Беременные самки СВА \times DBA/2	77.7	16.6	22.2

Примечания: в каждой группе 8–10 животных; ЛУ – лимфатические узлы.

экспрессия мРНК рекомбиназы RAG-1, ключевого фактора и маркера реаранжировки генов в клетке, наиболее стабильно выявлялась в Т-клетках парааортальных лимфатических узлов – как в моделях нормальной беременности (и сингенной, и аллогенной), так и в склонной к аборту комбинации. Поскольку характер распределения рекомбиназной активности аналогичен появлению аутореактивных реакций Т-клеток, эти процессы, по-видимому, взаимосвязаны.



Пролиферативный ответ периферических $\alpha\beta$ T-лимфоцитов беременных самок СВА \times BALB/c на антигены небеременных самок СВА в однонаправленной смешанной культуре лимфоцитов.

Примечания: индекс пролиферации определялся как отношение соответствующих показателей оптической плотности для стимулированной (клетками селезенки небеременных самок СВА) и не стимулированной проб; незаштрихованные столбцы – небеременные самки СВА, заштрихованные – беременные самки СВА \times BALB/c.

* $p < 0.05$ (сопоставление с ответом Т-клеток соответствующих лимфатических узлов небеременных самок);

$a p < 0.05$ (сопоставление с ответом Т-клеток мезентериальных лимфатических узлов беременных самок СВА \times BALB/c).

В целом, полученные данные позволяют предполагать, что ассоциированная с беременностью экстрамитическая реаранжировка генов TCR приводит к появлению на периферии $\alpha\beta$ T-лимфоцитов с измененной специфичностью антигенного рецептора, которые, по-видимому, не подвергаются клональной селекции. Биологическое значение этого феномена на настоящий момент неизвестно. С одной стороны, он может быть важен для формирования толерантности материнского организма к генетически чужеродному плоду. С другой стороны, появление потенциально аутореактивных Т-клеточных клонов в результате реаранжировки генов TCR на периферии может быть причиной развития аутоиммунных заболеваний, которые, как известно, довольно часто провоцируются беременностью (Куклина, 2010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Куклина Е.М. Ревизия антигенного рецептора Т-лимфоцитов // Биохимия. 2006. Т. 71. № 8. С. 1021–1033.

Куклина Е.М. Беременность и аутоиммунитет // Российский иммунологический журнал. 2010. Т. 4 (13). № 4. С. 352–356.

Ширшев С.В., Куклина Е.М., Максимов А.Ю. и др. Экстрамитическая реаранжировка генов антигенного рецептора $\alpha\beta$ T-лимфоцитов при беременности // Биохимия. 2007. Т. 72. № 9. С. 1207–1213.

Bianchi D.W., Zickwolf G.K., Weil G.J. et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93(2). P. 705–708.

Chaouat G., Kiger N., Wegmann T.G. Vaccination against spontaneous abortion in mice // J. Reprod. Immunol. 1983. V. 5(6). P. 389–392.

Hikida M., Mori M., Takai T. et al. Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells // Science. 1996. V. 274(5295). P. 2092–2094.

Lin Y., Zeng Y., Zhao J. et al. Murine CD45+CD86+ cells isolated from para-aortic lymph nodes in an abortion-prone model // J. Reprod. Immunol. 2004. V. 64. P. 133–143.

Mincheva-Nilsson L., Kling M., Hammarstrom S. et al. Gamma delta T cells of human early pregnancy decidua:

- evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation // *J. Immunol.* 1997. V. 159. P. 3266–3277.
- O'Donoghue K., Chan J., de la Fuente J. et al.* Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy // *Lancet.* 2004. V. 364 (9429). P. 179–182.
- Robey E.A., Fowlkes B.J.* The alpha beta versus gamma delta T-cell lineage choice // *Curr. Opin. Immunol.* 1998. V. 10(2). P. 181–187.
- Vaitaitis G.M., Poulin M., Sanderson R.J. et al.* Cutting edge: CD40-induced expression of recombination activating gene (RAG) 1 and RAG2: a mechanism for the generation of autoaggressive T cells in the periphery // *J. Immunol.* 2003. V. 170(7). P. 3455–3459.
- Wegmann T.G., Hui L., Guilbert L. et al.* Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? // *Immunol. Today.* 1993. V. 14(7). P. 353–356.
- Wei X., Jing L., Meiyu G. et al.* Potentiation of T cell function by a marine algae-derived sulfated polymannuronate: in vitro analysis of novel mechanisms // *J. Pharmacol. Sci.* 2005. V. 97(1). P. 107–115.

Extrathymic Differentiation and Antigen Response of $\alpha\beta$ T Lymphocytes in Pregnancy

E. M. Kuklina, S. V. Shirshev, and N. S. Glebezdina

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Ural Branch,
ul. Goleva 13, Perm, 614081 Russia
e-mail: ibis_07@mail.ru*

Abstract—We studied reactivity of $\alpha\beta$ T lymphocytes in CBA pregnant females toward male antigens and the presence of gene rearrangement in T-cells antigen receptor in peripheral lymphoid organs of mice in the case of three breeding variants: CBA \times BALB/c (normal allogenic pregnancy), CBA \times CBA (syngenic pregnancy), and CBA \times DBA/2 (prone to abortion combination). It was shown that proliferative response of $\alpha\beta$ T lymphocytes in pregnant CBA females to male spleen cells was the most marked at normal allogenic pregnancy, the least marked at syngenic pregnancy, and was not observed at the combination CBA \times DBA/2. In addition, cells of paraaortic lymphatic nodes (draining uterus) respond to male antigen reliably more effectively than lymphocytes in mesenterial and axillary lymphatic nodes. Simultaneous estimation of recombinase RAG-1, the key enzyme in rearrangement of T-receptor genes, revealed similar principles: predominant activity of recombinase in T lymphocytes in paraaortal lymphatic nodes of CBA pregnant females. This points to the relationship between extrathymic rearrangement of antigen receptor genes and change in the antigen-detecting repertoire of these cells. The possible biological significance of the discovered phenomenon is discussed.

Keywords: $\alpha\beta$ T lymphocytes, extrathymatic differentiation, TCR gene rearrangement, antigen-detecting repertoire, combined lymphocytes culture, pregnancy.

УДК 575:57.017.6

IV СЪЕЗД ЕВРОПЕЙСКОГО ОБЩЕСТВА ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ: ОТ EVO-DEVO К НОВОМУ ЭВОЛЮЦИОННОМУ СИНТЕЗУ И ШИРОКОМАСШТАБНОМУ СРАВНИТЕЛЬНОМУ АНАЛИЗУ ПРОЦЕССОВ РАЗВИТИЯ

© 2013 г. В. В. Козин

Санкт-Петербургский государственный университет
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

E-mail: vitaly.kozin@mail.ru

Поступила в редакцию 14.08.12 г.
Окончательный вариант получен 25.10.12 г.

DOI: 10.7868/S0475145013020067

Очередная конференция Европейского Общества Эволюционной Биологии Развития (<http://evodevo.eu/conferences/2012>) – самое авторитетное собрание биологов развития, проводимое один раз в два года, – состоялась в Лиссабоне, Португалия с 10 по 13 июля 2012 г. на базе Лиссабонского Университета. В конференции приняли участие ведущие европейские и американские биологи развития, эволюционисты, специалисты по системной биологии и биоинформатике, всего около 500 человек. На съезде обсуждались актуальные вопросы клеточных и молекулярных механизмов раннего эмбриогенеза, морфогенеза, регенерации, становления плана строения в развитии и эволюции животных и растений. В торжественной обстановке была вручена медаль А.О. Ковалевского, ежегодно присуждаемая Санкт-Петербургским Обществом Естествоиспытателей (см. Ereskovsky, 2012). Лауреатом 2011 г. стал Детлев Арендт (D. Arendt, European Molecular Biology Laboratory Heidelberg, Germany), которого поздравили глава международного комитета по награждению А.В. Ересковский, председатель секции Биологии Развития СПбОЕ Р.П. Костюченко и другие участники съезда.

Всего на прошедшей конференции в рамках более 20-ти секций было заслушано около 400 докладов, чуть более половины из которых – устные. Секция “Эволюция органов и клеточных типов” стала одной из центральных и привлекла внимание подавляющего большинства участников съезда. В ее рамках доклады были сгруппированы таким образом, чтобы отразить разнообразие и возможные пути эволюции программ развития как отдельных производных эктодермы, мезодермы и энтодермы, так и зародышевых листков в целом. Д. Арендт посвятил свой доклад механизмам развития и эволюционным связям нейроэктодермы и мезодермы у животных. Про-

демонстрированный консерватизм генетических основ регионализации нервной ткани и строения нейронных сетей ЦНС у первично- и вторичноротых позволил автору сделать вывод о гомологии и едином происхождении зачатка нервной системы всех Bilateria (Denes et al., 2007; Steinmetz et al., 2011). В свою очередь, сравнивая билатеральных животных с радиально-симметричными, докладчик рассказал о новых данных по экспрессии гомеобокс-содержащих генов и элементов Delta/ Notch сигналинга в развитии актиний и полихет. Эти данные говорят о поразительном сходстве молекулярного паттернирования радиальных каналов гастральной полости у полипов и мезодермальных полосок у трохефор, что можно считать современным подтверждением теории энтероцелии Седжвика. Основываясь на методически близкой аргументации (сравнении паттернов экспрессии консервативных регуляторных генов) Г. Балва (G. Balavoine, Institut Jacques Monod – CNRS, Paris, France) выдвинул гипотезу, согласно которой параподии полихет имеют общее эволюционное происхождение с нейральными валиками зародышей позвоночных.

Вопрос происхождения и эволюции мышечных клеток был поднят в сообщении У. Технау (U. Technau, University of Vienna, Austria). Путем широкомасштабного биоинформационного скрининга в секвенированных геномах ряда протистов, растений, грибов и многоклеточных животных были идентифицированы гены ключевых элементов сократительного аппарата мышечных клеток (Steinmetz et al., 2012; Hejnal, 2012). Оказалось, что среди этих генов общим для многоклеточных животных, грибов и некоторых протистов является набор из актина, тяжелой и легкой цепи миозина, тропомиозина и кальмодулина. На основе этого консервативного набора генов и началась эволюция мышечных клеток. Кроме того,

авторы установили, что дивергенция “мышечного” и “немышечного” типа тяжелой цепи миозина произошла еще до появления Metazoa. Наконец, было показано, что в разных линиях многоклеточных животных, несмотря на сходство поперечно-исчерченных мышц на ультраструктурном уровне, набор ключевых белков в составе саркомеров сильно варьирует, что, несомненно, указывает на независимую эволюцию этих мышечных элементов у Radiata, Protostomia и Deuterostomia. С интереснейшим докладом о последовательных генерациях кишечного эпителия в развитии дрозофилы и разнообразии механизмов обновления этой ткани у животных выступил Ф. Хартенштайн (V. Hartenstein, University of California Los Angeles, USA).

Большое внимание на конференции было уделено проблеме формирования паттерна вдоль передне-задней оси. На заседании секции “Гомеозисные трансформации” Л. Холланд (L. Holland, Scripps Institution of Oceanography, University of California San Diego, USA) выступила с докладом о роли ретиноевой кислоты (RA) и секретируемых белков из суперсемейств Wnt и TGF- β в развитии переднего отдела тела ланцетника. Основываясь на комплексном анализе влияния активаторов и ингибиторов этих путей сигналинга (Yu et al., 2007; Koop et al., 2010; Onaia et al., 2010), был сделан вывод о существовании чрезвычайно сложно устроенной системы взаимодействия каскадов Wnt, BMP, Nodal, Vg1 и RA, разбалансировка которой ведет к гомеозисным трансформациям (развитии, например, головных структур на месте туловищных). Подобные нарушения могут быть обусловлены сдвигом молекулярных границ вдоль передне-задней оси. По всей вероятности, сигнальные сети Wnt, TGF- β и RA создают многоуровневую систему молекулярных координат, в подчинении у которой находятся, в том числе, и *Hox* гены. Передняя граница экспрессии этих кластерных генов, однако, не распространяется дальше задних отделов головы у хордовых (заднего мозга у позвоночных), указывая на то, что гомеозис в пределах головного отдела ланцетника происходит вследствие активности секретируемых лигандов, которые в данном случае являются регуляторами развития более высокого порядка, чем *Hox* гены. Таким образом, благодаря деятельности систем клеточного сигналинга и устанавливается идентичность разных частей и отделов тела по передне-задней оси, что, по-видимому, справедливо для весьма широкого круга объектов и процессов развития.

Об интересной и перспективной модели формирования паттерна при дупликации передне-задней оси в ходе поперечного деления у аннелид рассказал Р.П. Костюченко (Санкт-Петербургский государственный университет, Россия). При развитии зоны деления (паратомии) происходят

значительные клеточные и тканевые перестройки, посередине тела червя формируется новый головной и хвостовой отдел дочерних особей. Закладка зоны паратомии происходит не случайно, а подчиняется статистическим закономерностям, говоря о существовании некоей системы координат вдоль передне-задней оси (Kharin et al., 2006). Экспрессия ряда тканеспецифичных маркеров и генов региональных спецификаторов (*Hox*, *six3*, *otx*, *dpp/BMP*) существенно изменяется или появляется в зоне деления *de novo*. Паттерн экспрессии этих генов соответствует таковому во время эмбрионального и личиночного развития билатеральных животных, что является несомненным свидетельством эволюционного консерватизма регуляторных генных сетей развития при половом и бесполом размножении (Steinmetz et al., 2010). Поняв и научившись управлять подобными молекулярными системами, можно получать, к примеру, планарий, регенерировавший после ампутации вместо “хвоста” еще одну “голову”, о чем говорил Й. Ринк (J. Rink, Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany).

Как и у планарий, гены *Wnt* у губок играют немаловажную роль в паттернировании главной оси тела. В докладе М. Адамской (M. Adamska, Sars International Centre for Marine Molecular Biology, Bergen, Norway) этот вопрос рассматривался в сравнительном аспекте, с целью реконструировать трансформации плана строения и главной оси тела в ходе эволюции низших многоклеточных. Согласно высказанной гипотезе, предок Metazoa мог быть похож на губку с асконоидной организацией, единственная ось тела которого (как и у ныне живущих губок) паттернируется с помощью Wnt и TGF- β (*dpp/BMP*) путей сигналинга (Adamska et al., 2007, 2011). Производные этой предковой формы дали начало как современным асконоидным, сиконоидным и более сложно устроенным губкам, так и полипоидной форме кишечнополостных, уже использующих т.н. Wnt код (за неимением *Hox* кода) для регионализации тела вдоль орально-аборальной оси и белки *dpp/BMP* каскада для создания вторичной (поперечной) оси. Эти исследования тесно связаны с проблемой анимально-вегетативной поляриности и ее соответствия осям тела у губок, кишечнополостных и билатерально-симметричных животных. Хочется верить, что с применением современных подходов в скором времени удастся прояснить справедливость классических эмбриологических теорий происхождения многоклеточных животных и дивергенции их планов строения. Решение проблем именно такого масштаба ставят перед собой эволюционные биологи развития.

Появлению сложных, комплексных признаков, своего рода эволюционных инноваций были

посвящены все четыре пленарные лекции и многие приглашенные доклады прошедшей конференции. Как указывает А. Минелли (A. Minelli, University of Padova, Italy), закрепление в эволюции даже на первый взгляд неадаптивных и зачастую экстравагантных признаков может быть объяснено исключительно в контексте развития (см. Minelli, Fusco, 2008). Ярчайшим примером морфологической инновации, приобретшей исключительное функциональное значение, является возникновение рогов в некоторых семействах жуков (включая жуков-носорогов), о чем поведал А. Моцек (A. Moczek, Indiana University Bloomington, USA). Хотя природа рогов на голове у жесткокрылых до сих пор остается загадкой, интересные данные были получены относительно дорсальных грудных выростов у жуков сем. Scarabaeidae (Moczek et al., 2006; Kijimoto et al., 2012). Оказывается, развитие зачатка грудного рога начинается у поздней личинки и связано с необходимостью сбросить головную капсулу во время линьки на куколку. У многих видов жуков-скарабеев был обнаружен зачаток грудного рога, исчезающий после окукливания. Это объясняет изначальное появление рога как провизорной структуры, подобной яйцевому зубу рептилий. В нескольких докладах рассматривались изменения программы развития, которые привели к возникновению уникального плана строения тела черепах (см. Moustakas, 2008; Kuratani et al., 2011). К вопросу появления и эволюции цветка на пленарной лекции обратилась П. Радэл (P. Rudall, Kew Royal Botanic Gardens, UK).

Оживленная дискуссия о детерминантах половой плазмы — эволюционно новых генах *oskar* и *bucky ball* (см. Bontems et al., 2009; Ewen-Campen et al., 2010) — развернулась на заседании секции, посвященной клеткам полового пути. Г. Вессел (G. Wessel, Brown University, USA) рассказал об эволюционных связях мультитипентных стволовых и первичных половых клеток. Было отмечено, что белок *Vasa* может индуцировать мультитипентное состояние клеток в раннем развитии иглокожих. Этот механизм обеспечивает возможность повторной сегрегации ППК после их удаления (Voronina et al., 2008; Yajima, Wessel, 2011).

Г. Мюллер (G. Müller, University of Vienna, Austria) в своем докладе подвел некоторые итоги достижений Evo-Devo, которые принципиальным образом должны изменить синтетическую теорию эволюции (Pigliucci, Müller, 2010). В новом эволюционном синтезе следует рассматривать взаимодействие факторов среды не отдельно с фенотипом или генотипом, а с динамическими процессами развития, протекающими на молекулярном, клеточном и организменном уровне. Новый смысл приобретает и естественный отбор, материалом которого теперь служат не дефинитивные признаки, а элементы и механизмы раз-

вития. Эволюционные инновации в таком случае могут быть объяснены за счет уникальных свойств развивающихся систем, среди которых эмерджентность, способность к самоорганизации и нелинейным взаимодействиям. Все это расширит эволюционную теорию за пределы только лишь градуальных и адаптивных изменений.

Одной из отличительных черт съезда следует назвать необычайное разнообразие объектов исследований. Широкомасштабный сравнительный анализ процессов развития охватил большое число представителей каждого из известных типов животных (см. Martin-Duran, Egger, 2012). Стремительное развитие технологий секвенирования, 3D микроскопии и обработки данных *in silico* сделало возможным проводить такой анализ на молекулярно-генетическом и клеточном уровне в режиме реального времени. Концепции сравнительной эмбриологии теперь могут быть подкреплены или опровергнуты сведениями о динамике экспрессии целых семейств гомологичных генов, найденных в секвенированных геномах и транскриптомах широкого ряда близко- и дальнеродственных организмов (см. Martindale, Hejnal, 2009; Hejnal, 2010). Необходимость и далее расширять число объектов и вести тщательный отбор видов-кандидатов подчеркнул А. Хайноль (A. Hejnal, Sars International Centre for Marine Molecular Biology, Bergen, Norway), в лаборатории которого уже ведутся сравнительные исследования на гребневиках, бескишечных турбелляриях (Acoela), приапудидах, коловратках, мшанках и брахиоподах. Такой широкий подход не всегда подтверждает весьма смелые ранние Evo-Devo гипотезы касательно эволюции клеточных типов, органов и планов строения тела, но ведет к истинному пониманию причин биоразнообразия и обосновывает самоценность изучения процессов развития.

Участие в конференции было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 12-04-09366).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adamska M., Degnan S.M., Green K.M., Adamski M., Craigie A., Larroux C., Degnan B.M. Wnt and TGF- β expression in the sponge *Amphimedon queenslandica* and the origin of metazoan embryonic patterning // PLoS ONE. 2007. V. 2. № 10. P. e1031.
- Adamska M., Degnan B.M., Green K., Zwafink C. What sponges can tell us about the evolution of developmental processes // Zoology. 2011. V. 114. № 1. P. 1–10.
- Bontems F., Stein A., Marlow F., Lyautey J., Gupta T., Mullins M.C., Dosch R. Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish // Curr. Biol. 2009. V. 19. № 5. P. 414–422.
- Denes A.S., Jekely G., Steinmetz P.R.H., Raible F., Snyman H., Prudhomme B., Ferrier D.E.K., Balavoine G., Arendt D. Molecular architecture of annelid nerve

- cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria // *Cell*. 2007. V. 129. P. 277–288.
- Ereskovsky A.* Introduction to the Kowalevsky medal issue // *Evol. Dev.* 2012. V. 14. № 1. P. 1–2.
- Ewen-Campen B., Schwager E.E., Extavour C.G.M.* The molecular machinery of germ line specification // *Mol. Reprod. Dev.* 2010. V. 77. P. 3–18.
- Hejnal A.* A twist in time – the evolution of spiral cleavage in the light of animal phylogeny // *Integ. Comp. Biol.* 2010. V. 5. P. 695–706.
- Hejnal A.* Evolutionary biology: Muscle's dual origins // *Nature*. 2012. V. 487. P. 181–182.
- Kharin A.V., Zagainova I.V., Kostyuchenko R.P.* Formation of the paratomic fission zone in freshwater oligochaetes // *Russ. J. Dev. Biol.* 2006. V. 37. № 6. P. 354–365.
- Kijimoto T., Pespeni M., Beckers O., Moczek A.P.* Beetle horns and horned beetles: emerging models in developmental evolution and ecology // *WIREs Dev. Biol.* 2012. (in press).
- Koop D., Holland N.D., Semon M., Alvarez S., Rodriguez de Lera A., Laudet V., Holland L.Z., Schubert M.* Retinoic acid signaling targets *Hox* genes during the amphioxus gastrula stage: Insights into early anterior–posterior patterning of the chordate body plan // *Dev. Biol.* 2010. V. 338. № 1. P. 98–106.
- Kuratani S., Kuraku S., Nagashima H.* Evolutionary developmental perspective for the origin of turtles: The folding theory for the shell based on the developmental nature of the carapacial ridge // *Evol. Dev.* 2011. V. 13. № 1. P. 1–14.
- Martindale M.Q., Hejnal A.* A developmental perspective: changes in the position of the blastopore during bilaterian evolution // *Dev. Cell.* 2009. V. 17. P. 162–174.
- Martin-Duran J.M., Egger B.* Developmental diversity in free-living flatworms // *EvoDevo*. 2012. V. 3:7.
- Minneli A., Fusco G. (Eds.)* Evolving pathways: Key themes in evolutionary developmental biology. Cambridge: Univ. Press, 2008. 444 p.
- Moczek A.P., Cruickshank T.E., Shelby J.A.* When ontogeny reveals what phylogeny hides: gain and loss of horns during development and evolution of horned beetles // *Evolution*. 2006. V. 60. P. 2329–2341.
- Moustakas J.E.* Development of the carapacial ridge: Implications for the evolution of genetic networks in turtle shell development // *Evol. Dev.* 2008. V. 10. № 1. P. 29–36.
- Onai T., Yu J.-K., Blitz I.L., Cho K.W.Y., Holland L.Z.* Opposing Nodal/Vg1 and BMP signals mediate axial patterning in embryos of the basal chordate amphioxus // *Dev. Biol.* 2010. V. 344. № 1. P. 377–389.
- Pigliucci M., Müller G.B. (Eds.)* Evolution: The extended synthesis. Cambridge: MIT Press, 2010. 504 p.
- Steinmetz P.R.H., Kostyuchenko R.P., Fischer A., Arendt D.* The segmental pattern of *otx*, *gbx*, and *Hox* genes in the annelid *Platynereis dumerilii* // *Evol. Dev.* 2012. V. 13. № 1. P. 72–79.
- Steinmetz P.R.H., Kraus J.E.M., Larroux C., Hammel J.U., Amon-Hassenzahl A., Houlston E., Worheide G., Nickel M., Degnan B.M., Technau U.* Independent evolution of striated muscles in cnidarians and bilaterians // *Nature*. 2012. V. 487. P. 231–234.
- Steinmetz P.R.H., Urbach R., Posnien N., Eriksson J., Kostyuchenko R.P., Brena C., Guy K., Akam M., Bucher G., Arendt D.* *Six3* demarcates the anterior-most developing brain region in bilaterian animals // *EvoDevo*. 2010. V. 1:14.
- Voronina E., Lopez M., Juliano C.E., Gustafson E., Song J.L., Extavour C., George S., Oliveri P., McClay D., Wessel G.* Vasa protein expression is restricted to the small micromeres of the sea urchin, but is inducible in other lineages early in development // *Dev. Biol.* 2008. V. 314. № 2. P. 276–286.
- Yajima M., Wessel G.M.* The multiple hats of Vasa: Its functions in the germline and in cell cycle progression // *Mol. Reprod. Dev.* 2011. V. 78. P. 861–867.
- Yu J.-K., Satou Y., Holland N.D., Shin-I T., Kohara Y., Satoh N., Bronner-Fraser M., Holland L.Z.* Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer // *Nature*. 2007. V. 445. P. 613–617.

Сдано в набор @.@.@.2012 г.

Цифровая печать

Усл. печ. л. 10.0

Тираж 116 экз.

Подписано к печати @.@.2012 г.

Усл. кр.-отт. 1.2 тыс.

Зак. 237

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Уч.-изд. л. 10.0

Бум. л. 5.0

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