

	<i>Название статьи</i>	<i>Страницы</i>	<i>Цит.</i>
<b>БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ЦИТОМИКСИС И ЕГО РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ФЕРТИЛЬНОСТИ РАСТЕНИЙ</b> <i>Кравец Е.А.</i>	147	0
<input type="checkbox"/>	<b>МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН РНХРАЗ ТОПОЛЯ ЧЕРНОГО</b> <i>Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г., Князев А.В., Чемерис А.В.</i>	166	1
<input type="checkbox"/>	<b>РОЛЬ ФИТОХРОМА В ПРОЦЕССАХ ОРГАНООБРАЗОВАНИЯ У CUCUMIS SATIVUSL</b> <i>Сысоева М.И., Марковская Е.Ф.</i>	174	0
<b>МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ТКАНЕЙ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЧИСЛА ТУЧНЫХ КЛЕТОК И ЭОЗИНОФИЛОВ В КОЖЕ ЧЕЛОВЕКА</b> <i>Петров В.В., Васильева О.В., Корнилова Н.К., Гунин А.Г.</i>	179	2
<b>ЭМБРИОГЕНЕЗ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>РОЛЬ ВИМЕНТИНА В МИГРАЦИИ КЛЕТОК</b> <i>Черноиваненко И.С., Минин А.А., Минин А.А.</i>	186	1
<b>МОРФОГЕНЕЗ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>МОРФОГЕНЕЗ В СООБЩЕСТВЕ НИТЧАТЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ</b> <i>Сумина Е.Л., Сумин Д.Л.</i>	203	2

## ЦИТОМИКСИС И ЕГО РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ФЕРТИЛЬНОСТИ РАСТЕНИЙ

© 2013 г. Е. А. Кравец

*Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины*

*04123 Киев, Осиповского, д. 2а*

*E-mail: kravetshelen@gmail.com*

Поступила в редакцию 30.01.12 г.

Окончательный вариант получен 25.11.12 г.

Ультрафиолетовое и гамма-облучение проростков ячменя индуцировало рост числа патологий в мужской репродуктивной сфере растений. Большинство цитологических повреждений характеризовалось неспецифичностью. Основным типом патологии микроспорогенеза является цитомиксис, активизация которого коррелирует с гиперсекрецией каллозных отложений в стенках микроспороцитов. Отмечена негативная корреляция между цитомиксисом и стерильностью микроспор (при гамма-облучении), а также между цитомиксисом и стерильностью зрелых пыльцевых зерен (при УФ-В-облучении). Предполагается, что цитомиксис является формой клеточного (предмейотического) отбора у растений с внутриорганизменной генетической неоднородностью (мозаик). Новизна идеи состоит в том, что цитопатология, сопровождающая цитомиксис, рассматривается как механизм индуцированной гибели генетически несбалансированных или нерепарируемых клеток с целью сохранения фертильности мужской репродуктивной сферы. Включение этого механизма носит пороговый характер.

*Ключевые слова:* цитомиксис, микроспорогенез, гиперсекреция каллозы, стерильность пыльцевых зерен, клеточный отбор, мозаичность, УФ-В- и гамма-облучение, *Hordeum distichum* L.

DOI: 10.7868/S0475145013030038

Цитомиксис (ЦМ) представляет собой пространственное, хотя и неординарное, цитологическое явление, происхождение, значение и генетический контроль которого до сих остаются не вполне ясными. По-видимому, первое описание феномена цитомиксиса встречается в работе В. Арнольди (Arnoldi, 1900) по изучению процесса оплодотворения у голосеменных (*Pinus cembra*, *P. peuce*, *P. montana* и *Abiessibirica*). Он описал цитомиксис в эндосперме и стенке архегония как межклеточное перемещение ядер внутри тканей и проникновение ядер эндосперма в цитоплазму яйцеклетки. Годом спустя, цитомиксис был описан М. Кернике в микроспороцитах у *Crocus vernus* (Körnigke, 1901) и Г. Мейхе в эпидермальных тканях *Allium nutans* (Miehe, 1901). Эти исследователи считали цитомиксис артефактом фиксации или травматического вмешательства. Еще через несколько лет, Л. Дигби (Digby, 1909) у *Galtonia candidans* и Р. Гейтс у *Oenothera gigas* (Gates, 1911)

описали перемещение хроматина по цитоплазматическим каналам, соединяющим микроспороциты как спонтанный естественный клеточный процесс. Однако в большинстве ранних и более поздних работ цитомиксис все же рассматривался как патологическое явление (Fraser, 1914; Woodworth, 1931; Morisset, 1978), артефакт фиксации или травматического вмешательства (Takats, 1959; Tarkowska, 1965, 1966), или результат влияния неблагоприятных факторов среды (Naran, 1980; Basavaiah, Morthy, 1987; Soman, Bhavanandan, 1993). Было замечено, что ЦМ (наряду со слиянием микроспороцитов в синцитии) свойственен гибридам (Novwa, 1928; Levan, 1941; Ster, 1946). Между тем, Гейтс, систематизировавший это явление и предложивший термин “цитомиксис”, считал его спонтанным нормальным клеточным процессом (Gates, 1911; Gates, Rees, 1921).

До настоящего время среди исследователей так и не существует однозначного мнения относительно природы и значения ЦМ (de Souza, Pagliarini, 1997; см. обзор Кравец, 2012). Одни рассматривают его как нормальное, но нерегулярное цитологическое явление, сопровождающее микроспорогенез у многих видов покрытосеменных (Gates, 1911; Gates, Rees, 1921, Cheng, Wang, 1956; Servella, 1958; Bahl, Tyagi, 1988; Dagne, 1994), другие склоняются к мысли о его патологической природе. Третьи считают ЦМ нормальным процессом межклеточного взаимодействия, который свойственен многим вегетативным и генеративным тканям растений, и в ходе которого происходит движение и перемещение ядерного материала, клеточных органелл, сигнальных молекул и трофических факторов (Heslop-Harrison, 1966a, 1966b; Zheng et al., 1987; Bellucci et al., 2003; Guo, Zheng, 2004; Ван и др., 2004; Кунах, 2005, 2011; Liu et al., 2007).

Широкая распространенность точки зрения о патологической природе ЦМ основана на его свойственности растениям с выраженной генетической нестабильностью и нарушенным гомеостазом: гаплоидам, анеуплоидам, триплоидам, полиплоидам, инцухтированным линиям, регенерантам, гибридам, мутантам, апомиктам (Камга, 1960; Шкутина, Хвостова, 1966; Романов, Орлова, 1971; Поддубная-Арнольди, 1976; Кравченко, 1977; Mantu, Sharma, 1982; Singhal, Gill, 1985; Шнайдер, 1988; Bedi, 1990; Орлова, 1994; Стельмах и др., 2005; de Oliveira et al., 2004; Lattoo et al., 2006; Сидорчук и др., 2007; Kumar, Singhal, 2008; Singhal, Kumar, 2008; Singhal et al., 2010; Мурсалимов, 2012). Полагают, что ЦМ может свидетельствовать об отдаленности и несовместимости геномов гибридов (Шкутина, Хвостова, 1966; Шкутина, Козловская, 1974), наличии мутаций, в том числе связанных с мужской стерильностью (Nirmala, Kaul, 1994). Деструктивное начало цитомиксиса, как правило, усиливают стрессовые факторы – гибридизация, инцухтирование, физические факторы и химические агенты (например, колхицин), облучение и гербициды (Поддубная-Арнольди, 1976; Кравченко, 1977; Bobak, Herich, 1978; Narain, 1980; Zheng et al., 1987; Dwivedi et al., 1988; Bedi, 1990; Остапенко др., 1993; Гродзинский и др., 1996; Grodzinsky et al., 1997, 2007; Souza, Pagliarini, 1997; Bellucci et al., 2003; Kumar, Singhal, 2008, 2011; Кравец, 2009, 2012).

Возникновение цитомиксиса некоторые ученые связывают с абберациями на предшествующих мейозу митозах, что может приводить к нарушению мейотической сегрегации хромосом. Поэтому генетический контроль регуляции цитомиксиса может осуществляться теми же генами, которые ответственны за сегрегацию хромосом в мейозе (Mantu, Sharma, 1983; Yen et al., 1993), как например *DIF1* у *Arabidopsis thaliana* (Bhatt et al., 1999). Многие исследователи считают, что ЦМ вносит определенный вклад в формообразовательный процесс, увеличивает генетическую гетерогенность – влияет на уровень пloidности, миксоплоидии и гетерозиготности, имеет адаптивную значимость (Zheng et al., 1987; Sapre, Deshpande, 1987; Шнайдер, 1988; Falistocco et al., 1995; Kumar, Singhal, 2008, 2011; Мурсалимов, Дейнеко, 2009; Singhal et al., 2010; Malallah, 2011; Кунах, 2005, 2011).

Нет единого мнения и о последствиях цитомиксиса. Большое количество данных указывают на то, что ЦМ усложняет картину мейоза и может приводить к серьезным генетическим последствиям: генетическому дисбалансу микроспороцитов, образованию синцитиев, цитопластов, полиад, анеуплоидии и полиплоидии микроспор, полиморфизму и стерильности пыльцевых зерен (Поддубная-Арнольди, 1976; Narain, 1980; Bedi, 1990; Singhal, Gill, 1985; Орлова, 1994; Falistocco et al., 1995; Lattoo et al., 2006; Сидорчук и др., 2007; Singhal, Kumar, 2008; Kumar, Singhal, 2008; Singhal et al., 2010). Вместе с тем, у стабильных генотипов, в частности лилии, в период наибольшей “транзиторной” активности хроматина – зиготене–пахитене профазы мейоза при полностью открытых межклеточных каналах – ядерная мембрана оставалась интактной, а микроспороциты, как до, так и после “ядерных миграций” (nuclear transfer), сохраняли нормальное диплоидное число хромосом (Zheng et al., 1987). В недавних публикациях было показано, что в микроспорогенезе у полиплоидных линий табака (3n, 4n) не только ядерная мембрана микроспороцитов при миграции хроматина остается интактной, но и сам “транзиторный” хроматин при перемещениях не повреждается (Mursalimov, Deineko, 2012; Мурсалимов, 2012).

В структурном и физиологическом аспектах первопричиной цитомиксиса в микроспороцитах считали неполное формирование клеточных пе-

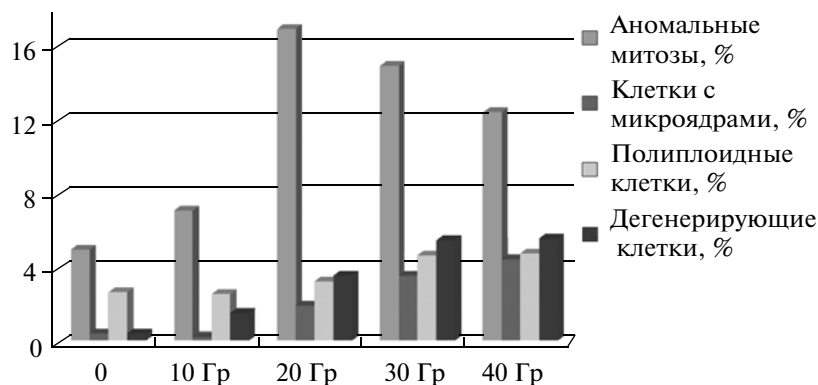
регородок и образование цитомиктических каналов между клетками (Heslop-Harrison, 1966a, b; Risueno et al., 1969; Welan, 1974). Обычно наибольшая цитомиктическая активность наблюдается в ранней профазе мейоза — лептотене—зиготене, хотя цитомиктические каналы могут функционировать или образовываться заново вплоть до завершения мейоза. По цитомиктическим каналам, кроме хроматина, перемещаются органеллы, трофические факторы, сигнальные молекулы, в частности, факторы регуляции клеточного цикла и хромосомной сегрегации в мейозе (Heslop-Harrison, 1966a, b; Welan, 1974; Yen et al., 1993; Herrero, 2003; Guo, Zheng, 2004; Ван и др., 2004; Мурсалимов и др., 2010; Mursalimov, Deineko, 2012). Благодаря межклеточным каналам достигаются однородность клеточной популяции микроспороцитов, синхронизация мейоза, а также выравнивание качественного состояния пыльцевых зерен, необходимое для быстрого и успешного опыления (Heslop-Harrison, 1966a, 1966b; Zheng et al., 1987; Kwiatkowska, 2003; Guo, Zheng, 2004). В частности, Гуо и Зэнг (Guo, Zheng, 2004) полагают, что одна из функций ЦМ связана с элиминацией гетерогенности мужских гамет (в отношении транскрипции, уровня мРНК и белков), снижающей их качество и синхронность развития. Однако такой взгляд на роль цитомиксиса вступает в противоречии с его формообразующей функцией, увеличивающей степень генетического разнообразия и гетерозиготности микроспороцитов.

Сходные с цитомиксисом явления наблюдаются и при сперматогенезе у низших растений и животных и овогенезе животных. У низших растений цитоплазматические каналы сохраняются в течение всего сперматогенеза до поздних этапов дифференциации сперматозоидов (Rezaglia, Garbary, 2001; Kwiatkowska, 2003). У животных межклеточные мосты (так называемые “intercellular bridges” или “ring canals”) образуются в ходе первого митотического деления сперматогониев и сохраняются на протяжении нескольких предмейотических митозов, мейоза вплоть до последних стадий спермиогенеза (Carlson, Handel, 1988; Necht, 2000; Ventela et al., 2003). Число цитоплазматических каналов в синцитиально связанных группах клеток определяет, как полагают, направленную дифференцировку гамет. У покрытосеменных растений спермии и вегетативное ядро в пыльцевом зерне и пыльцевой трубке образуют

ассоциацию (male germ unit), в которой остаются связанными между собой межклеточными каналами (Dumas et al., 1985; Russel, 1991; Mogensen, 1992). Следовательно, цитомиксис сопровождает дифференциацию клеток половых путей и гаметогенез у растений и животных, обеспечивая информационный контакт между клетками. Наконец, исследования на живом материале фертильной трансгенной линии табака 2В-СФР показали, что в интактных тканях корневого апекса, эпидермисе листьев, тканях пыльника и завязи происходят активные межклеточные перемещения ядерного материала и цитоплазматических органелл, никак не связанные ни с травматическим вмешательством, ни фиксацией или другими негативными воздействиями (Liu et al., 2007). Учитывая все вышесказанное, цитомиксис можно характеризовать как широко распространенное и неоднозначное явление цитологического, генетического, физиологического и информационного характера, свойственное вегетативным и генеративным тканям как в норме, так и при патологии, и усиливающееся при воздействии стрессовых факторов разной природы. Активность и морфологическая картина цитомиксиса варьируют в широких пределах. Патологическая природа цитомиксиса проявляется у растений с выраженной генетической нестабильностью и нарушенным гомеостазом. Однако цитопатологию, которая сопровождает цитомиксис у этих растений, можно рассматривать и с точки зрения индукции клеточной гибели генетически несбалансированных или нерепарируемых микроспороцитов. Одним из путей в таком подходе является использование мутагенных факторов, в частности, радиации. Целью данного исследования было изучение влияния УФ-В и гамма-облучения на мужскую репродуктивную систему, анализ дозовых зависимостей индукции цитомиксиса, корреляции между цитомиксисом и фертильностью микроспор и пыльцевых зерен и, как следствие, оценка роли цитомиксиса в репродуктивном потенциале растений.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования — ячмень двурядный (*Hordeum distichum* L.,  $2n = 14$ ), сорт Скарлет французской селекции. Воздушно сухие зерновки облучали на гамма-установке “Исследователь”, а трехсуточные проростки — ультрафиолетовой лампой *Philips TL 20 W* (используя свето-



**Рис. 1.** Дозовые зависимости индексов различных цитопатологий в корневой меристеме проростков ячменя после гамма-облучения сухих семян; по оси  $x$  – доза гамма-облучения, по оси  $y$  – уровень патологий, %.

фильтр, отсекающий коротковолновой участок спектра). Дозы гамма-облучения составляли 10, 20, 30 и 40 Гр при мощности  $3.3 \text{ сГр мин}^{-1}$ , УФ-В – 0.5, 2.2 и 4.3  $\text{кДж/м}^2$  при интенсивности  $0.5 \text{ Вт/м}^2 \text{ сек}$ . После тестирования ростовых и цитогенетических параметров (рис. 1) для дальнейшей работы были отобраны две дозы гамма-облучения – 20 и 40 Гр. Через сутки после облучения проростки высаживали в грунт для изучения развития репродуктивных органов. Фиксацию колосьев проводили от стадии дифференциации спорогенной ткани до созревания пыльцы. Для фиксации использовали смесь Навашина, окраски временных препаратов – ацетокармин. Свежие пыльники окрашивали смесью флуоресцентных красителей: анилинового голубого, флуоресцеина, пропидиума йодида и DAPI (AB + FDA + PI + DAPI) в следующих концентрациях: AB  $2.5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ , FDA  $2.5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ , PI  $1.0 \text{ }\mu\text{g/mL}$ , DAPI  $0.5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ; затем отмывали в фосфатном буфере и помещали в раствор сахарозы (15%). Свежеприготовленные препараты анализировали с помощью ультрафиолетового микроскопа (Axiostar, Carl Zeiss, Germany). После просмотра в ультрафиолете (в спектре поглощения длины волны в  $461 \text{ нм}$  – для DAPI и анилинового голубого и  $617 \text{ нм}$  – для флуоресцеина и пропидиума йодида) препараты визуализировали ацетокармином для анализа в видимом участке спектра.

Степень активности ЦМ определяли по числу охваченных цитомиксисом микроспороцитов (посредством хроматиновых петель и мостов) в поле зрения. Объем выборок при анализе мейоза и тетрад микроспор составлял около 20 пыльни-

ков на стадию. Для каждого варианта было исследовано в среднем 50–70 пыльников с микроспороцитами и по 20 пыльников для анализа развития пыльцевых зерен. Статистическую обработку данных проводили с использованием функций программы Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Микроспорогенез*

Микроспорогенез проходит по свойственному злакам сукцессивному типу с образованием тетрад изобилатерального строения (Батыгина, 1974; Поддубная-Арнольди, 1976; и др.). Особенностью злаков является однослойное расположение микроспороцитов (МСЦ) вдоль поверхности тапетума (Романов, 1970; Батыгина, 1974). МСЦ обычно лежат вдоль тапетума плотно сомкнутыми рядами, однако некоторые из них в процессе роста сдавливаются и утрачивают контакты с клетками тапетума и соседними клетками микроспороцитов, вытесняясь в полость пыльника. Такие МСЦ, как правило, запаздывают или останавливаются в развитии, но иногда могут вступать в мейоз и завершать свое функционирование. Таким способом, по-видимому, регулируется избыточность МСЦ (см. ниже). В начале профазы мейоза на стадии лептотены на клеточных стенках МСЦ начинается отложение каллозы. В норме в ходе микроспорогенеза синтез каллозы прогрессирует, достигая максимума на стадии формирования тетрад микроспор (Батыгина, 1974; Поддубная-Арнольди, 1976; Pacini, 1994; Nishikawa et al., 2005). В дальнейшем под воздействием каллазы происходит растворение каллозных оболочек и освобождение микроспор из тетрад.

Основным типом патологии в микроспорогенезе при воздействии ультрафиолетовой и гамма-радиации является цитомиксис. По активности его целесообразно подразделять на слабый (локальный), интенсивный и деструктивный (патологический) (Кравченко, 1977). Локальный цитомиксис не сопровождается характерной для цитомиксиса (в привычном понимании этого термина) цитопатологией. Морфологическая картина локального цитомиксиса выражается в объединении МСЦ в ранней профазе мейоза в группы с помощью цитомиктических каналов (без участия “блуждающего” хроматина). Интенсивный цитомиксис характеризуется типичной цитопатологией через появление в профазе и последующих фазах мейоза “блуждающего”, или транзитного, хроматина, его “текучести” в виде тяжей, фрагментов ядра, хромосом и микроядер, а также разрушенных клеток, ядер и активизации цитолитических процессов. Деструктивный цитомиксис – патологический процесс, охватывающий почти все содержимое пыльника или большую его часть (особенно дистальную часть микроспорангия). Для него характерно разрушение подавляющего большинства клеток и ядер МСЦ, заполнение полости пыльника агглютинированным хроматином и нарушения в ходе мейоза сохраняющихся микроспороцитов. Деструктивный цитомиксис, по сути, является не столько способом коммуникации МСЦ, как сколько способом их автолиза. Иногда активизацию цитомиксиса (переход от интенсивного к деструктивному) можно наблюдать в направлении продольного градиента внутри одного и того же микроспорангия.

#### *Контроль. Локальный цитомиксис*

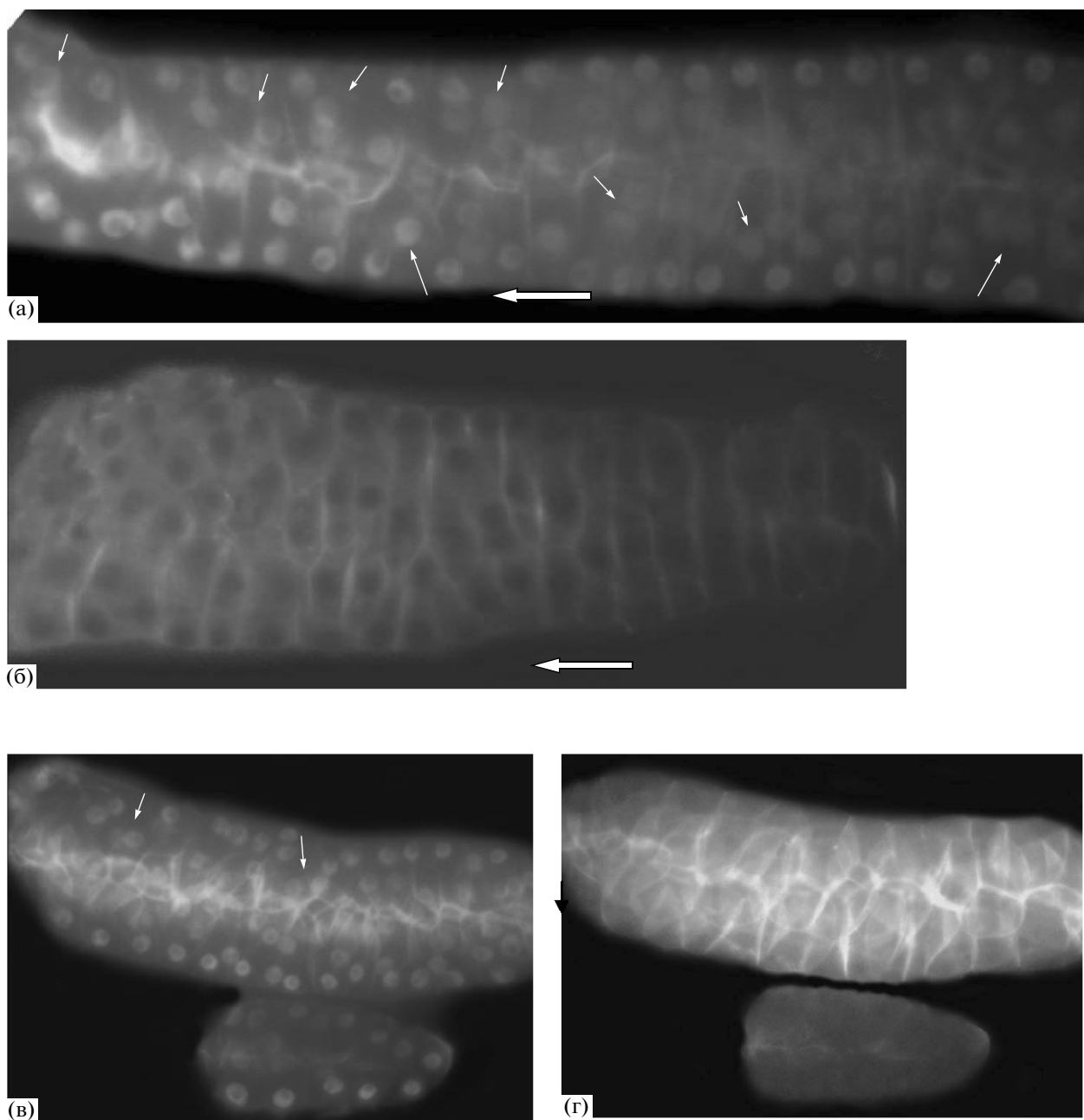
У контрольных растений в премейотической интерфазе и ранней профазе мейоза МСЦ часто объединяются парами или группами, формируя цепочки из соединенных в поперечном направлении относительно продольной оси микроспорангия клеток. В лептотене–зиготене петли хроматина образуют “протуберанцы”, которые иногда заходят в цитоплазматические каналы. Такие контакты не влекут за собой негативных последствий. МСЦ в ходе мейоза сохраняют тесные контакты с клетками тапетума. Со стороны тапетума каллоза в МСЦ обычно не откладывается. На противоположной стороне МСЦ, обращенной к

полости микроспорангия, формируются утолщения каллозы – так называемые, каллозные гребни. Следом за профазой, последующие фазы мейоза проходят без нарушений с образованием правильных тетрад микроспор. Локальный цитомиксис мы не оценивали как нарушение. Интенсивный и деструктивный цитомиксис в нормально развитых колосьях и колосках не встречались.

#### *Воздействие УФ-В и гамма-облучения. Интенсивный цитомиксис*

В вариантах с УФ и гамма-облучением, наряду с локальным, наблюдается интенсивный цитомиксис, который проявляется в возрастании активности и временной протяженности цитомиксиса. Как отмечалось выше, переход от локального к интенсивному цитомиксису может происходить и в пределах одного и того же пыльника (рис. 2а, 2б). Возрастание активности цитомиксиса часто сопровождается потерей контактов МСЦ с клетками тапетума, продвижением их вглубь микроспорангия и появлением мощных каллозных отложений на поверхности МСЦ (рис. 2а–2д). По-видимому, возрастание активности цитомиксиса, потеря контактов МСЦ с клетками тапетума и гиперсекреция каллозы – процессы, которые коррелируют между собой. Гиперсекреция каллозных отложений была характерна для МСЦ во всех вариантах опытов. Группы поврежденных МСЦ, охваченные интенсивным или деструктивным цитомиксисом, отделяются и “запечатываются” в пыльнике каллозными отложениями (каллозными пробками) (рис. 2д, 2е).

Интенсивный цитомиксис характеризуется типичной “ядерной” патологией: в МСЦ появляется “липкость” или “текучесть” хроматина, возникает “блуждающий”, или транзитный хроматин, в виде тяжей, перетекающих фрагментов ядра, хромосом, микроядер (рис. 3а–3г). Цитомиктическая активность иногда проявляется еще до начала мейоза в ходе последних митотических делений спорогенных клеток, а также в премейотической интерфазе и продолжается в течение всего последующего хода мейоза (рис. 3б, 3в). Наличие у ячменя микроядер в МСЦ, появление которых связано с цитомиктической активностью спорогенных клеток, не препятствовало их вступлению в мейоз. Аналогично, у пшеницы микроядра смещались в периферическую цитоплазму МСЦ и, по-видимому, выталкивались из клетки



**Рис. 2.** Гиперсекреция каллозы в профазе 1-го деления мейоза в микроспорогенезе: а, б – градиент отложения каллозы, совпадающий с градиентом активизацией цитомиксиса в микроспорангии (стрелками указаны микроспороциты, утратившие контакты с тапетумом и соединенные между собой; внизу стрелкой – направление градиента активности цитомиксиса); в, г – нормальный процесс отложения каллозы (нижний фрагмент пыльника) и усиленный, совпадающий с активизацией цитомиксиса (верхний пыльник) (стрелками указаны микроспороциты, потерявшие контакт с тапетумом); д – нормальные микроспороциты (указаны белыми стрелками в верхней части пыльника) и микроспороциты, потерявшие контакт с тапетумом (нижняя часть пыльника) (черными стрелками указаны области каллозных отложений); е – “запечатывание” каллозой микроспороцитов, подвергающихся автолизу (черными стрелками указаны синцитии, белой – нормальные микроспороциты); окраска смесью флуоресцентных красителей, микроскопия в разных спектрах поглощения УФ; а–г – УФ-В 4.3 кДж/м<sup>2</sup>; б, д – гамма облучение, 20 и 40 Гр; е – деструктивный цитомиксис в колосьях подгонов. Окраска смесью флуоресцентных красителей.

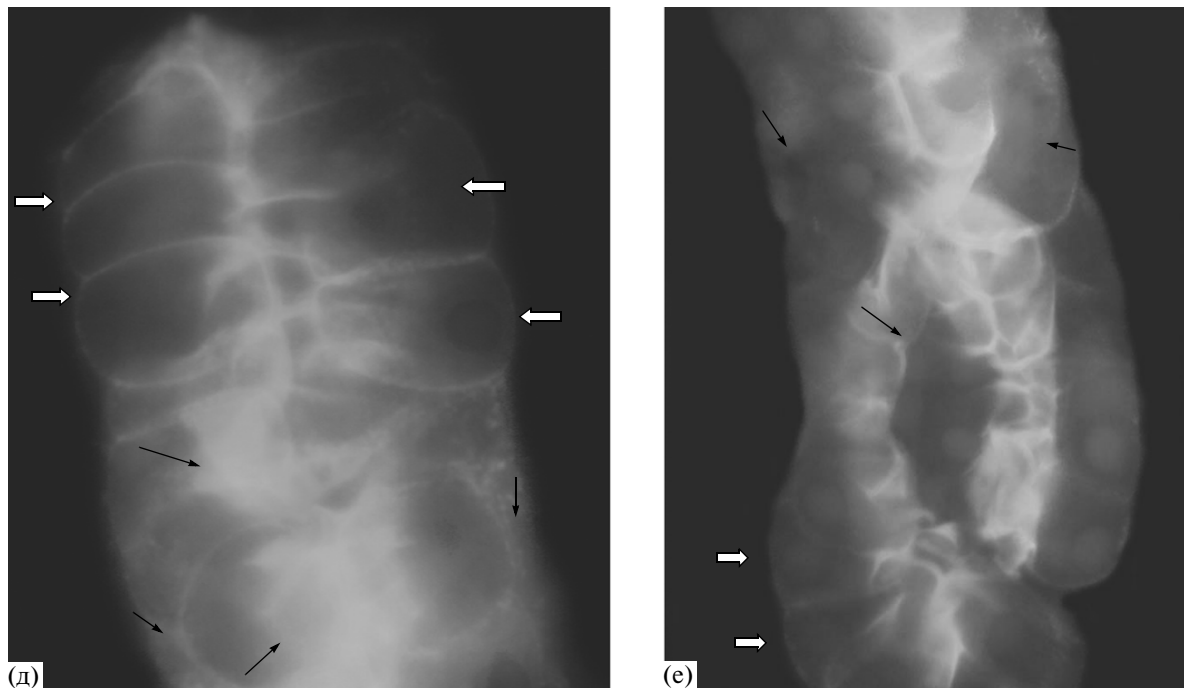


Рис. 2. Окончание.

до конца профазы мейоза (Гродзинский и др., 1996; Grodzinsky et al., 2007).

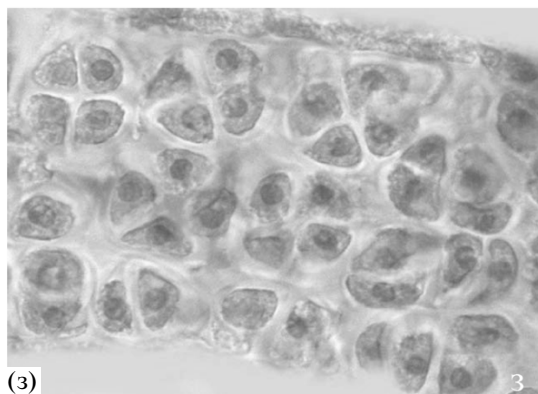
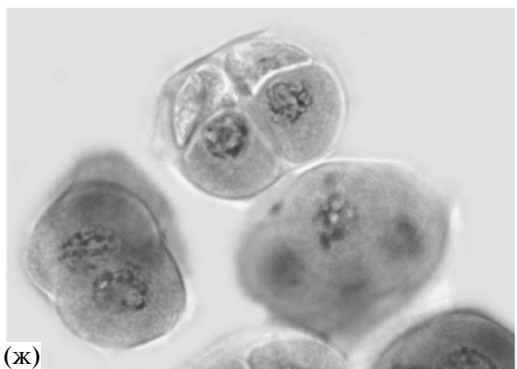
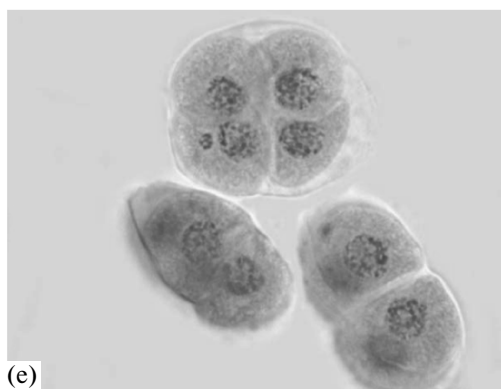
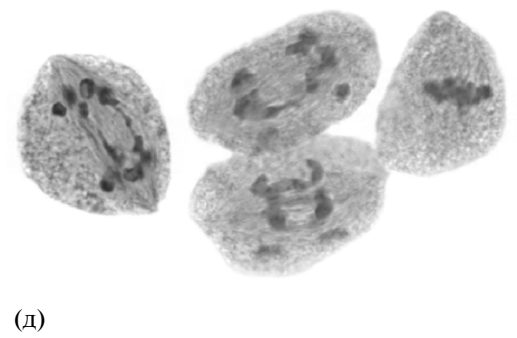
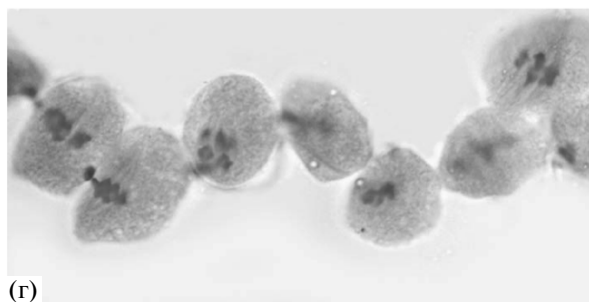
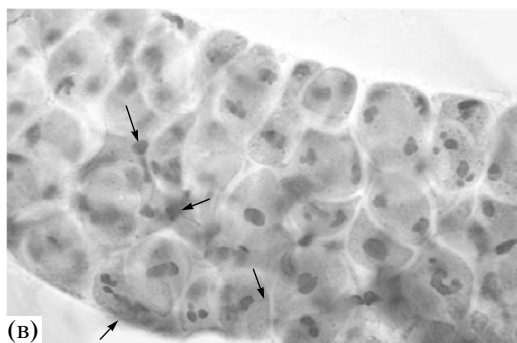
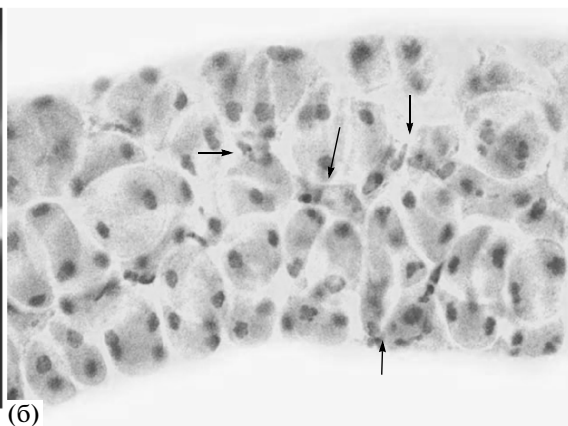
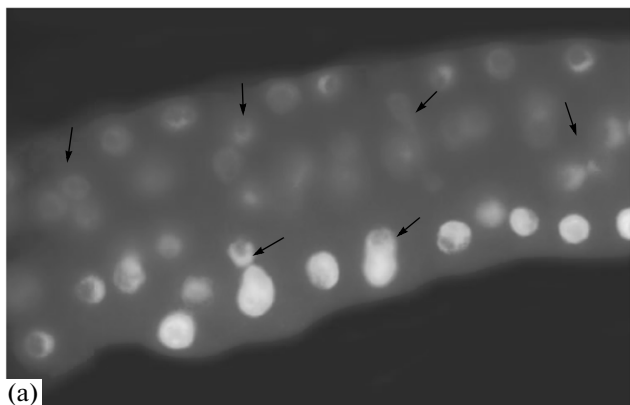
В поздней профазе мейоза в ядрах некоторых МСЦ часть хромосом обособливалась и слипалась. Возможно, именно эти хромосомы отторгались и в дальнейшем мигрировали по клеткам. В метафазе “транзиторный” хроматин иногда перетекал по одиночным, реже двойным мостам, в виде тяжей, отдельных хромосом или микроядер от клетки к клетке. Интенсивный ЦМ охватывал соседние клетки, часто, продольные группы МСЦ, усложняя и задерживая прохождение фаз мейоза (рис. 3г). “Транзиторный” хроматин, по-видимому, не включается в состав ядра клеток, через которые мигрирует, хотя, может влиять на спорогенез. Полагают, что он отторгается клеткой-реципиентом путем заложения перегородок с образованием мелких клеток (Романов, Орлова, 1971; Tarkowska, 1973). В последующем ходе мейоза встречались аномалии (мосты, униваленты, фрагменты), указывающие на образование хромосомных aberrаций (рис. 3д). У ячменя основная масса сверхкомплексного и мигрирующего хроматина оставалась в межклеточном пространстве или в составе дегенерирующих микроспорозитов (рис. 3б, 3в).

Биохимические причины появления “липкости” хромосом связывают с дефектом функционирования одного или двух типов специфических негистоновых белков (ДНК-топоизомеразы II и периферических белков), которые необходимы для сегрегации хроматид (Gaulden, 1987). Изменение функционирования этих белков вызваны мутациями в структурных генах или непосредственным воздействием мутагенов на эти белки. Липкость хромосом, как полагает автор, является причиной хромосомных aberrаций вследствие физического растяжения и разрывов хроматид при расхождении в анафазе.

Большая часть МСЦ во всех вариантах опыта заканчивала мейоз с образованием правильных, реже, генетически несбалансированных тетрад (рис. 3е–3з). Следует заметить, что интенсивный цитомиксис — организованный, а никак не хаотичный процесс, в ходе которого, в целом, сохраняется порядок прохождения мейоза и не нарушаются функции мейотического аппарата деления.

У исследуемого генотипа ячменя цитомиксис охватывал около 20% МСЦ при максимальной дозе УФ облучения и до 23% при гамма-воздействии. Дозовые зависимости индукции цитомиксиса в микроспорогенезе характеризовались не-





линейностью (рис. 4а–4г). Цитомиксис заметно усиливался при максимальной дозе УФ-В – 4.3 кДж/м<sup>2</sup>; а при 20 Гр активность ЦМ была выше, чем при 40 Гр. Между активностью цитомиксиса и частотой патологий в тетрадах микроспор наблюдалась положительная корреляция (0.4–0.6). Следовательно, цитомиксис может быть причиной образования несбалансированных тетрад, однако оба эти типа нарушений могут быть и следствием другой, общей причины – мутагенеза, индуцированного воздействием радиации.

#### *Деструктивный цитомиксис*

Деструктивный цитомиксис встречался в контроле и во всех вариантах опыта вне связи с воздействием облучения в используемом диапазоне доз. Он наблюдался в редуцированных пыльниках недоразвитых колосков и в колосьях подгонов. Вероятно, его появление связано с нарушением трофики развивающегося пыльника, что, в свою очередь, могло индуцироваться высокими температурными условиями среды. Деструктивный цитомиксис характеризуется, как отмечалось, появлением большого количества “неорганизованного” и агглютинированного хроматина в полости пыльника, гиперсекрецией каллозы, образующей мощные отложения, и множественными нарушениями в прохождении мейоза (рис. 5а, 5б). Причем, число нарушений по мере прохождения мейоза обычно возрастало. Вследствие этого, количество нормальных тетрад микроспор и фертильной пыльцы в таких пыльниках было резко сниженным (рис. 5в, 5г). Как отмечает Кравченко (1977), и мы разделяем эту точку зрения, деструктивный ЦМ может служить формой устранения нежизнеспособной или ненужной клеточной системы.

#### *Развитие пыльцевого зерна (ПЗ)*

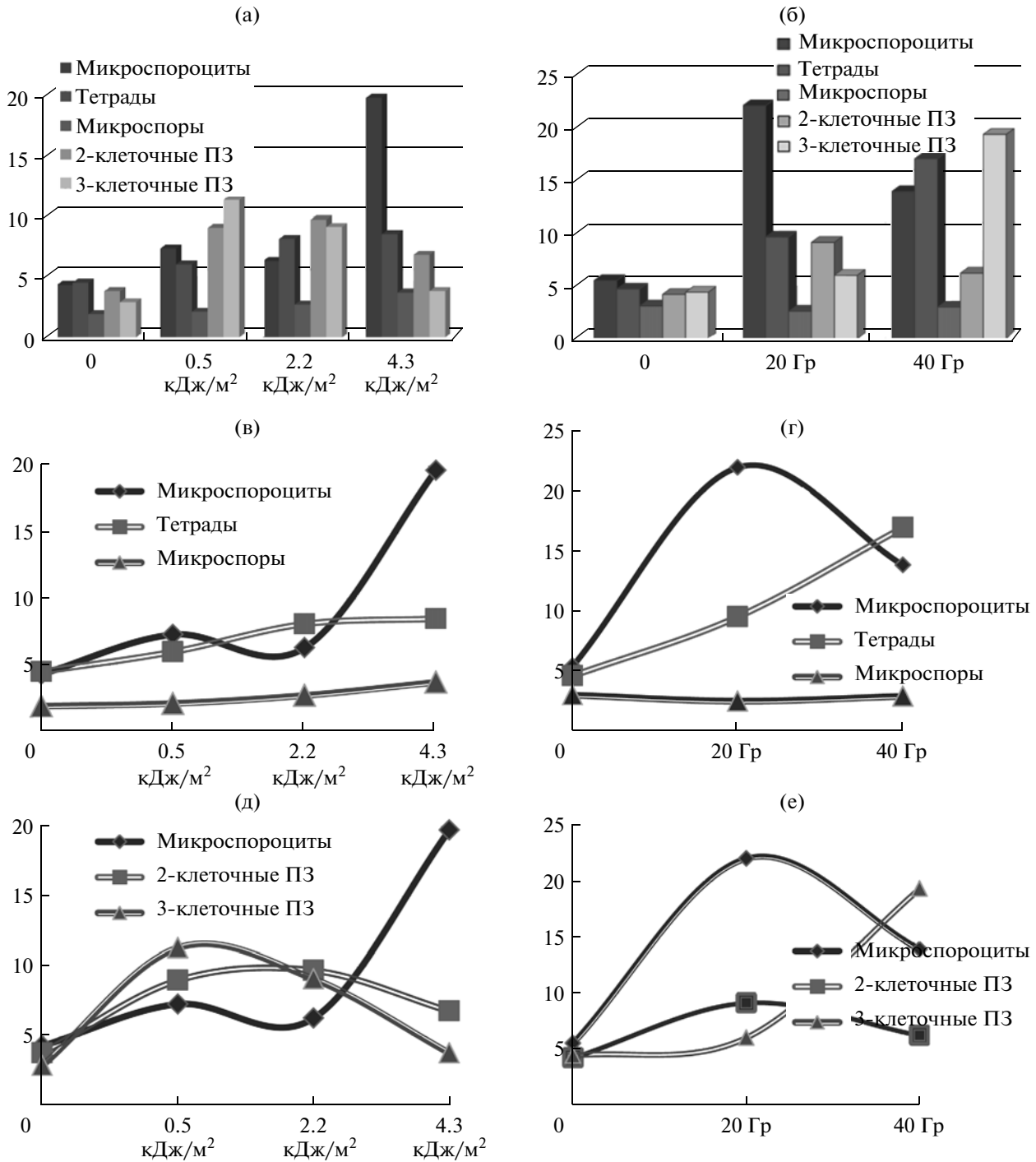
В норме развитие мужского гаметофита у ячменя, как и у большинства злаков, начинается с этапа освобождения микроспоры из оболочки

микроспороцита и включает в себя этапы завершения формирования спородермы, роста и поляризации микроспоры (Романов, 1970; Батыгина, 1974; и др.). Затем следует первый асимметричный митоз, поляризация двухклеточного ПЗ, второе митотическое деление, которые сопровождаются синтезом цитоплазмы, а затем, и отложением запасных веществ в цитоплазме вегетативной клетки (Романов, 1970; Батыгина, 1974; Поддубная-Арнольди, 1976; Mascarenhas, 1989; и др.). Зрелое ПЗ содержит пару стреловидных спермиев и ядро вегетативной клетки, цитоплазма которой заполнена амилопластами (рис. 6а).

Большинство нарушений микрогаметогенеза при УФ- и гамма-облучении характеризовались неспецифичностью: возрастали гетерогенность ПЗ по размерам, частота изменения полярности микроспоры и двухклеточного ПЗ, “рассинхронизация” их развития в пыльцевой камере, увеличивался процент “малоплазменных” ПЗ (рис. 6б–6в). Так, нарушение поляризации микроспоры приводило к изменению ориентации оси деления в ходе первого митоза и образованию пары симметричных ядер или клеток вместо разновеликих генеративной и вегетативной клеток (рис. 6г).

Как отмечалось нами в более ранних работах (Гродзинский и др., 1996; Grodzinsky et al., 1997, 2007), гамма-облучение может индуцировать и специфические нарушения микрогаметогенеза, связанные с поздней инактивацией спермиев в ПЗ. В этом случае пыльцевые зерна нормальной морфологии содержали дегенерирующие (скрученные и агглютинированные) спермии (рис. 6д), что, возможно, было обусловлено их генетической несбалансированностью. Причины появления “малоплазменных” ПЗ связаны с нарушением синтеза цитоплазмы в микроспоре или вегетативной клетке. Полагают, что нарушение синтеза цитоплазмы – следствие мутации специфических генов ПЗ, экспрессия которых усиливается после первого митоза, или мутации, обуславливающей мужскую цитоплазматическую стерильность (Mascarenhas, 1990; Nirmala, Kaul, 1994). Спермии

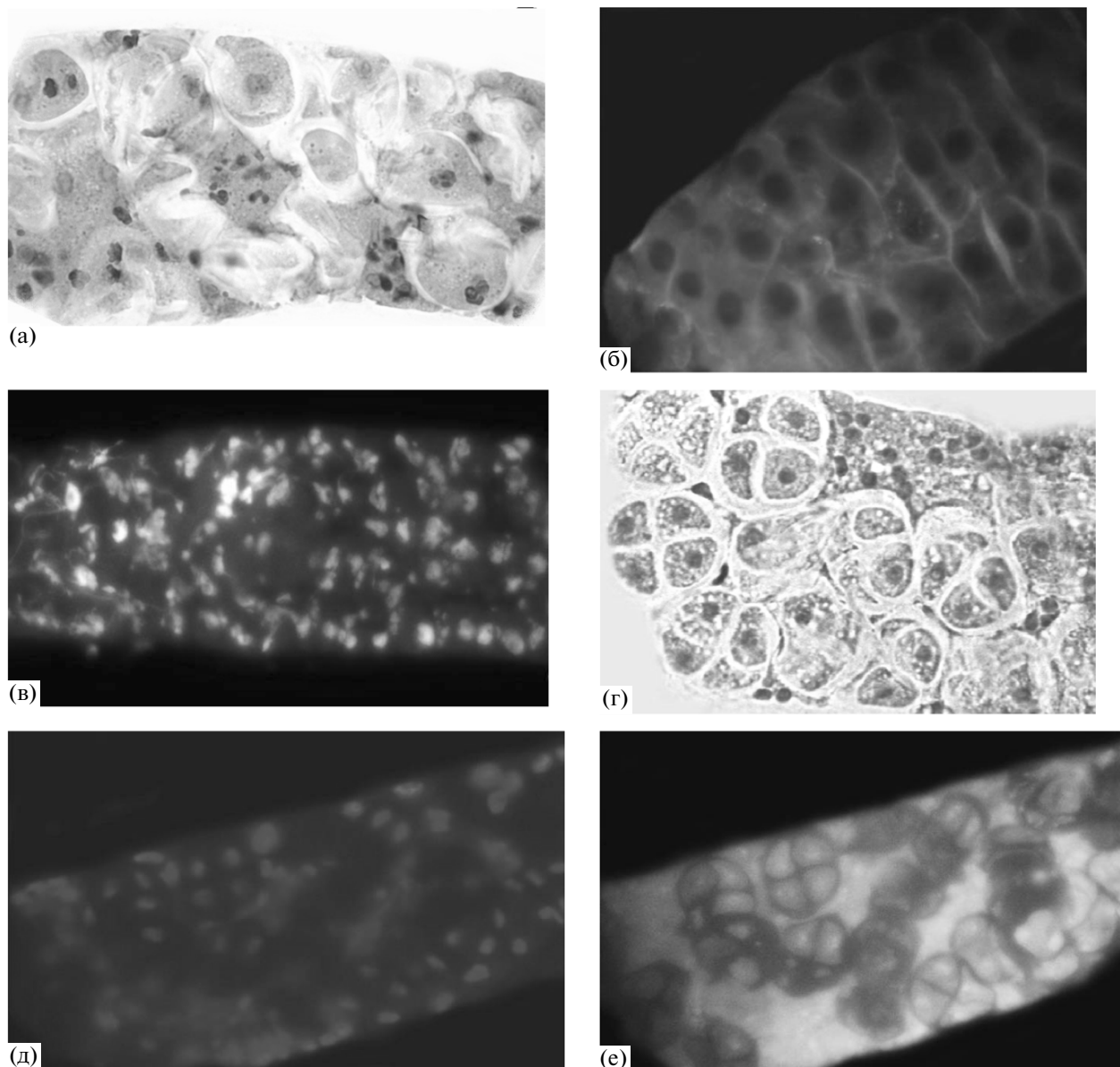
**Рис. 3.** Микроспорогенез. Интенсивный цитомиксис: а – профазы I (стрелками указаны микроспороциты, утратившие контакты с тапетумом и объединившиеся в группы) (2.2, 4.3 кДж/м<sup>2</sup>), б–в – телофазы II (4.3 кДж/м<sup>2</sup>) (стрелками указана локализация “блуждающего” хроматина в межклеточном пространстве и в составе дегенерирующих микроспороцитов); г – группировка микроспороцитов в продольном направлении (вдоль продольной оси микроспорангия) в метафазе I (20 Гр); д – метафаза I, образование мостов, ацентрические фантомы (40 Гр); е, ж – нормальные и несбалансированные тетрады микроспор (40 Гр и 4.3 кДж/м<sup>2</sup>); з – пыльник с тетрадами микроспор (20 Гр); а – окраска DAPI, б, в, з – визуализация ацетокармином, г–ж – окраска ацетокармином.



**Рис. 4.** Дозовые зависимости индукции различных цитопатологий на последовательных этапах развития пыльника: а, в, д – дозовые зависимости количества нарушений после УФ-В облучения; б, г, е – дозовые зависимости количества нарушений при гамма-облучении; по оси x – доза радиации, по оси y – уровень патологий, стерильности ПЗ, %.

в “малоплазменных” ПЗ останавливались в развитии, не заканчивая своей дифференцировки. По морфологическим признакам дегенерация ядра микроспоры, генеративной клетки, спермиев и ядра вегетативной клетки в ПЗ осуществлялась по типу апоптоза (рис. 6е). Действительно, экспозиция

УФ-В, также как и гамма-облучение, может инициировать апоптозные процессы в растительных клетках (Lytvyn et al., 2010). Пыльцевая продуктивность, или наполненность пыльников, в вариантах с УФ облучением, как правило, не отличалась от контроля, сохраняясь относительно

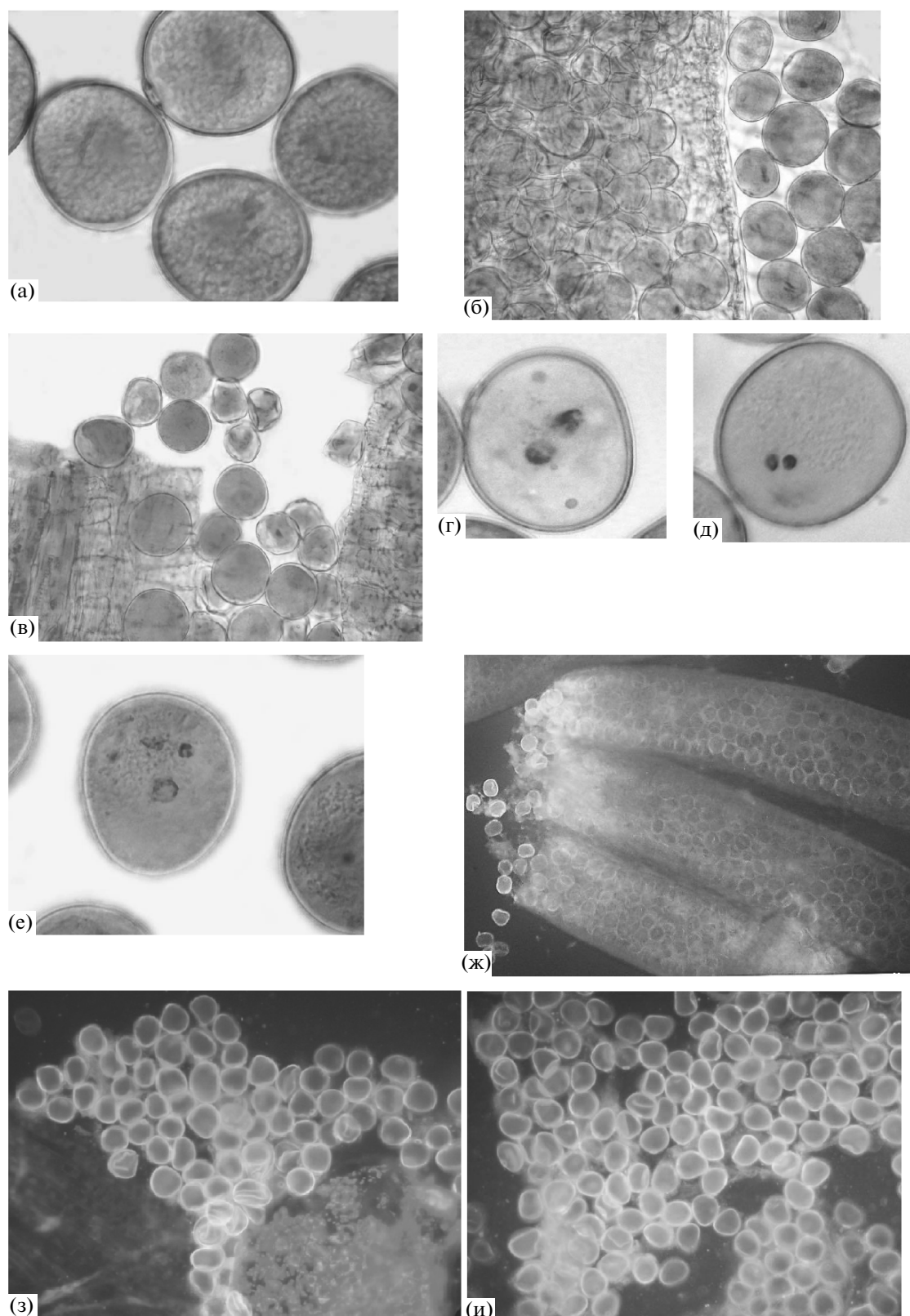


**Рис. 5.** Микроспорогенез. Деструктивный цитомиксис: а – метафаза 1, утолщение каллозных стенок, образование синцитиев; б – гиперсекреция каллозы в профазе мейоза; в – метафаза 2; г–е – редуцированные пыльники на стадии тетрад; а, г – визуализация ацетокармином, б – анилиновый голубой, в, д, е – смесь флуоресцентных красителей, микроскопия в разных спектрах поглощения УФ.

высокой (рис. 6ж). Визуально, по степени аккумуляции каллозы на оболочках микроспор и ПЗ, между опытными вариантами и контрольными растениями также не выявлено существенных различий (рис. 6з, би).

Дозовые зависимости индукции нарушений в ходе развития ПЗ характеризовались нелинейностью (рис. 4д–4е). Зависимость стерильности зрелой пыльцы от дозы УФ носила отрицательный, а

от гамма-облучения – положительный характер. С возрастанием дозы ультрафиолета число аномальных пыльцевых зерен сначала возрастало (до 11.3%), а затем снижалось (до 9 и 3.8%) (рис. 4а, 4д). При максимальной экспозиции ультрафиолета уровень стерильности пыльцы приближался к контролю. Отмечена положительная корреляция между цитомиксисом и числом патологий на стадии тетрад (0.7) и микроспор (0.9). Однако



**Рис. 6.** Зрелые пыльцевые зерна (ПЗ): а – нормальные (контроль), б, в – полиморфизм ПЗ (б –  $2.2 \text{ кДж/м}^2$ , в – 40 Гр); г – двуядерное “малоплазменное” ПЗ (20 Гр); д – поздняя дегенерация спермиев в зрелом ПЗ (40 Гр); е – морфологические признаки апоптозной гибели спермиев и ядра вегетативной клетки при дегенерации ПЗ (40 Гр); ж – наполненные (продуктивные) пыльники в опытном варианте ( $4.3 \text{ кДж/м}^2$ ); з, и – флуоресценция каллозы в оболочке зрелого ПЗ (з – контроль, и –  $4.3 \text{ кДж/м}^2$ ); а–е – окраска ацетокармином, ж–и – смесь флуоресцентных красителей.

между интенсивностью ЦМ и стерильностью ПЗ наблюдалась отрицательная корреляция ( $-0.32$ ).

При гамма-воздействии дозовые зависимости носили иной характер (рис. 4б, 4е). Положительная корреляция между ЦМ и патологиями в тетрадах ( $0.4$ ) сменялась на отрицательную между ЦМ и стерильностью микроспор ( $-0.9$ ). Уровень стерильность двуклеточных ПЗ увеличивался до 9% (при 20 Гр), а затем снижался до 6% (при 40 Гр), в то время как стерильность трехклеточных ПЗ возрастала с 6 до 19%. Заметная разница между показателями стерильности дву- и трехклеточных ПЗ объясняется заметным вкладом в стерильность зрелых ПЗ случаев поздней инактивации спермиев. Между интенсивностью ЦМ и стерильностью двуклеточных ПЗ наблюдалась высокая положительная корреляция ( $0.99$ ), а с трехклеточными ПЗ – слабopоложительная ( $0.09$ ).

Итак, ультрафиолетовое и гамма-облучение проростков ячменя индуцировало рост числа патологий в мужской репродуктивной сфере растений. Большинство цитологических повреждений характеризовалось неспецифичностью и проявлялось в виде активизации ЦМ, гиперсекреции каллозы в микроспорогенезе, возрастании полиморфизма микроспор и ПЗ, “рассинхронизации” гаметогенеза, увеличения числа “малоплазменных” ПЗ. Специфические нарушения, индуцированные гамма-облучением, состояли в поздней инактивации спермиев в зрелом ПЗ. Отмечена негативная корреляция между цитомиксисом и стерильностью микроспор (при гамма-облучении), а также между цитомиксисом и стерильностью зрелых ПЗ (при УФ-В-облучении).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ультрафиолетовое и гамма-облучение проростков ячменя индуцировало рост числа патологий в мужской репродуктивной системе растений, большая часть из которых характеризовалась неспецифичностью. Особенностью развития микроспороцитов в опытных вариантах была гиперсекреция каллозных отложений. Основным типом патологии микроспорогенеза является активизация цитомиксиса. Структурно-функциональные аспекты инициации цитомиксиса еще во многом остаются не ясными. Мы отмечали, что усиление активности цитомиксиса сопровождалось прерыванием контактов между МСЦ и тапетумом, увеличением толщины каллозных отложений на клеточных стенках микроспороцитов и образованием камер с мощными каллозными пе-

регородками в тех частях пыльника, которые были охвачены интенсивным и/или деструктивным цитомиксисом.

Функции каллозы в генеративной сфере растений многообразны. Известно, что она действует как молекулярный фильтр, несет защитную, влагосберегающую и изолирующую функции, локализует распространение цитолитических процессов, участвует в углеводном метаболизме, обеспечивая микроспоры углеводами, и входит в состав экзины (Heslop-Harrison, 1966a, b; Барская, Балина, 1971; Поддубная-Арнольди, 1976; Pacini, 1994; Nishikawa et al., 2005; и др.). Нарушение синтеза каллозы рассматривается как один из механизмов возникновения отклонений в процессе микроспорогенеза и формирования ПЗ под воздействием стресса (Dubois et al., 1990; Lalonde et al., 1997; Mamun et al., 2006). Нарушения синтеза и/или гидролиза каллозы, наблюдаемое у растений с цитоплазматической мужской стерильностью, а также под влиянием неблагоприятных экологических факторов (водного дефицита, высокой температуры и др.) подтверждают важную роль метаболизма каллозы в мужской репродукции (De Vries, 1970; Lalonde et al., 1997; Mamun et al., 2006; Попова и др., 2008). Один из механизмов нарушений метаболизма каллозы может быть связан с изменением ритма энзиматической активности каллозы, которая синтезируется клетками тапетума (Tsuchiya et al., 1995). Нарушения синтеза и гидролиза каллозы в условиях абиотического стресса могут быть результатом отклонений в общем углеводном обмене, что отмечено рядом авторов на основе анализа генной экспрессии у стерильных и фертильных линий риса (Kong et al., 2007). Исходя из результатов нашего исследования, добавим, что нарушения метаболизма каллозы в МСЦ, а также переключение трофических связей последних с тапетальных клеток на окружающие клетки МСЦ посредством цитомиктических каналов (в случае прерывания контакта с тапетумом) вероятно является важной функциональной составляющей феномена цитомиксиса.

Количественный анализ индукции нарушений в ходе микроспорогенеза выявил нелинейность дозовых зависимостей при облучении ультрафиолетом и гамма-облучением. Как ни парадоксально, но повреждения, индуцированные малыми дозами ультрафиолета, не устранялись ни репарацией, ни клеточным отбором, и сохранялись во многих клеточных поколениях. Они оставались недоступными действию гаплонтного отбора, определяя относительно высокий (9–11%) процент стерильности ПЗ. Только с повышением экспозиции УФ-В “включались” восстановительные механизмы, среди которых заметную

роль играл цитомиксис. Перегиб дозовой кривой и формирование дозонегативного участка дают основание говорить о пороговом эффекте в реакции на ультрафиолет, обусловленном, вероятно, числом повреждений ДНК и других макромолекул, запускающих репарационные процессы и клеточный отбор. Известно, что в ответ на возрастание уровня цитогенетических повреждений сначала активизируются системы репарации ДНК, а затем — апоптозной гибели клеток с нерепарируемыми повреждениями (Календо, 2000). В отношении гамма-облучения пороговый уровень повреждения формировался при дозе около 20 Гр (см. рис. 1).

Отрицательная корреляция между цитомиксисом и стерильностью ПЗ при УФ-В облучении и между цитомиксисом и стерильностью микроспор при гамма-воздействии, вероятно, указывают на функцию ЦМ как клеточного (внутриорганизменного) отбора. Позитивная корреляция между активностью цитомиксиса и числом анеуплоидных микроспороцитов (Malallah, 2011) также свидетельствует в пользу такого предположения. Согласно данным литературы, зависимость между цитомиксисом и жизнеспособностью пыльцы носит как негативный (Sapre, Deshpande, 1987), так и позитивный характер (Falistocco et al., 1995), или чаще, слабопозитивный (Bellucci et al., 2003; Singhal et al., 2008; Kumar, Singhal, 2008), что предполагает влияние другого, кроме цитомиксиса, фактора на жизнеспособность пыльцы. Таким фактором, в общем случае, по-видимому, является внутриорганизменная генетическая гетерогенность и, как следствие, геномная нестабильность мутантов, гибридов, анеуплоидов и полиплоидов. Популяция микроспороцитов у таких растений чаще всего представляет генетическую мозаику (Орлова, 1976). Радиация повышает генетическую гетерогенность растений и, таким образом, активизирует клеточный отбор. Мы полагаем, что цитомиксис является формой клеточного (предмейотического) отбора, который активизируется с превышением порогового уровня повреждения (или дисбаланса) микроспороцитов. Нерегулярность цитомиксиса косвенно подтверждает данное предположение. Новизна выдвигаемой идеи состоит в том, что цитопалогия и клеточная гибель, сопровождающие цитомиксис у растений с нарушенным гомеостазом, рассматриваются как механизм индуцированной гибели генетически несбалансированных или нерепарируемых клеток. Включение этого механизма носит пороговый характер.

Связь клеточного отбора с восстановительными процессами после облучения впервые была отмечена нами при исследовании микроспороге-

неза в потомстве мягкой пшеницы, подвергшейся воздействию острого и хронического облучения в зоне ЧАЭС. Мы установили, что интенсивный цитомиксис, охватывающий и предмейотический митоз, обычно наблюдался в тех линиях, где число нарушений в последующем ходе мейоза было меньшим, и, наоборот, у линий с большим количеством цитопатологий активность цитомиксиса была ниже (Гродзинский и др., 1996; Grodzinsky et al., 2007). Дальнейшие исследования ЦМ у ржи и ячменя при использовании острого облучения подтвердили эту зависимость (Кравец, 2008, 2009, и др.). Действительно, с активизацией ЦМ обычно растет и количество аномалий в мейозе, но при завершении микроспорогенеза и в ходе гаметогенеза число нарушений, как правило, снижается и фертильность пыльцы сохраняется относительно высокой. Из устного сообщения (Козуб и др., неопубл. данные), при облучении сухих семян пшеницы (*Triticum aestivum*, сорт Безостая 1) в высоких дозах (200 Гр) в микроспорогенезе наблюдались сильнейшая активизация цитомиксиса с множественными нарушениями мейоза, тем не менее, фертильность пыльцы сохранялась, а озерненность колосьев оказывалась даже более высокой, чем при использовании меньших доз облучения. Поскольку продуктивность пыльцы обычно значительно перекрывает ее реальную потребность, цитомиксис (невзирая на присущее ему более или менее выраженное деструктивное начало) скорее способствует сохранению фертильности ПЗ, чем ее потере.

Итак, мы полагаем, что благодаря цитомиксису, популяция МСЦ в ходе мейоза избавляется от избыточной генетической неоднородности и мутационного груза. Кроме того, посредством цитомиксиса может осуществляться регуляция численности функционирующих МСЦ и устраняться их избыточность, что подтверждается преимущественной приуроченностью цитомиксиса к видам с крупными пыльниками и многочисленными МСЦ (Herrero, 2003). В этом понимании нам близка точка зрения на цитомиксис как на выживание одной части популяции МСЦ за счет гибели другой (Миляева, 1965; Кравченко, 1977). Действительно, стерилизация части спорогенных клеток и МСЦ, которые становятся источником дополнительного питания для сохраняющихся МСЦ — нередкое явление у покрытосеменных растений (Магешвари, 1954). Можно ожидать, что стерилизации подвергаются как наиболее удаленные МСЦ дистальной части пыльника, так и генетически несбалансированные клетки. В предыдущих работах мы уже рассматривали роль феномена клеточного отбора и, близкого по смыслу термина “клеточная конкуренция”, в восстановительных и адаптивных процессах расте-

ний после облучения (Кравец, 2008, 2009, 2011). Суть феномена клеточной конкуренции (логически обоснованной еще А. Вейсманом (Weismann, 1892) в современной интерпретации состоит в том, что внутри многоклеточного организма различия по темпам пролиферации между aberrantными и нормальными клетками приводят к элиминации медленно пролиферирующих клеток. Как правило, гибель aberrantных репродуктивных клеток происходит в течение нескольких, обычно 3–5, клеточных поколений (Ганасси, 1976). У генетических мозаик, применительно к морфогенезу, такую конкуренцию выигрывают “генетически здоровые” клетки дикого типа, которые вытесняют мутантные клоны (Díaz, Moreno, 2005; Wei, Baker, 2007; Tyler et al., 2007). За последние десятилетия гипотеза клеточной конкуренции получила широкое развитие и ее, наряду с морфогенетическим апоптозом, стали рассматривать как тип клеточной гибели, имеющий решающее значение для обеспечения нормального развития и поддержания здорового состояния различных органов (Gallant, 2005; Moreno, 2006). Реализация клеточной конкуренции осуществляется через, так называемый автономный апоптоз, который в отличие от морфогенетического апоптоза, не запускается “сверху” (т.е. не программируется), а инициируется внутри самой клеточной популяции (Takashi, O’Connor, 2004).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитомиксис можно охарактеризовать как широко распространенное, но не регулярное явление цитологического, генетического, физиологического и информационного характера, свойственное вегетативным и генеративным тканям как в норме, так и при патологии. На сегодняшний день среди исследователей так и не существует однозначного мнения относительно его природы и значения. Интерпретация проявлений цитомиксиса и оценка его биологической роли осложняются значительным варьированием активности этого феномена и, связанными с ней, различными цитологическими и генетическими последствиями. Деструктивные последствия цитомиксиса усиливают разнообразные стрессовые факторы. Важную роль цитомиксис играет в репродуктивной сфере растений. Обеспечивая информационный контакт между клетками, он одновременно сопровождает избирательную дифференциацию клеток половых путей и элиминацию избыточных клеток как у растений, так и животных. Благодаря цитомиксису, достига-

ются пространственная непрерывность и объединение МСЦ в единую ценоцитную систему пыльника, синхронизация мейоза и одновременность созревания ПЗ в пределах микроспорангия. С другой стороны, ЦМ вносит определенный вклад в формообразовательный процесс, влияет на генетическое разнообразие, увеличивает уровень гетерозиготности и миксоплоидию, имеет адаптивное значение. Зависимость между цитомиксисом и жизнеспособностью пыльцы носит чаще всего слабопозитивный характер. Выявленная негативная корреляция между цитомиксисом и стерильностью микроспор (при гамма-облучении), а также между цитомиксисом и стерильностью зрелых ПЗ (при УФ-В-облучении) у ячменя позволяет полагать, что цитомиксис у видов с внутриорганизменной генетической гетерогенностью служит инструментом клеточного отбора. Активизация цитомиксиса, по-видимому, связана с превышением порогового уровня повреждения (или генетического дисбаланса) микроспороцитов. Функциональное назначение цитомиксиса состоит также в обеспечении дополнительной трофики МСЦ – с его помощью может осуществляться регуляция численности одних (функционирующих) микроспороцитов за счет гибели других. Вероятно, в общем случае цитомиксис представляет собой форму переноса информации в соответствии с продольным градиентом пыльника, благодаря чему происходит отбор (индуцируется гибель) поврежденных и избыточных микроспороцитов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барская Е.И., Балина Н.В. О роли каллозы в пыльниках растений // Физиология растений. 1971. 18. № 4. С. 716–721.
- Батыгина Т.Б. Эмбриология пшеницы. Л.: Колос, 1974. 206 с.
- Ван С.Ю., Юй Ч.Х., Ли С., Ван Ч.И., Чжен Г.Ч. Ультраструктура и возможное происхождение цитоплазматических каналов, обеспечивающих связь между клетками вегетативных тканей пыльников // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 1. С. 110–120.
- Ганасси Е.Э. Радиационное повреждение и репарация хромосом. М.: Наука, 1976. 103 с.
- Гродзинский Д.М., Кравец Е.А., Хведынич О.А., Коломиец О.Д., Банникова В.П. Формирование репродуктивной системы растений, подвергшихся воздействию хронического облучения // Цитология и генетика. 1996. Т. 30. № 3. С. 36–45.
- Календо Г.С. Различные уровни радиозащиты в популяции опухолевых клеток // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41. № 5. С. 519–527.



- Кравец Е.А.* Клеточный отбор в онтогенезе растений и его значение для формирования адаптации к облучению // Научны труды Николаевского гос. ун-та им. Петра Могилы. 2008. Вып. 89. Т. 102. С. 98–104.
- Кравец Е.А.* Клеточные и тканевые механизмы восстановительных процессов в вегетативных и генеративных меристемах при воздействии облучения // Цитология и генетика. 2009. Т. 43. № 1. С. 11–22.
- Кравец Е.А.* Цитомиксис, его природа, значение и цитологические последствия // Цитология и генетика. 2012. № 3. С. 75–85.
- Кравченко Л.Н.* Особенности мейоза у пшеницы и ее гибридов. Кишинев: Штиинца, 1977. 159 с.
- Кунах В.А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 723 с.
- Кунах В.А.* Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений. Жебраковские чтения. III. Минск: Право и экономика, 2011. 56 с.
- Магешвари П.* Эмбриология покрытосеменных. М.: ИЛ, 1954. 439 с.
- Миляева Э.Л.* К вопросу о цитомиксисе в процессе микроспорогенеза // Бюллетень Гл. бот. Сада АН СССР. 1965. Вып. 59. С. 53–57.
- Мурсалимов С.Р.* Исследование цитомиксиса в микроспорогенезе табака (*Nicotiana tabacum* L.) разного уровня ploидности. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2012. 18 с.
- Мурсалимов С.Р., Байбородин С.И., Сидорчук Ю.В., Шумный В.К., Дейнеко Е.В.* Особенности формирования цитомиксических каналов в материнских клетках пыльцы *Nicotiana tabacum* L. // Цитология и генетика. 2010. Т. 44. № 1. С. 19–24.
- Мурсалимов С.Р., Дейнеко Е.В.* Цитомиксис в образцах из природных популяций *Dactylis glomerata* L. (POACEAE) // Информационный Вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 4. С. 772–777.
- Орлова И.Н.* Цитомиксис. В кн. Эмбриология цветковых растений. Т. 1. СПб.: 1994. С. 115–117.
- Орлова И.Н.* Причины мозаичности спорогенной ткани по числам хромосом в микроспороцитах гексаплоидных тритикале // Генетика. 1976. Т. 12. № 12. С. 7–13.
- Остапенко Е.К., Виленский Е.Р., Науменко В.Д., Бубряк И.И., Гродзинский Д.М.* Генетические нарушения в пыльцевых клетках ячменя ваху в условиях радиоактивного загрязнения после Чернобыльской аварии // Онтогенез. 1993. Т. 24. № 5. С. 11–19.
- Поддубная-Арнольди В.А.* Цитоэмбриология покрытосеменных растений. М.: Наука, 1976. 507 с.
- Попова А.Ф., Иваненко Г.Ф., Устинова А.Ю., Заславский В.А.* Локализация каллозы в микроспорах и пыльцевых зернах растений *Sium latifolium* L. в условиях разного водного режима // Цитология и генетика. 2008. 42. № 6. С. 3–7.
- Романов И.Д.* Особенности развития пыльцы злаков и значение их для некоторых генетических исследований // Генетика. 1970. Т. 6. № 10. С. 11–25.
- Романов И.Д., Орлова И.Н.* Цитомиксис и его последствия в микроспороцитах *Triticale* // Генетика. 1971. Т. 7. № 12. С. 5–13.
- Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К.* Особенности цитомиксиса в материнских клетках пыльцы у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) мутантным фенотипом // Цитология. 2007. Т. 49. № 10. С. 870–875.
- Стельмах О.А., Кравец Е.А., Емец А.И., Блюм Я.Б.* Особенности репродуктивного развития мутантов *Nicotiana sylvestris*, устойчивых к изопропил-N-фенилкарбамату // Цитология и генетика. 2005. Т. 39. № 6. С. 15–23.
- Шкутина Ф.М., Хвостова В.В.* Цитологический анализ пшенично-ржаных амфидиплоидов // Экспериментальная полиплоидия в селекции растений. М., 1966. С. 261.
- Шкутина Ф.М., Козловская В.Ф.* Цитомиксис в мейозе у некоторых гибридных гибридных форм злаков подтрибы *Triticinae* // Генетика. 1874. Т. 10. № 5. С. 5–12.
- Шнайдер Т.М.* Особенности мейоза у отдаленных гибридов пшеницы, полученных с участием мутанта *ph* // Цитология и генетика. 1988. Т. 22. № 3. С. 18–22.
- Arnoldi M.* Beitrage zur Morphologie der Gymnospermen. IV. Was sind die "Keimblaschen" Oder "Hofmeisters-Korperchen" in der Eizelle der Abietineen? // Flora. 1900. V. 87. S. 194–204.
- Bahl J.R., Tyagi B.R.* Cytomixis in pollen mother cells of *Papaver dubium* L. // Cytologia. 1988. V. 53. P. 771–775.
- Basavaiah D., Morthy T.C.S.* Cytomixis in pollen mother cells of *Urochloa panicoides* P. Beauv. (Poaceae) // Cytologia. 1987. V. 52. P. 69–74.
- Bhatt A.M., Lister C., Page T., Fransz P., Findlay K., Jones G.H., Dickinson H.G., Dean C.* The DIF1 gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the REC8/RAD21 cohesin gene family // Plant J. 1999. V. 19. P. 463–472.
- Bedi Y.S.* Cytomixis in woody species // Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.). 1990. V. 100. P. 233–238.
- Bellucci M., Roscini C., Mariani A.* Cytomixis in the Pollen Mother Cells of *Medicago sativa* L. // J. Heredity. 2003. V. 94. № 6. P. 512–516.
- Bobak M., Herich R.* Cytomixis as a manifestation of pathological changes after the application of trifluraline // Nucleus. 1978. V. 21. P. 22–26.
- Caetano-Pereira C.M., Pagliarini M.S.* Cytomixis in maize microsporocytes // Cytologia. 1997. V. 62. P. 351–355.
- Carlson J.G., Handel M.A.* Intracellular bridges and factors determining their patterns in the grasshopper testis // J. Morphol. 1988. V. 196. P. 173–185.
- Dagne K.* Meiosis in interspecific in *Guizotia* Cass. (Compositae) // Hereditas. 1994. V. 121. P. 119–129.
- Díaz B., Moreno E.* The competitive nature of cells // Exp. Cell Res. 2005. 306. P. 17–322.
- Digby L.* Observation on "chromatin bodies" and their relation to the nucleolus in *Galtonia candicans* Decsne // Ann. Bot. 1909. V. 23. P. 491–502.

- Dubois T., Guedira M., Dubois J., Wasseur J.* Direct somatic embryogenesis in root of *Cichorium*: is callose an early-marker? // *Ann. Bot.* 1990. 65. № 5. P. 539–545.
- Dumas C., Knox R.B., Gaude T.* The spatial association of the sperm cells and vegetative nucleus in the pollen grain of *Brassica* // *Protoplasma.* 1985. V. 124. P. 168–174.
- Dwivedi N.K., Sikdar A.K., Jolly M.S., Susheelamma B.N., Suryanarayana N.* Induction of tetraploidy in colchicine-induced mutant of mulberry. 1. Morphological and cytological studies in cultivar Kanva-2 // *Indian J. Genet.* 1988. V. 48. P. 305–311.
- Falisticco E., Tosti N., Falcinelli M.* Cytomixis in pollen mother cells of Diploid *Dactylis*, one of the origins of 2n gametes // *J. Heredity.* 1995. V. 86. P. 448–453.
- Fraser A.C.I.* The behavior of the chromatin in the meiotic division of *Vicia faba* // *Ann. Bot.* 1914. V. 28. P. 633–642.
- Gallant P.* Myc, Cell Competition and Compensatory Proliferation // *Cancer Research.* 2005. 65. P. 6485–6487.
- Gates R.R.* Pollen formation in *Oenotera gigas* // *Ann. Bot.* 1911. V. 25. P. 909–940.
- Gates R.R., Rees E.M.* A cytological study of pollen development in *Lactuca* // *Ann. Bot.* 1921. V. 35. P. 365–398.
- Grodzinsky D.M., Kravetz E.A., Kolomietz O.D.* Haplontic cell selection as reactive and adaptive action of plants at conditions of chronic irradiation // *Proc. Int. sem. Environment protection.* Uzhorod, 1997. V. 2. P. 7–10.
- Grodzinsky D.M., Kravetz E.A., Khvedinich O.A., Kolomietz O.D.* Effect of chronic irradiation on reproductive system of winter wheat / Current problems of radiation research. Proc. 35th annual Meeting of the Europ. Rad. Res. Society. Kyiv. 2007. P. 26–41.
- Cheng K.C., Wang Y.C.* The general occurrence and regularity of the intercellular migrating chromatin 25 substance in the pollen mother cells of certain angiosperms // *Acta Bot. Sin.* 1956. V. 5. P. 363–376.
- Gallant P.* Myc, Cell Competition and Compensatory Proliferation // *Cancer Research.* 2005. 65. P. 6485–6487.
- Gaulden M.E.* Hypothesis: some mutagens directly alter specific chromosomal proteins (DNA topoisomerase II and peripheral proteins) to produce chromosome stickiness, which causes chromosome aberrations // *Mutagenesis.* 1987. 2. P. 57–365.
- Grodzinsky D.M., Kravetz E.A., Khvedinich O.A., Kolomietz O.D.* Effect of chronic irradiation on reproductive system of winter wheat / Current problems of radiation research. Proc. 35th annual Meeting of the Europ. Rad. Res. Society. Kyiv. 2007. P. 26–41.
- Guang-Qin Guo, Guo-Chang Zheng.* Hypothesis for functions of intercellular bridges in male germ cell development and its cellular mechanisms // *J. Theor. Biol.* 2004. V. 229. P. 139–146.
- Hecht N.B.* Intercellular and intercellular transport of many germ cell mRNAs mediated by the DNA-binding protein, testis-brain-RNA-binding protein (TB-RBP) // *Mol. Reprod. Dev.* 2000. V. 56. P. 252–253.
- Herrero M.* Male and female synchrony and regulation of mating in flowering plants // *Philos. Trans. R. Soc. London B.* 2003. 358. P. 1019–1024.
- Heslop-Harrison J.* Cytoplasmic connections between angiosperms meiocytes // *Ann. Bot.* 1966a. V. 30. P. 221–230.
- Heslop-Harrison J.* Cytoplasmic continuity during spore formation in flowering plants // *Endeavour.* 1966b. V. 25. P. 65–72.
- Kamra O.P.* Chromatin extrusion and cytomixis in pollen mother cells of *Hordeum* // *Hereditas.* 1960. V. 46. P. 592–600.
- Kong J., Li Z., Tan Y.P. et al.* Different gene expression patterns of sucrose-starch metabolism during pollen maturation in cytoplasmic male-sterile and male-fertile lines of rice // *Physiol. Plant.* 2007. 130. № 1. P. 136–147.
- Körnicker M.* Über Ortsveränderung von Zellkärnern. S.B. Niederrhein // *Ges. Natur.* 1901. U Heilkunde Bonn. A. P. 14–25.
- Kravets E.* The role of cell selection for pollen grain fertility after treatment of barley sprouts (*Hordeum distichum* L.) with UV-B irradiation // *Acta Biol. Slov.* 2011. 54. P. 31–41.
- Kumar P., Singhal V.K., Kaur D., Kaur S.* Cytomixis and associated meiotic abnormalities affecting pollen fertility in *Clematis orientalis* // *Biologia Plantarum.* 2010. V. 54. P. 181–184.
- Kumar P., Singhal V.K.* Cytology of *Caltha palustris* L. (Ranunculaceae) from cold regions of Western Himalayas // *Cytologia.* 2008. V. 73. P. 137–143.
- Kumar P., Singhal V.K.* Male meiosis, morphometric analysis and distribution pattern of 2x and 4x cytotypes of *Ranunculus hirtellus* Royle, 1834 (Ranunculaceae) from the cold regions of Northwest Himalayas (India) // *Comparative Cytogenetics.* 2011. 5. V. 3. P. 143–161.
- Kwiatkowska M.* Plasmodesmal changes are related to different developmental stages of anteridia of *Chara* species // *Protoplasma.* 2003. V. 222. P. 1–11.
- Lattoo S.K., Khan S., Bamotra S., Dhar A.K.* Cytomixis impairs meiosis and influences reproductive success in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq. – an additional strategy and possible implications // *J. Biosci.* 2006. V. 31. № 5. P. 629–637.
- Lalonde S., Dwight U., Beebe H., Saini S.* Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic stage water deficit // *Sex. Plant Rep.* 1997. 10. № 1. P. 40–48.
- Levan A.* Syncyte formation in the pollen mother cells of haploid *Phleum pratense* // *Hereditas.* 1941. V. 27. P. 243–252.
- Liu H., Guo G.-Q., He Y.-K., Lu Y.-P., Zheng G.-C.* Visualization on intercellular movement of chromatin in intact living anthers of transgenic tobacco expressing histone 2B-CFP Fusion Protein // *Caryologia.* 2007. V. 60. № 1–2. P. 1–20.
- Lytvyn D.I., Yemets A.I., Blume Y.B.* UV-B overexposure induces programmed cell death in a BY-2 tobacco cell line // *Environ Exp. Bot.* 2010. V. 68. P. 51–57.
- Malallah G.A.* Cytomixis and its possible evolutionary role in a Kuwaiti population of *Diplotaxis harra* (Brassicaceae) // *Comp. Cytogen.* 2011. V. 5(3). P. 143–161.
- Mamun E.A., Alfred S., Cantrill L.C. et al.* Effects of chilling on male gametophyte development in rice // *Cell Biol. Inter.* 2006. 30. № 1. P. 583–591.
- Mantu D.E., Sharma A.K.* Cytomixis in pollen cells of an apomictic ornamental *Ervatamia divaricata* (L.) Alston // *Cytologia.* 1982. V. 48. P. 201–207.
- Mascarenhas J.P.* The male gametophyte of flowering plants // *Plant Cell.* 1989. V. 1. P. 657–664.

- Mascarenhas J.P.* Gene activity during pollen development // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1990. V. 41. P. 317–338.
- Miehe H.* Ueber Wanderungen des pflanzlichen Zellkernes // *Flora.* 1901. V. 88. P. 105–142.
- Mogensen H.L.* The male germ unit: concept, composition, and significance // *Int. Rev. Cytol.* 1992. V. 140. P. 129–147.
- Moreno E.* Discovery of “Programmed cell competition” among stem cells. Cellular Competition Group. Overview. Molecular Oncology Programme (update 31.03.2006) // <http://www.cnio.es/ing/grupos/plantillas>
- Morisset P.* Cytomixis in the pollen mother cells of *Ononis (Leguminosae)* // *Can. J. Genet. Cyt.* 1978. V. 20. P. 383–388.
- Mursalimov S.R., Deineko E.V.* An ultrastructural study of microsporogenesis in tobacco line SR1 // *Biologia.* 2012. V. 67. № 2. P. 369–376.
- Narain P.* Chromosome mosaicism in microsporocytes of *Gloriosa* // *Cytologia.* 1980. V. 45. P. 271–279.
- Nirmala C., Kaul M.L.H.* Male sterility in pea. Y1 Gene action duplicity // *Cytologia.* 1994. V. 59. P. 195–201.
- Nishikawa S.I., Zinkl G.M., Swanson R.G. et al.* Callose ( $\beta$ ,1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth // *Plant Biol.* 2005. 22. № 5. P. 1345–1352.
- Nowa N.* Some cytological observations in *Trielystis*, *Sagittaria* and *Lilium* // *Tokyo Bot. Mag.* 1928. V. 42. P. 33–36.
- de Oliveira V.M., Forni-Martins E.R., Magalhães P.M., Alves M.N.* Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae) // *Gen. Mol. Biol.* 2004. V. 27. P. 215–222.
- Owen H.A., Makaroff C.A.* Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ecotype *Wassilewskija* (Brassicaceae) // *Protoplasma.* 1995. V. 185. P. 7–21.
- Pacini E.* Cell biology of anther and pollen development // Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Kluwer: Acad. publ., 1994. P. 83–96.
- Quang-Qin Guo, Guo-Chang Zheng.* Hypotheses for the function of intercellular bridges in male germ cell development and its cellular mechanisms // *J. Theoret. Biol.* 2004. V. 229. P. 139–146.
- Risueno M.C., Gimenez-Martin G., Lopez-Saez J.F., R-Garsia M.I.* Connexions between meiocytes in plants // *Cytologia.* 1969. V. 34. P. 262–272.
- Rezaglia K.S., Garbary D.J.* Motile male gametes of land plants: diversity, development and evolution // *Crit. Rev. Plant Sci.* 2001. V. 20. P. 107–213.
- Russel S.D.* Isolation and characterization of sperm cells in flowering plants // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1991. V. 42. P. 189–204.
- Sapre A.B., Deshpande D.S.* A change in chromosome number due to cytomixis in an interspecific hybrid of *Coix. L.* // *Cytologia.* 1987. V. 52. P. 167–174.
- Singhal V.K., Gill B.* Cytomixis in some woody species // *Biologica.* 1985. V. 1. P. 168–175.
- Singhal V.K., Kumar P.* Impact of cytomixis on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of Himalayan poppy (*Meconopsis aculeate* Royle) // *J. Biosci.* 2008. V. 33. P. 371–380.
- Singhal V.K., Kaur S., Kumar P.* Aberrant male meiosis, pollen sterility and variable sized pollen grains in *Clematis montana* Buch.-Ham. ex DC. from Dalhousie hills, Himachal Pradesh // *Cytologia.* 2010. V. 75. P. 31–36.
- Soman T.A., Bhavanandan K.V.* Temperature sensitive cytomixis in *Helicanthes elastic* (Desr) Dans (Loranthaceae) // *Cytologia.* 1993. V. 58. P. 21–26.
- de Souza A.M., Pagliarini M.S.* Cytomixis in *Brassica napus* var. *Oleifera* (Brassicaceae) // *Cytologia.* 1997. V. 62. P. 25–29.
- Stern H.* The formation of polynucleated pollen mother cells // *Jour. Hered.* 1946. V. 37. P. 47–50.
- Takashi Yamada A., O'Connor M.B.* Mechanisms for removal of developmentally abnormal cells: cell competition and morphogenetic apoptosis // *J. Biochem.* 2004. V. 136. № 1. P. 13–17.
- Takats S.T.* Chromatin extrusion and DNA transfer during microsporogenesis // *Chromosoma.* 1959. V. 10. P. 430–453.
- Tarkowska J.* Experimental analysis of the mechanism of cytomixis. I. Cytomixis in vegetative tissues // *Acta Soc. Bot. Poland.* 1965. V. 34. P. 27–44.
- Tarkowska J.* Experimental analysis of the mechanism of cytomixis. II. Cytomixis in the pollen mother cells of the lily – *Lilium candidum* L. // *Acta Soc. Bot. Poland.* 1966. V. 35. P. 25–40.
- Tarkowska J.* The nature of cytomixis // *Caryologia.* 1973. V. 25. Suppl. P. 151–157.
- Tsuchiya T., Toriyama T., Yoshikawa M. et al.* Tapetum, specific expression of the gene for an endo- $\beta$ -1,3-glucanase causes male sterility in transgenic tobacco // *Plant Cell Physiol.* 1995. V. 36. № 3. P. 487–494.
- Tyler D.M., Li Wei, Zhuo Ning, Pellock B., Baker N.E.* Genes Affecting Cell Competition in *Drosophila* // *Genetics.* 2007. V. 175. P. 643–657.
- Ventela S., Toppari J., Parvinen M.* Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing // *Mol. Biol. Cell.* 2003. V. 14. P. 2768–2780.
- De Vries A.* Electron microscopy on anther tissue and pollen of male sterile and fertile wheat *Triticum aestivum* L. // *Euphytica.* 1970. V. 19. № 2. P. 103–120.
- Wei Li and Baker N. E.* Engulfment is required for cell competition // *Cell.* 2007. V. 129. P. 1215–1225.
- Weismann A.* Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung, Jena, 1892.
- Welan E.D.P.* Discontinuities in the callose wall, intermeiocyte connections and cytomixis in angiosperm meiocytes // *Can. J. Bot.* 1974. V. 52. P. 1219–1224.
- Woodworth R.H.* Cytomixis // *Jour. Arnold Arboretum.* 1931. V. 12. P. 23–25.
- Yen C., Yang J.-L., Sun G.-L.* Intermeiocyte connections and cytomixis in intergeneric hybrids of *Roegneria ciliaris* (Trin.) Nevski with *Psathyrostachys huashanica* Keng // *Cytologia.* 1993. V. 58. P. 87–193.
- Zheng G.C., Yang Q.R., Zheng Y.R.* The relationship between cytomixis and chromosome mutation and karyotype evolution in lily // *Caryologia.* 1987. V. 40. P. 243–259.

## Cytomixis and Its Role in the Regulation of Plant Fertility

E. A. Kravets

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 04123 Ukraine  
e-mail: kravetshelen@gmail.com*

**Abstract**—UV and gamma irradiation of barley seedlings induces an increase in the number of various pathologies in the male reproductive system of plants. The majority of cytological abnormalities are rather non-specific. The main type of the observed pathologies of microsporogenesis is cytomixis, whose activation correlates with a callose hypersecretion in microsporocyte walls. A negative correlation between cytomixis and the sterility of microspores (in the case of gamma irradiation) or the sterility of mature pollen grains (in the case of UV-B irradiation) is revealed. It is supposed that cytomixis represents a kind of a premeiotic cell selection in plants characterized by an intraorganismic genetic heterogeneity (mosaics). The novelty of the idea is that the cytopathology that accompanies cytomixis is considered as a mechanism of the induced death of genetically imbalanced or nonrepairable cells, which is intended to keep the fertility of a male reproductive system. The activation of this mechanism has a threshold character.

**Keywords:** cytomixis, microsporogenesis, callose hypersecretion, pollen grain sterility, cell selection, mosaicism, UV-B and gamma irradiation, *Hordeum distichum* L.

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *PnEXPA3* ТОПОЛЯ ЧЕРНОГО

© 2013 г. Б. Р. Кулуев, М. Г. Сафиуллина, А. В. Князев, А. В. Чемерис

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,

450054 Уфа, ул. Проспект Октября, д. 71

E-mail: kuluev@bk.ru

Поступила в редакцию 13.02.12 г.

Окончательный вариант получен 26.03.12 г.

Получены трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие ген *PnEXPA3*, кодирующего  $\alpha$ -экспансин тополя черного (*Populus nigra*). Трансгенные растения характеризовались увеличением размеров клеток эпидермиса и мезофилла листьев, однако величина листьев оставалась в пределах нормы. Сверхэкспрессия гена *PnEXPA3* стимулировала лишь рост стебля в длину, остальные морфологические параметры трансгенных растений остались практически неизменными.

*Ключевые слова:* экспансины, клеточное растяжение, величина органов, *PnEXPA3*, сверхэкспрессия, трансгенные растения, *Nicotiana tabacum*, *Populus nigra*.

DOI: 10.7868/S047514501303004X

### ВВЕДЕНИЕ

Клеточное растяжение в растениях сопровождается поглощением воды центральной вакуолей и стимулируется подкислением клеточной стенки (Rayle, Cleland, 1992). Исследование процессов “кислого роста” привело к открытию новой группы белков экспансинов, опосредующих рН-зависимое растяжение клеточных стенок (McQueen-Mason et al., 1992). Экспансины делятся на четыре семейства: экспансины А (EXPA), или  $\alpha$ -экспансины; экспансины В (EXPB), или  $\beta$ -экспансины; экспансин-подобные белки А (EXLA); экспансин-подобные белки В (EXLB) (Sampedro, Cosgrove, 2005). Экспансины – эволюционно консервативные белки и в целом, аминокислотные последовательности разных  $\alpha$ -экспансинов идентичны на 60–90% (Cosgrove, 1998). Показано, что экспансины не обладают ферментативной активностью, но принимают участие в разрыве нековалентных связей между целлюлозными микрофибриллами и гликановыми поперечными мостиками (см. обзор Шаровой, 2007). Действуют они в матриксе, судя по всему, совместно с трансгликозилазами, катализирующими процессы переноса и удлинения гликановых цепей и эндоглюканазами, обладающими способностью разрывать цепи гемицеллю-

лоз (Fry et al., 1992). Благодаря способности ослаблять жесткость клеточной стенки экспансины принимают участие во всех ростовых процессах растений (Azeez et al., 2010; Park et al., 2010), причем экспрессия экспансинов регулируется почти всеми известными фитогормонами (Lee et al., 2001). В каждом растении присутствуют большое количество разнообразных экспансинов, но лишь у немногих растений они идентифицированы и определены их функции. Например, в арабидопсисе было обнаружено 26 генов  $\alpha$ -экспансинов и пять  $\beta$ -экспансинов, в геноме риса – 26 генов  $\alpha$ - и 14 генов  $\beta$ -экспансинов (Cosgrove et al., 1997).

Особый интерес представляет изучение экспансинов древесных растений, так как они могут быть применены в лесной биотехнологии для создания новых пород деревьев с увеличенным размером ствола. Из древесных растений одним из первых был секвенирован геном тополя *Populus trichocarpa*, поэтому поиск и изучение экспансинов у этого растения не представляет трудностей. Древесина формируется в процессе вторичного роста в результате активности клеток камбия. В камбиальной зоне гибридной осины (*Populus tremula* L.  $\times$  *P. tremuloides* Michx.) наибольший уровень экспрессии был характерен для трех генов  $\alpha$ -экспан-

синов (*PttEXPA1*, *PttEXPA2* и *PttEXPA8*) и одного  $\beta$ -экспансина (*PttEXPB1*) (Gray-Mitsumune et al., 2004), при этом в количественном отношении больше всего было мРНК гена *PttEXPA1*, что говорит об активном участии данного экспансина в процессах вторичного роста у древесных растений. В древесине напряжения наибольший уровень экспрессии был характерен для экспансина *PttEXPA5* (Gray-Mitsumune et al., 2004). В молодых листьях обнаруживалась экспрессия генов *PttEXPA2*, *PttEXPA3*, *PttEXPA4* и *PttEXPA6*, причем больше всего было мРНК гена *PttEXPA3*.

Одним из эффективных методов изучения экспансинов является получение трансгенных форм с повышенным или пониженным уровнем экспрессии целевых генов и проведение морфофизиологического анализа опытных растений в сравнении с контрольными (Cho, Cosgrove, 2000). К тому же манипуляция с уровнем экспрессии различных экспансинов может стать одним из эффективных методов получения трансгенных растений с увеличенными размерами органов. Действительно, трансгенные по гену *AtEXPA10* растения арабидопсиса характеризовались увеличением длины черешков и площади листовой пластинки (Cho, Cosgrove, 2000). Эктопическая экспрессия гена *PttEXPA1* способствовала увеличению размеров междоузлий и площади листьев у трансгенной осины (Gray-Mitsumune et al., 2008). В литературе имеются также сведения о негативном влиянии сверхэкспрессии экспансинов на рост растений (Гао и др., 2010).

В данной работе описываются эксперименты по выделению гена *PnEXPA3* тополя черного (*Populus nigra*) и получения на основе этого гена трансгенных растений табака с целью изучения влияния его эктопической экспрессии на величину органов и размеры отдельных клеток. Исходя из литературных данных (Gray-Mitsumune et al., 2004), предполагалось, что трансгенные по гену *PnEXPA3* растения табака будут, в первую очередь, отличаться увеличенными размерами листьев.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

### *Бактериальные клетки, штаммы, плазмиды, генно-инженерные манипуляции*

В работе использованы бактерии *E. coli* штамма XL1-Blue и *A. tumefaciens* штамма AGL0. Из плазмид использовали T-вектор pKRX и бинарные векторы pCambia 1301 и pCambia 1305.1 с геном

устойчивости к гигромицину и репортерным геном *GUS* (CAMBIA, Австралия). Геномную ДНК табака выделяли методом солевой экстракции. Тотальную РНК выделяли тризолом фирмы Invitrogen (США). ОТ-ПЦР осуществляли при помощи MuLV-обратной транскриптазы (Fermentas, Литва). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса бактериальных колоний используя наборы фирмы Цитокин (Россия). Качество и количество выделенных препаратов определяли аналитическим электрофорезом в 1% агарозном геле. Агарозный гель-электрофорез проводили в приборах модели Sub-Cell GT WIDE MINI (Bio-Rad, США). Ген *PnEXPA3* выделили из тотальной ДНК табака при помощи праймеров PnEXPF AATCTTCCTGAAAATGGCTC и PnEXPR ACG-GTCCCTAACGAACTGG. Для ОТ-ПЦР гена *PnEXPA3* использовали праймеры GTGCGT-GAATGACCCGAAATGG и CTGTGAACCTTAT-GCCTCCTCTCC. Для получения ампликонов с “тупыми” концами использовали Pfu ДНК-полимеразу (Сибэнзим, Россия), для “затупления” липких концов после рестрикции или амплификации использовали T4-ДНК-полимеразу (Сибэнзим, Россия). Для поиска целевых клонов при лигировании в векторе pCambia 1301 использовали праймер 35SCambF: AGAGGACCTAACAGAACTCG в паре с праймером 1301R TGCTCTAGCATTCGCCATTC. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, США). Электропорацию компетентных клеток *A. tumefaciens* проводили при помощи электропоратора фирмы Bio-Rad модели Micropulser. Поиск гомологичных генов осуществляли при помощи программы MegAlign пакета Lasergene (DNASTAR, США) и программы MegaBlast, доступной через сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

### *Получение трансгенных растений табака, морфологическая характеристика и условия выращивания растений*

Трансгенные формы табака (*Nicotiana tabacum* L. Petit Havana SR-1) получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков (Кулуев и др., 2012). Первичные трансгенные T<sub>0</sub>-побеги отбирали на селективной среде (соли среды МС с добавлением 1 мг/л 6-БАП, 0.1 мг/л НУК), содержащей 25 мг/л гигромицина (Нуг). Качественную оценку активности репортерного

гена *GUS* в листьях  $T_0$ -побегов определяли гистохимически, используя субстрат X-Gluc (натриевая соль 5-бром-4-хлор-3-индоллил-бета-D-глюкуроновой кислоты). Все полученные  $T_0$  *GUS*+ побеги каждого варианта укореняли в присутствии 25 мг/л Нуг, затем переносили в почвенную смесь, акклиматизировали к условиям почвы, доводили до цветения, самоопыляли и получали семена ( $T_1$  потомство). Для контроля наследования трансгенов и определения количества вставок, часть  $T_1$  семян каждой полученной линии проращивали на среде МС с добавлением гигромицина в климатической камере Binder (Германия). Через 3 недели производили подсчет устойчивых и неустойчивых к селективному агенту семян, определяли расщепление при наследовании гена селективного маркера и выделяли для дальнейшей работы линии с одной интегрированной копией трансгенов.

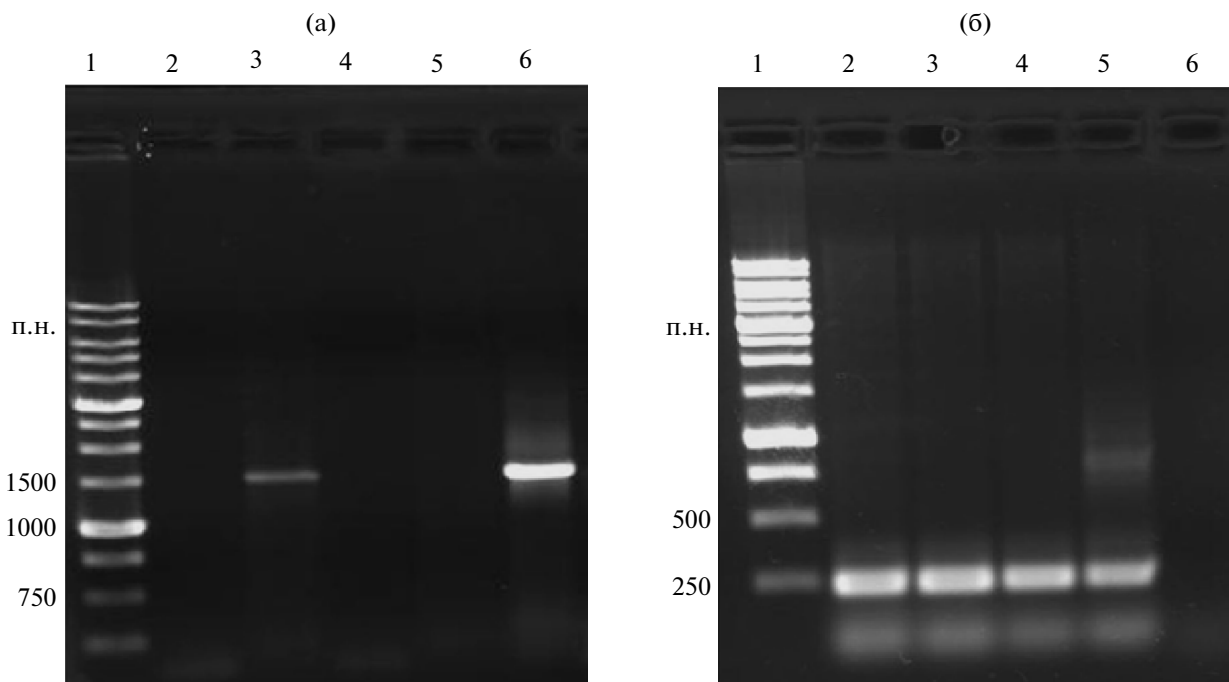
Растения трансгенных линий и контрольные растения культивировали в вегетационных сосудах объемом 450 мл, заполненных универсальным грунтом ("Гера", Россия) на открытой светоплощадке при температуре 25–27°C с фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота) и освещенностью около 10 клк. Наблюдение за растениями поколения  $T_1$  осуществляли начиная от стадии появления корешков до получения семян, что занимало от 4 до 6-ти месяцев. Замеры величины листьев производили только после пересадки в почву, через каждые 30, 45 дней и в период цветения, в итоге было осуществлено 3 замера. По каждому варианту (линия трансгенных растений) было отобрано по 5 растений, измеряли по три самых крупных нижних листа в длину, начиная от начала листовой пластины, по центральной жилке до самого кончика. Затем вычисляли среднее значение длины листа для каждого растения. Измерения длины стебля и цветков проводили в период цветения. Определяли площадь 3-х самых крупных нижних листьев и вычисляли среднее значение. Для изучения влияния конститутивной экспрессии целевого гена на размер и количество клеток, проводили измерения площади клеток нижнего эпидермиса листьев одного возраста. Эпидермис снимали с основания и середины листа. Определяли среднее число клеток, приходящихся на один лист и на 1 мм<sup>2</sup> листовой поверхности. Измерения проводили при помощи универсального флуоресцентного микроскопа модели Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием оригинального программного

обеспечения. Для оценки размеров клеток мезофилла листа делали его гистологические срезы в трех участках при помощи микротом-криостата МК-25.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Аmplификация гена PnEXPA3 и получение генно-инженерных конструкций целевого гена в векторах pCambia 1301 и pCambia 1305.1*

Для подбора праймеров и амплификации гена *PnEXPA3* тополя черного была использована нуклеотидная последовательность под номером AY435101.1 из генома осины *Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx. Участок ДНК, содержащий ген *PnEXPA3*, был амплифицирован из геномной ДНК тополя и его размер составил около 1500 п.н. (рис. 1а). Ампликон был клонирован в фагмидном T-векторе pKRX, а затем секвенирован. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что выделенная нами копия целевого гена полностью совпадает с теоретически ожидаемым и не содержит замен нуклеотидов. Ген *PnEXPA3* был выщеплен из вектора pKRX по сайту *Bse*PI, а липкие концы затуплены T4-ДНК-полимеразой. После этого по сайту рестрикции *Sma*I было осуществлено ненаправленное клонирование целевого гена в бинарных векторах pCambia 1301 и pCambia 1305.1 под контролем 35S промотора. Причем в векторе pCambia 1305.1 целевой ген был клонирован вместо репортерного гена *GUS*, а в векторе pCambia 1301 была использована специальная 35S кассета и все маркерные гены были сохранены (Кулуев и др., 2012). Поиск клонов со смысловой ориентацией целевых генов осуществляли при помощи комбинации праймеров 35SCambF, 1301R, PnEXPF и PnEXPR. Из целевых генно-инженерных конструкций нарабатывались специфичные ампликоны при ПЦР только в случае сочетания следующих пар праймеров: 35SCambF/PnEXPR, PnEXPF/1301R, 35SCambF/1301R, а при сочетании пар 35SCambF/PnEXPF, PnEXPR/1301R амплификация проходила лишь в случае антисмысловой ориентации гена *PnEXPA3*. После полной проверки, полученные бинарные векторы с геном *PnEXPA3* под контролем 35S промотора были введены в клетки *A. tumefaciens*. Агробактериальные клоны, содержащие векторы pCambia 1301 и pCambia 1305.1 с целевым геном в сенс-ориентации, были использованы для экспериментов по



**Рис. 1.** Электрофореграмма ПЦР и ОТ-ПЦР гена *PnEXPA3*: а – результаты ПЦР участка ДНК тополя черного, содержащего ген *PnEXPA3*. 1 – Маркеры молекулярной массы 250 п.н.–10000 п.н. (Сибэнзим, Россия); 3 и 6 – ампликоны полноразмерного гена *PnEXPA3* размером около 1500 п.н.; б – результаты ОТ-ПЦР гена *PnEXPA3*. 1 – Маркеры молекулярной массы 250 п.н.–10000 п.н. (Сибэнзим, Россия); 2–5 – ампликоны к ДНК гена *PnEXPA3* из трансгенных растений линий №№ 4, 5, 7 и 9 соответственно. 6 – Минус-контроль (ОТ-ПЦР гена *PnEXPA3* из контрольных растений табака).

трансформации листовых дисков табака и получения трансгенных растений.

*Получение трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген PnEXPA3*

В ходе агробактериальной трансформации листовых дисков табака целевыми генно-инженерными конструкциями с вектором pCambia 1301 и геном *PnEXPA3* были получены лишь 3 линии трансгенных растений, однако из-за отсутствия расщепления при выращивании сеянцев на среде с гигромицином эти растения в дальнейших экспериментах не использовались. При помощи вектора pCambia 1305.1 с целевым геном было получено 16 первичных трансгенных побегов, из них укоренились на селективной среде и были акклиматизированы к условиям почвы 9 растений. Из этих растений табака была выделена геномная ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие гена *PnEXPA3* и 35S промотора. Было показано, что все 9 растений содержат в своем геноме как целевой ген, так и 35S промотор. Классическое расщепление 3 : 1 и высокий уровень экспрессии целевого гена были показаны для четырех линий растений с номерами 4, 5,

7 и 9 (рис. 1б). Из растений этих 4-х линий были отобраны семена с целью получения второго поколения проростков и проведения морфологического анализа.

*Морфологическая характеристика трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген PnEXPA3*

Семена четырех линий трансгенных растений второго поколения были высеяны на селективную среду, далее по 5 растений этих отобранных линий были пересажены на почву для проведения дальнейших экспериментов по их морфологической характеристике. В качестве контроля использовали линию трансгенных растений, содержащих Т-ДНК бинарного вектора без целевого гена (pCambia 1301).

По длине листьев трансгенные и контрольные растения практически не различались ни через 30 и 45 дней после пересадки на почву, ни в период цветения (таблица). По площади листьев трансгенные растения также не превышали контрольные растения (таблица). В то же время по высоте стебля опытные растения были заметно выше кон-



Морфологические параметры контрольной группы, содержащей Т-ДНК бинарного вектора и трансгенных растений табака поколения Т<sub>1</sub>, сверхэкспрессирующих ген *PnEXPA3* тополя черного

Параметр	Линия контрольных растений pCambia 1301	Линии трансгенных растений, сверхэкспрессирующих ген <i>PnEXPA3</i>		
		pCambia 1305.1 <i>PnEXPA3</i> № 5	pCambia 1305.1 <i>PnEXPA3</i> № 7	pCambia 1305.1 <i>PnEXPA3</i> № 9
<i>Длина листьев, см</i>				
30 дней	4.6 ± 0.4	6.2 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.7 ± 0.3
45 дней	11.3 ± 0.8	11.4 ± 0.3	10.1 ± 0.5	9.1 ± 0.3
В период цветения	17.3 ± 0.2	16.4 ± 0.9	18.2 ± 0.4	16.0 ± 0.5
<i>Площадь трех самых крупных листьев, см<sup>2</sup></i>	147.0 ± 3.0	134.5 ± 7.8	146.0 ± 5.1	136.5 ± 5.0
<i>Высота стебля, см</i>	81.0 ± 3.0	99.5 ± 1.2	96.8 ± 0.9	102.3 ± 4.1
<i>Длина цветка, см</i>	4.49 ± 0.01	4.55 ± 0.11	4.45 ± 0.05	4.45 ± 0.06
Площадь клеток эпидермиса листьев, мкм <sup>2</sup>	15514 ± 770	24857 ± 1491	25227 ± 725	26941 ± 1808
Число клеток эпидермиса листьев на 1 мм <sup>2</sup>	66.2 ± 3.6	41.0 ± 2.6	40.1 ± 0.9	36.5 ± 3.5
Время цветения, дней после акклиматизации	107.8 ± 2.4	110.5 ± 1.2	117.7 ± 4.2	103.0 ± 1.8

трольных, и разница составляла у линии № 5 – 23%, у линии № 7 – 20%, а у линии № 9 – 26%. По длине цветка различий между опытными и контрольными растениями обнаружено не было (таблица). По форме листьев, стебля и цветков опытные и контрольные растения также не различались.

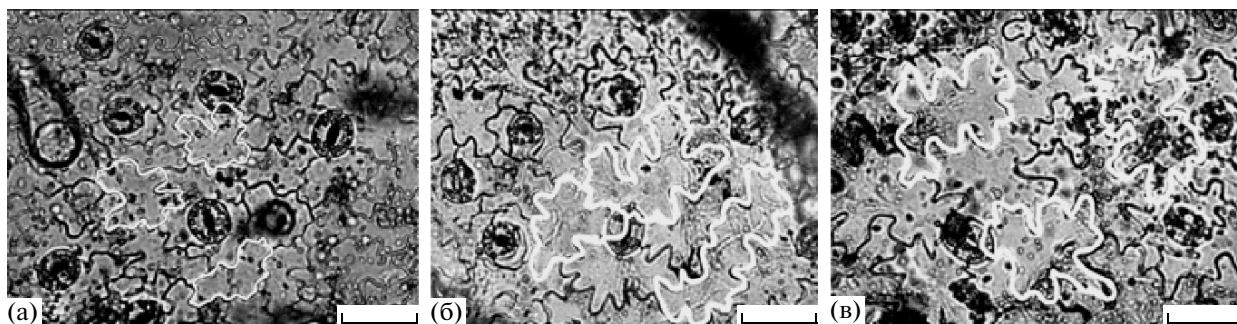
Для выяснения влияния экспрессии гена *PnEXPA3* на величину клеток, нами были проведены микроскопические исследования клеток эпидермиса листьев контрольных и опытных растений. Трансгенные по гену *PnEXPA3* растения, в отличие от контрольных растений, характеризовались увеличенными размерами клеток эпидермиса листьев (рис. 2). При этом у линии № 5 клетки были больше на 60%, у линии № 7 на 62%, а у линии № 9 на 74% крупнее, чем у контрольных растений (таблица). Из полученных

данных видно, что, несмотря на существенное увеличение размеров клеток у опытных растений, пропорционального увеличения размеров органов не происходило (рис. 3).

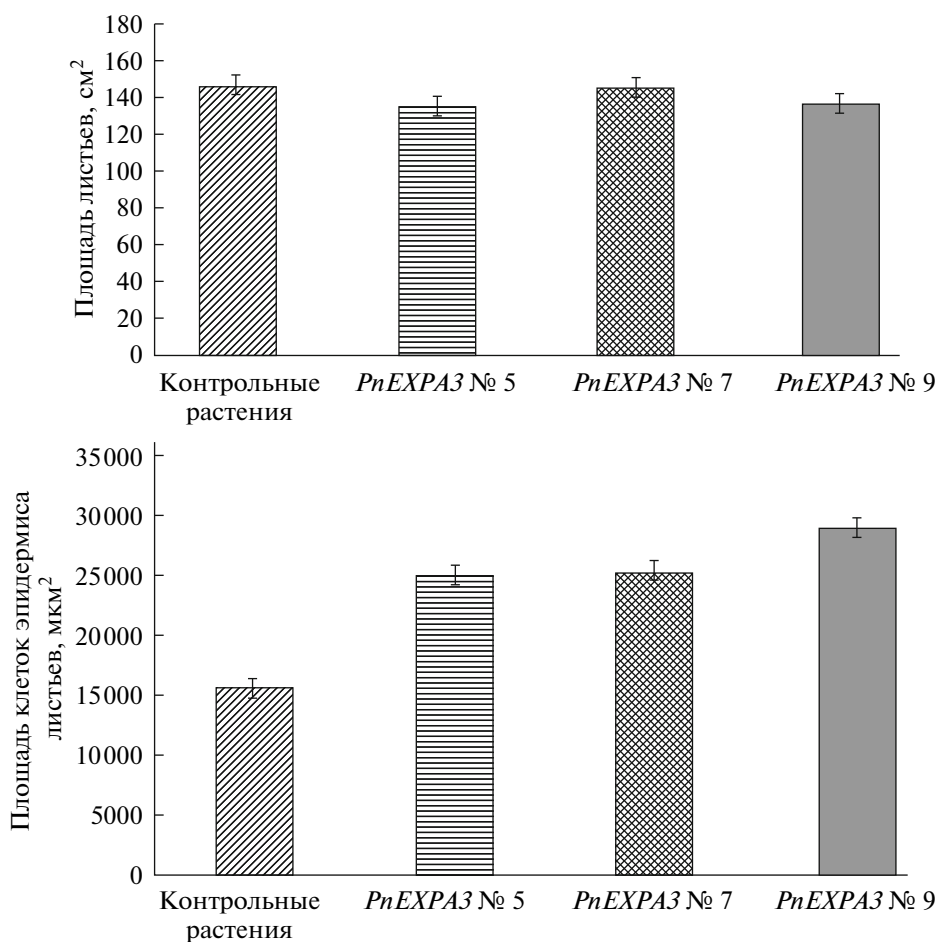
Выявленные различия в размерах клеток эпидермиса сохранялись и при измерении площади клеток мезофилла листьев. Например, клетки мезофилла листьев по сравнению с контролем были увеличены в среднем на 30–40%.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Ген *PnEXPA3* по схожести нуклеотидных последовательностей относится к подгруппе С α-экспансинов (Gray-Mitsumune et al., 2004). Наряду с данным геном в эту подгруппу входят ряд экспансинов арабидопсиса, табака и томатов, из которых изучен лишь ген *AtEXPA10 A. thaliana*. Сверхэксп-



**Рис. 2.** Сравнение клеток нижнего эпидермиса контрольных и трансгенных растений табака: а – клетки эпидермиса листьев контрольных растений табака, увеличение 200×; б, в – клетки эпидермиса листьев трансгенных по гену *PnEXPA3* растений табака, увеличение 200×. Шкала 50 мкм.



**Рис. 3.** Сравнительный анализ площади листьев и размеров клеток нижнего эпидермиса листьев контрольных и трансгенных по гену *PnEXPA3* растений табака.

прессия гена *AtEXPA10* стимулирует рост листьев (Cho, Cosgrove, 2000), а уровень экспрессии гена *PttEXPA3* наиболее высокий в листьях (Gray-Mitsumune et al., 2004). Ранее нами были получены трансгенные по гену *AtEXPA10* растения табака, при этом они отличились увеличением размеров листьев на 30–40% (Кулуев и др., 2012). Поэтому изначально предполагалось, что эктопическая экспрессия гена *PnEXPA3* в трансгенных растениях табака будет в первую очередь стимулировать рост листьев. Однако вопреки ожиданиям, по размерам листьев трансгенные и контрольные растения практически не отличались. Интересно отметить, что стебли у трансгенных по гену *PnEXPA3* растений табака были больше, чем у контрольных растений и сравнимы с трансгенными по генам *AtEXPA10* и *PnEXPA1* растениями табака (Кулуев и др., 2012). Отсюда можно сделать вывод о том, что эктопическая экспрессия гена *PnEXPA3* в первую очередь стимулирует именно рост стебля в длину, а на рост листьев практически не влияет.

Все полученные трансгенные растения отличались увеличением размеров клеток эпидермиса и паренхимы листьев. В среднем величина клеток увеличивалась на 60%, при этом размеры листьев у анализируемых растений оставались в пределах нормы.

Результаты наших исследований показывают, что ген *PnEXPA3* может быть применен для создания трансгенных растений с увеличенными размерами стебля, что может иметь практическое значение в лесной биотехнологии. Применение этого гена для увеличения размеров остальных органов ограничивается компенсаторным механизмом в растениях, направленным на поддержание гомеостаза. Для преодоления этих трудностей необходимо вместо конститутивных использование тканеспецифичных и индуцибельных промоторов, а также, наряду со сверхэкспрессией экспансинов, одновременно стимулировать транскрипцию и биосинтез транскрипционных факторов, регулирующих клеточное деление.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ моп-а № 12-04-31292.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гао К., Лю К., Лю И.Т. Специфическая роль АТЕХР1 при росте и адаптации растений *Arabidopsis* к стрессу // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 2. С. 245–253.
- Кулуев Б.Р., Князев А.В., Лебедев Я.П. и др. Морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих гены экспансинов *AtEXPA10* арабидопсиса и *PnEXPA1* тополя // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 1. С. 108–117.
- Шарова Е.И. Экспансины — белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 805–819.
- Azeez A., Sane A.P., Tripathi S.K. et al. The gladiolus *GgEXPA1* is a GA-responsive alpha-expansin gene expressed ubiquitously during expansion of all floral tissues and leaves but repressed during organ senescence // Postharvest Biology and Technology. 2010. V. 58. P. 48–56.
- Cho H.T., Cosgrove D.J. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 9783–9788.
- Cosgrove D.J., Bedinger P.A., Durachko D.M. Group I allergens of grass pollen as cell wall loosening agents // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 6559–6564.
- Cosgrove D.J. Cell wall loosening by expansins // Plant Physiol. 1998. V. 118. P. 333–339.
- Fry S.C., Smith R.C., Renwick K.F. et al. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants // Biochem. J. 1992. V. 282. P. 821–828.
- Gray-Mitsumune M., Mellerovicz E.J., Abe H. et al. Expansins abundant in secondary xylem belong to subgroup A of the  $\alpha$ -expansin gene family // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 1552–1564.
- Gray-Mitsumune M., Blomquist K., McQueen-Mason S. et al. Ectopic expression of a wood-abundant expansin PttEXPA1 promotes cell expansion in primary and secondary tissues in aspen // Plant Biotechnol. J. 2008. V. 6. P. 62–72.
- Lee Y., Choi D., Kende H. Expansins: over-expanding numbers and functions // Curr. Opin. Plant Biol. 2001. V. 4. P. 527–532.
- McQueen-Mason S., Durachko D., Cosgrove D.J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension // Plant Cell. 1999. V. 4. P. 1425–1433.
- Park C.H., Kim T.W., Son S.H. et al. Brassinosteroids control *AtEXPA5* gene expression in *Arabidopsis thaliana* // Phytochemistry. 2010. V. 71. P. 380–387.
- Rayle D., Cleland R.E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well // Plant Physiol. 1992. V. 99. P. 1271–1274.
- Sampedro J., Cosgrove D.J. The expansin superfamily // Genome Biol. 2005. V. 6. P. 242.1–242.11.

## Morphological Analysis of Transgenic Tobacco Plants Expressing the *PnEXPA3* Gene of Black Poplar (*Populus nigra*)

B. R. Kuluev, M. G. Safiullina, A. V. Knyazev, and A. V. Chemeris

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

**Abstract**—Transgenic tobacco plants overexpressing the *PnEXPA3* gene of black poplar (*Populus nigra*), which encodes  $\alpha$ -expansin, were obtained. The transgenic plants were characterized by increased size of epidermic and mesophyll cells of leaves. However, the size of leaves remained normal. Overexpression of the *PnEXPA3* gene provided stimulatory effect only on the stem length. Other morphological traits of the transgenic plants remained unchanged.

**Keywords:** expansins, cell stretching, organ size, *PnEXPA3*, overexpression, transgenic plants, *Nicotiana tabacum*, *Populus nigra*.

УДК 581.143.28:58.036

## РОЛЬ ФИТОХРОМА В ПРОЦЕССАХ ОРГАНООБРАЗОВАНИЯ У *CUCUMIS SATIVUS* L.

© 2013 г. М. И. Сысоева, Е. Ф. Марковская\*

Институт биологии Карельского научного центра РАН

185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11

\* Петрозаводский государственный университет

185910 Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33

E-mail: sysoeva@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 07.09.12 г.

Окончательный вариант получен 19.11.12 г.

Изучено участие фитохрома В в процессах органогенеза в апикальных и пазушных меристемах побега на ранних этапах онтогенеза огурца *Cucumis sativus* L. при фотопериодах (день/ночь) 10/14, 16/8 ч и круглосуточном освещении на основании сопоставления растений дикого типа и фитохром В-дефицитного мутанта (*lh*-мутант). Показано, что у мутанта дефицит фитохрома В вызывал ингибирование заложения листьев как на главном, так и на боковых побегах растения и способствовал увеличению числа зачатков цветов (IV этап органогенеза). В условиях круглосуточного освещения у растений дикого типа отмечено двухкратное по сравнению с мутантом увеличение числа боковых побегов и цветков на IV этапе органогенеза. Кратковременная низкотемпературная обработка мутантов не индуцировала флоральный органогенез, но увеличивала число боковых побегов в обоих вариантах опыта при длинном фотопериоде и круглосуточном освещении. Высказана гипотеза, что фитохром В, через увеличение компактности хроматина, может способствовать согласованию процессов развития с изменениями условий окружающей среды.

**Ключевые слова:** *Cucumis sativus* L., *lh*-мутант, дикий тип, кратковременные снижения температуры, круглосуточное освещение, фотопериод, органогенез, боковые побеги, зачатки цветков.

DOI: 10.7868/S0475145013030099

Растения, как организмы, ведущие прикрепленный образ жизни, вынуждены согласовывать свой рост и развитие с постоянно изменяющимися условиями окружающей среды, среди которых наиболее важными являются свет и температура. Предполагается, что действие этих факторов связано сигнальными путями, и различные реакции растения (регуляция прорастания и цветения, формирование габитуса, повышение морозостойчивости растений и др.) могут контролироваться этим взаимодействием (Halliday et al., 2003; Franklin, 2009; Franklin, Quail, 2010).

Растения воспринимают световые сигналы фоторецепторами – системой фитохромов. Установлено, что фитохромные фотопревращения являются температурно-зависимыми (Borthwick et al., 1952; Halliday et al., 2003), в связи с чем их рассматривают как кандидатов на роль и температурных сенсоров (Kim et al., 2002; Franklin, 2009). Известно, что фитохромы участвуют в согласовании он-

тогенетических программ с изменяющимися условиями среды (Halliday et al., 2003). В частности, показано, что фитохром В участвует в регуляции термоморфогенетических реакций на действие переменных суточных температур (Sysoeva et al., 2008; Thingnaes et al., 2008; Xiong et al., 2011), роста листьев, наступления цветения (Halliday et al., 1994; Devlin et al., 1996), в процессах закаливания и раззакаливания растений (Сысоева и др., 2013). Значительно меньше внимание уделяется изучению роли фитохрома В в процессах вегетативного органогенеза у растений на ранних этапах онтогенеза, что и явилось целью настоящей работы.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Опыты проводили на растениях огурца (*Cucumis sativus* L.) изогенного дикого типа и мутанте, дефицитном по фитохрому В (*lh*-мутант). Мутант (*lh*) огурца (с длинным гипокотилем) был получен в лаборатории генетики университета Вагенингена

(Нидерланды) (Adamse et al., 1987) и охарактеризован как дефицитный по фитохрому В, содержащий по сравнению с диким типом менее 1% генетических продуктов фитохрома В (López-Juez et al., 1992).

Семена огурца дикого типа и *lh*-мутанта проращивали двое суток в термостате при температуре 28°C, высаживали в вазоны с песком (полив питательным раствором Кнопа с добавлением микроэлементов, рН 6.2–6.4) и помещали в камеры искусственного климата с относительной влажностью воздуха 60–70%, интенсивностью света 100 Вт/м<sup>2</sup> (освещение лампами ДРЛ-400) и фотопериодами (день/ночь) 10/14, 16/8 ч или с круглосуточным освещением. До начала эксперимента растения выращивали при 30°C до выноса семядолей и при 23°C до полного их раскрытия, а затем в течение 6 суток подвергали кратковременным низкотемпературным обработкам (DROP), снижая температуру воздуха с 20 до 12°C на 2 ч ежедневно путем перестановки растений между камерами. В условиях фотопериодов 10/14 и 16/8 ч кратковременное снижение температуры проводили в конце ночного периода, при круглосуточном освещении – в конце 24-часового цикла. Растения контрольного варианта выращивали при температуре 20°C на протяжении всего эксперимента. К концу опыта растения находились в фазе 1-го настоящего листа.

Морфофизиологический анализ проводили на фиксированных в 50%-ном этиловом спирте препаратах с использованием бинокулярной лупы МБС-9 (Россия) по методике Куперман (1984). Определяли число листовых примордиев на главном и боковых побегах, число боковых побегов, зачатков цветков по этапам органогенеза. Все показатели рассчитывали на одно растение. Всего было проведено два независимых опыта в 15-кратной биологической повторности. Данные обрабатывали методами математической статистики с использованием пакета программ Statgraphics. На рисунках приводятся средние по двум независимым опытам и их стандартные ошибки ( $P \leq 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В условиях всех изученных фотопериодов число листьев, заложенных в терминальной меристеме у *C. sativus* L. дикого типа было больше, чем у фитохром В дефицитного мутанта (рисунок, а–в). Особо ярко это проявилось при круглосуточном освещении, когда в терминальной меристеме растений дикого типа было заложено в 2 раза больше листьев, чем у *lh*-мутанта (рисунок, в). DROP не оказывал влияния на закладку листьев в терминальной меристеме как у дикого типа, так и у мутанта.

Число боковых побегов у растений дикого типа и *lh*-мутанта при фотопериодах 10/14 и 16/8 ч было одинаковым (рисунок, г, д), а при круглосуточном

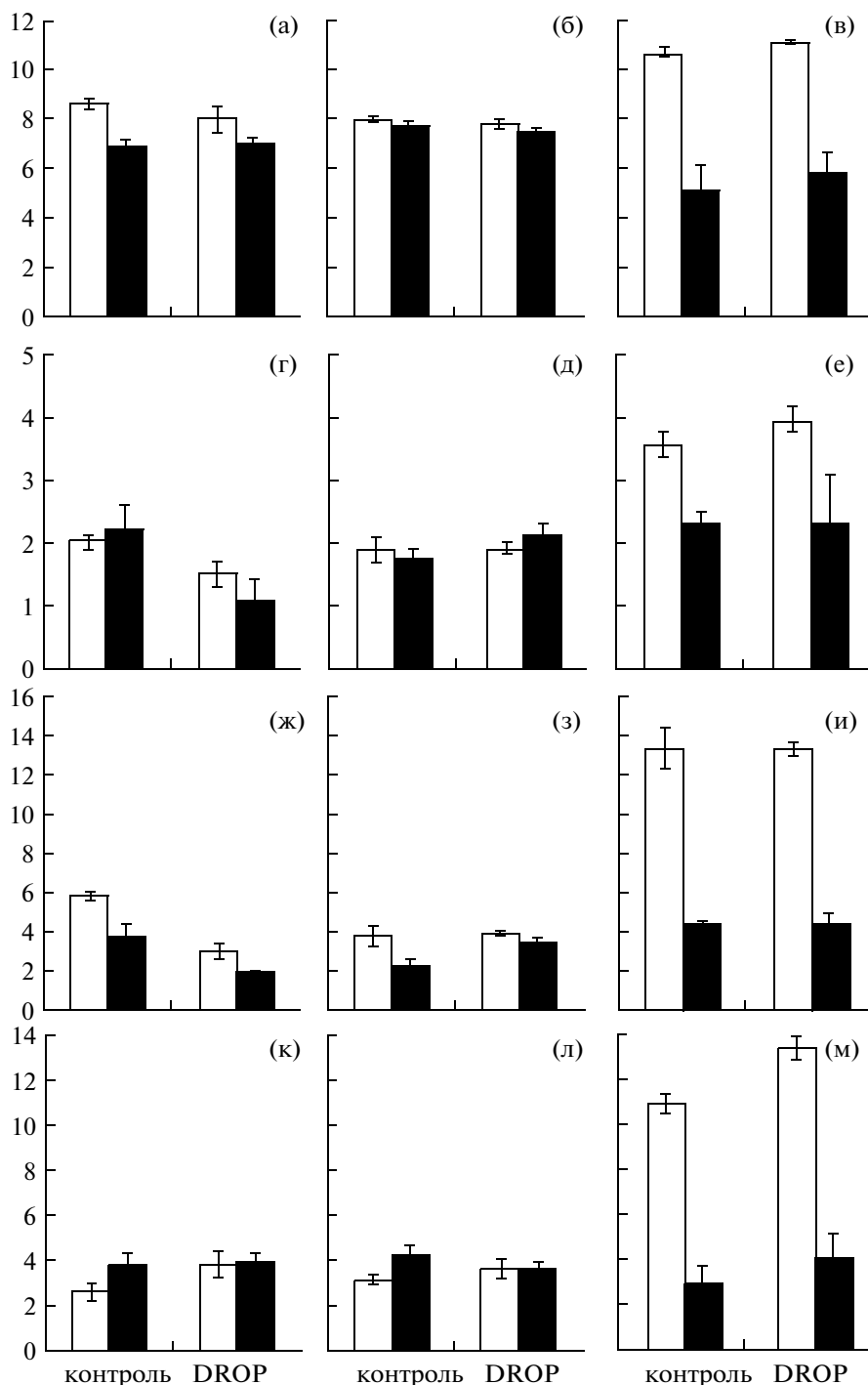
освещении отмечено двукратное увеличение данного показателя у дикого типа по сравнению с *lh*-мутантом (рисунок, е). DROP не влиял на закладку боковых побегов у растений огурца дикого типа и вызвали снижение или увеличение этого показателя у мутантных растений в условиях короткого и длинного фотопериодов, соответственно (рисунок, г, д).

Число листьев на одном боковом побеге у растений огурца дикого типа было больше, чем у *lh*-мутанта при всех изученных фотопериодах, особенно при круглосуточном освещении (рисунок, ж–и). DROP не оказывал влияния на число листьев на боковых побегах у дикого типа и мутанта при круглосуточном освещении, снизил его значение при фотопериоде 10/14 ч и стимулировал – у мутантов при фотопериоде 16/8 ч.

Число зачатков цветков на IV этапе органогенеза при фотопериодах 10/14 и 16/8 ч оказалось больше у мутанта, чем у дикого типа (рисунок, к, л), а при круглосуточном освещении оно снижалось в обоих вариантах опыта (рисунок, м). Ежедневные 2-часовые снижения температуры увеличили число зачатков цветков у дикого типа, но не оказали существенного влияния на флоральный органогенез у мутантных растений.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты дают основание предположить участие фитохрома В в органообразовательных процессах у *Cucumis sativus* L. в условиях разных фотопериодов. Установлено, что при коротком (10/14 ч) и длинном (16/8 ч) фотопериодах фитохром В оказывает различное действие в зависимости от исследуемого показателя органогенеза. Так, дефицит фитохрома В вызывал ингибирование в заложении листьев как на главном, так и на боковых побегах растения. Ранее в литературе отмечалось значительное снижение скорости образования розеточных листьев у фитохром В дефицитного мутанта арабидопсиса (Halliday et al., 2003). Нами впервые показан эффект замедления процесса органогенеза (по скорости развития боковых побегов) у фитохром В-дефицитного мутанта. Отсутствие ингибирующего эффекта по скорости развития главного побега растений дикого типа и мутанта может быть связано с кратковременной (2 ч) продолжительностью этого воздействия, что согласуется с ранее полученными результатами (Сысоева и др., 2007). Однако такие краткосрочные низкотемпературные обработки привели к увеличению числа листьев на побеге при длинном фотопериоде и уменьшению у растений, выращенных на коротком дне. Дефицит фитохрома В не оказал влияния на закладку боковых побегов в условиях обоих фотопериодов, что может лимитироваться условиями освещенности. Известно, что фитохром В и интенсивность света



Влияние ежесуточных кратковременных снижений температуры (DROP) на процессы органогенеза апикальных меристем у растений огурца дикого типа (□) и дефицитного по фитохрому В мутанта (■) в условиях разных фотопериодов. По оси абсцисс – вариант опыта; по оси ординат – число: а–в – листьев на главном побеге; г–е – боковых побегов; ж–и – листьев на одном боковом побеге; к–м – цветков на IV этапе органогенеза. Фотопериоды (день/ночь), ч: 10/14 (а, г, ж, к) 16/8 (б, д, з, л), 24/0 (в, е, и, м).

взаимодействуют в регуляции бокового ветвления у арабидопсиса (Su et al., 2011). Кратковременные снижения температуры вызвали усиление бокового ветвления как у дикого типа, так и у *lh*-мутанта в условиях длинного фотопериода или при кругло-

суточном освещении. Ранее данный эффект отмечался нами для растений огурца (гибрид Зозуля) (Сысоева и др., 2007).

Известно, что фитохром В-дефицитные мутанты являются раннецветущими (Halliday et al.,

2003). Последнее подтверждают и полученные нами в настоящем исследовании данные. В частности, установлено, что у *lh*-мутанта при всех фотопериодах закладывалось больше цветков (IV этап органогенеза), чем у растений дикого типа. Однако у растений, которые были обработаны DROP, данный эффект отсутствовал. Последнее может свидетельствовать об участии фитохрома В в температурном пути регуляции цветения растений. Недавними исследованиями установлено, что ген PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR) усиливает цветение растений при определенной температуре (Kumar et al., 2012).

В условиях отсутствия ритмической смены дня и ночи у дефицитных по фитохрому В мутантов огурца выявлено значительное снижение органообразовательной деятельности меристематической ткани, что свидетельствует о большой роли фитохрома В в процессах развития при непрерывном освещении. Кроме того в условиях круглосуточного фотопериода кратковременные низкотемпературные обработки увеличивали число боковых побегов и цветков на IV этапе органогенеза у растений огурца дикого типа, что согласуется с данными, полученными нами ранее на растениях огурца (гибрид Зозуля) (Сысоева и др., 2007), но не влияли на органообразовательную активность у мутантных растений.

Таким образом, полученные результаты дают основание предполагать, что в условиях круглосуточного освещения фитохром В может выполнять роль координатора процессов органообразования в соответствии с изменяющимися условиями среды. Одним из возможных участников согласования процессов органообразования и флуктуирующих факторов среды может быть реорганизация хроматина и, в частности, изменение его компактности (Fisher, Franklin, 2011). Известно, что мутанты по фитохрому В имеют меньшую компактность хроматина (Tessadori et al., 2009), чем растения дикого типа, а сам хроматин играет важную роль в регуляции активности меристемы (Jarillo et al., 2009), участвуя в контроле экспрессии генов как в активно делящихся недифференцированных, так и в дифференцированных клетках (Jarillo et al., 2009). Причем, в отличие от животных, у которых эпигенетический контроль развития ограничивается периодом эмбриогенеза, у растений эпигенетические механизмы работают в течение всего постэмбрионального периода развития пока активна меристема (Henderson, Jacobsen, 2007). Вероятно, фитохром В, вызывая повышение компактности хроматина, способствует согласованию процессов развития с изменяющимися факторами среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 10-04-0097\_a).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Куперман Ф.М. Морфофизиология растений. М.: Наука, 1984. 239 с.
- Сысоева М.И., Слободяник И.И., Шерудило Е.Г., Василевская Н.В. Влияние ежесуточных кратковременных снижений температуры на процессы органообразования у *Cucumis sativus* L. в условиях разных фотопериодов // Известия РАН. Сер. Биологическая. 2007. № 6. С. 765–767.
- Сысоева М.И., Марковская Е.Ф., Шерудило Е.Г. Роль фитохрома В в холодовом закаливании и раззакаливании растений огурца на свету и в темноте // Физиол. раст. 2013 (в печати).
- Adamse P., Jaspers P.A.P.M., Bakker J.A., Kendrick R.E., Koornneef M. Photophysiology and phytochrome content of long-hypocotyl mutant and wild-type cucumber seedlings // Plant Physiol. 1988. V. 87. P. 264–268.
- Borthwick H.A., Hendriks S.B., Parker M.V. et al. Reversible photoreaction controlling seed germination // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1952. V. 38. P. 662–666.
- Devlin P.F., Halliday K.J., Harberd N.P., Whitelam G.C. The rosette habit of *Arabidopsis thaliana* is dependent upon phytochrome action: novel phytochromes control internode elongation and flowering time // Plant J. 1996. V. 10. P. 1127–1134.
- Fisher A.J., Franklin K.A. Chromatin remodeling in plant signaling // Physiol. Plant. 2011. V. 142. P. 305–313.
- Franklin K.A. Light and temperature signal crosstalk in plant development // Cur. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 63–68.
- Franklin K.A., Quail P.H. Phytochrome functions in *Arabidopsis* development // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. P. 11–24.
- Halliday K.J., Koornneef M., Whitelam G.C. Phytochrome B and at least one other phytochrome mediate the accelerated flowering response of *Arabidopsis thaliana* L. to low Red/Far-Red ratio // Plant Physiol. 1994. V. 4. P. 1311–1315.
- Halliday K.J., Salter M.G., Thingnaes E., Whitelam G.C. Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator *FT* // Plant J. 2003. V. 33. P. 875–885.
- Henderson I.R., Jacobsen S.E. Epigenetic inheritance in plants // Nature. 2007. V. 24. P. 418–424.
- Jarillo J.A., Pineiro M., Cubas P., Martinez-Zapater J.M. Chromatin remodeling in plant development // Intern. J. Devel. Biol. 2009. V. 53. P. 1581–1596.
- Kim H.-J., Kim Y.-K., Park J.-Y., Kim J. Light signaling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-Repeat/Dehydration Responsive Element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2002. V. 229. P. 693–704.
- Kumar S.V., Lucyshyn D., Jaeger K.E. et al. Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering // Nature. 2012. V. 484. P. 242–245.
- López-Juez E., Nagatani A., Tomizawa K.-I. et al. The cucumber long hypocotyle mutant lack a light-stable PHYB-like phytochrome // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 241–251.
- Su H., Abernathy S.D., White R.H., Finlayson S.A. Photosynthetic photon flux density and phytochrome B inter-



- act to regulate branching in *Arabidopsis* // *Plant, Cell Env.* 2011. V. 34. P. 1986–1998.
- Sysoeva M.I., Grete G., Patil, Sherudilo E.G., Sissel Torre, Markovskaya E.F., Roar Moe. Effect of temperature drop and photoperiod on cold resistance in young cucumber plants – involvement of phytochrome B // *Plant Stress.* 2008. V. 2. № 1. P. 84–88.
- Tessadori F., Zanten M., Pavlova P. et al. *Phytochrome B* and *histone deacetylase 6* control light-induced chromatin compaction in *Arabidopsis thaliana* // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. P. 1–13.
- Thingnaes E., Torre S., Moe R. The role of phytochrome B, D and E in thermoperiodic responses of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Growth Regul.* 2008. V. 56. P. 53–59.
- Xiong J., Grindal Patil G., Moe R., Torre S. Effects of diurnal temperature alternations and light quality on growth, morphogenesis and carbohydrate content of *Cucumis sativus* L. // *Sci. Hort.* 2011. V. 128. P. 54–60.

## Role of Phytochrome in Organ Formation Processes in *Cucumis sativus* L.

M. I. Sysoeva<sup>a</sup> and E. F. Markovskaya<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Sciences, ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

*e-mail: sysoeva@krc.karelia.ru*

<sup>b</sup> *Petrozavodsk State University, pr. Lenina 33, Petrozavodsk, 185910 Russia*

**Abstract**—The role of phytochrome B in the organogenesis process in the apical and axillary shoot meristems during early ontogenesis stages in cucumber *Cucumis sativus* L. at photoperiods (day/night) 10/14, 16/8 h, and continuous light in comparison with wild type plants and phytochrome B-deficient mutant (*lh*-mutant) was investigated. In mutant phytochrome B, deficiency caused inhibition of initiation of leaves both in the leading shoot and off-shoots and increased the number of flower buds (IV stage of organogenesis). With continuous light, the number of off-shoots and flowers during stage IV of organogenesis in wild-type plants increased twofold in comparison with the mutant. Short-term temperature drops did not induce floral ontogenesis in mutants but increased the number of off-shoots in both experimental variants during a long photoperiod and continuous light situations. We propose that phytochrome B, by increasing the compactness of chromatin, may facilitate coordination of ontogenesis processes with changing environmental conditions.

**Keywords:** *Cucumis sativus* L., *lh*-mutant, wild type, short-term temperature drop, continuous light, photoperiod, organogenesis, off-shoots, flower buds.

## МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ТКАНЕЙ

УДК 616-018:57.022:576.08

### ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЧИСЛА ТУЧНЫХ КЛЕТОК И ЭОЗИНОФИЛОВ В КОЖЕ ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. В. В. Петров, О. В. Васильева, Н. К. Корнилова, А. Г. Гунин

*Чувашский государственный университет,  
428015 Чебоксары, Московский пр-т, д. 15*

*E-mail: histol@mail.ru*

Поступила в редакцию 16.08.12 г.  
Окончательный вариант получен 20.12.12 г.

В настоящем исследовании проведен анализ содержания одних из эффекторов воспаления — тучных клеток и эозинофилов — в дерме людей разных возрастов. Исследование показало, что число тучных клеток в дерме постепенно увеличивается с возрастом. Эозинофилы очень редко встречаются в дерме человека. Не отмечено возрастных изменений числа эозинофилов в дерме. Установлено возрастное снижение числа фибробластов в дерме человека. Процент PCNA+ (proliferating cells nuclear antigen; ядерный антиген пролиферирующих клеток) фибробластов, демонстрирующая их пролиферативный пул, также достоверно снижается с прогрессированием возраста. Результаты корреляционного анализа показывают, что возрастное увеличение числа тучных клеток достоверно ( $p < 0.05$ ) взаимосвязано с уменьшением общего количества и процента PCNA+ фибробластов в дерме. Следовательно, можно предположить, что возрастание числа тучных клеток в дерме человека с возрастом является одним из механизмов, участвующих в воспалении и появлении признаков старения. Возможно, что тучные клетки, количество которых увеличивается в дерме с возрастом, оказывают влияние на возрастное уменьшение числа фибробластов в дерме.

*Ключевые слова:* кожа, старение, тучные клетки, эозинофилы, фибробласты, пролиферация, PCNA.

DOI: 10.7868/S0475145013030051

#### ВВЕДЕНИЕ

На протяжении жизни кожа у человека претерпевает комплекс морфофункциональных изменений. Главное место среди них занимают изменения в состоянии межклеточного вещества дермы, где происходит ферментативное разрушение и замедление синтеза новых коллагеновых и эластических волокон, уменьшение содержания гиалуроновой кислоты и протеогликанов. Кроме того, в дерме наблюдается изменение архитектоники волокон и накопление фрагментированных коллагеновых и эластических волокон (Kohl et al., 2011; Naylor et al., 2011). Волокна и аморфный компонент соединительной ткани, как и ферменты, участвующие в их разрушении, являются продуктами клеток, локализованных в дерме. Вполне очевидно, что при наличии изменений в составе межклеточного вещества должны происходить изменения и в клеточном составе дермы. Однако возрастные изменения клеточной популяции дермы плохо охарактеризованы. Данные по этому вопросу порой имеют противоречивый характер. К настоящему времени хорошо известно, что с возрастом в дерме человека уменьшается численность фибробластов (Khavkin, Ellis, 2011). Вместе с тем остаются неиз-

вестными фенотипические особенности, функциональная активность дермальных фибробластов в возрастном аспекте. Кроме фибробластов, в дерме присутствуют множество клеток костномозговой природы. К ним относятся лейкоциты, тучные клетки, натуральные киллеры, гематопозитические стволовые клетки (Rijken, Bruijnzeel, 2009; Vukmanovic-Stejic et al., 2011; Wang et al., 2012). Изменения в содержании и функциональной активности всех этих клеток изучены в основном в моделях индуцированного старения кожи, в то время как физиологически возрастные изменения остаются неизвестными (Cho et al., 2009; Kim et al., 2009; Rijken, Bruijnzeel-Koomen, 2011). Имеются противоречивые сведения о возрастных изменениях содержания тучных клеток в дерме человека (Enegbach, Wingren, 1980; Gilchrest et al., 1982; Montagna, Carlisle, 1990). Однако к настоящему времени нет убедительных данных о численности тучных клеток в дерме человека с фетального периода до глубокой старости. Сведения о возрастных изменениях в состоянии популяции эозинофилов в дерме человека отсутствуют в литературе.

Тучные клетки вырабатывают множество высокоактивных биологических продуктов, включая

протеолитические ферменты, факторы роста, цитокины, простагландины, гистамин (Gilfillan et al., 2011; Tsai et al., 2011). Эозинофилы также являются клетками с активной секреторной деятельностью. Среди их секреторных продуктов можно выделить главный основной белок, катионные белки,  $\beta$ -глюкоуридазу, нейротоксин эозинофилов, которые обладает выраженной цитотоксичностью (Akuthota, Weller, 2012). Кроме того, эозинофилы продуцируют интерлейкины, колониестимулирующие факторы, трансформирующий фактор- $\beta$ 1, остеооптин, сосудистый эндотелиальный фактор роста, металлопротеиназы, простагландины, фактор некроза опухолей- $\alpha$  (Kita, 2011). Многие секреторные продукты тучных клеток и эозинофилов оказывают влияние на состояние клеток и внеклеточный матрикс окружающей их соединительной ткани (Iddamalagoda et al., 2008; Amin, 2012). Учитывая это, можно предположить о существенном вкладе этих клеток в возрастные изменения межклеточного вещества дермы и жизнедеятельности фибробластов, и появлении клинических признаков старения кожи. Поэтому наше исследование было сфокусировано на изучении возрастных изменений тучных клеток и эозинофилов в дерме человека.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для работы использовали полученные при аутопсии кусочки кожи с нижней части передней поверхности шеи (верхний угол стандартного разреза кожи при аутопсии) у плодов человека, умерших антенатально на сроке 20–40 недель беременности, и у людей, умерших от различных причин в возрасте от 1 дня до 85 лет. Материал фиксировали в 4% растворе формальдегида, заливали в парафин с последующим изготовлением поперечных срезов толщиной 5–7 мкм.

Тучные клетки выявляли с помощью анализа на триптазу, так как этот фермент является специфичным для тучных клеток (Gilfillan et al., 2011). В настоящее время триптаза рассматривается в качестве маркера тучных клеток (Gilfillan et al., 2011). При иммуногистохимическом выявлении триптазы в качестве первых антител использовали моноклональные антитела к триптазе (M 7052, DakoCytomation, Дания) в разведении 1 : 400.

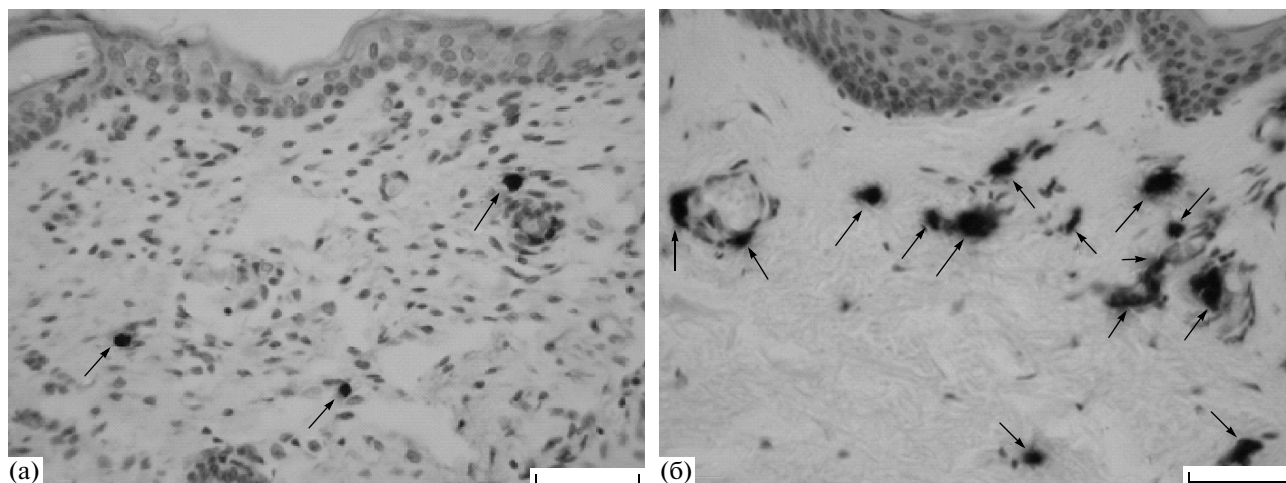
Эозинофилы визуализировали путем выявления главного основного белка эозинофилов. В качестве первых антител использовали два антитела разных производителей (CBL419, Chemicon International, Inc., Billerica, MA, USA; sc-59164, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) в разведении 1 : 50. Пролиферативную активность фибробластов оценивали путем выявления PCNA (proliferating cells nuclear antigen; ядерный антиген пролиферирующих клеток). PCNA+ клетки визуализировали непрямым иммуногистохимическим

методом (Gunin et al., 2004, 2005). В качестве первых антител использовали кроличьи поликлональные антитела против PCNA (AHP1419, AbD Serotec, Oxford, UK) в разведении 1 : 100. Во всех случаях в качестве вторых антител использовали антикроличью EnVision+ систему, конъюгированную с пероксидазой (K4000, K4002, DakoCytomation, Дания). Выявление активности пероксидазы осуществляли методом с 3,3-диаминобензидином (Sigma Chemical Co., США) и перекисью водорода. При данной процедуре продукт реакции окрашивается в коричневый цвет. Ядра клеток контрастировали помещением в гематоксилин на 5 мин. В качестве контроля специфичности иммуногистохимического окрашивания применяли такую же процедуру обработки срезов, где вместо первых антител использовали нормальную козью сыворотку в конечной концентрации – 1%. При использовании такой схемы ни разу не было получено специфического окрашивания. Детальная процедура иммуногистохимического окрашивания описана нами ранее (Gunin et al., 2005).

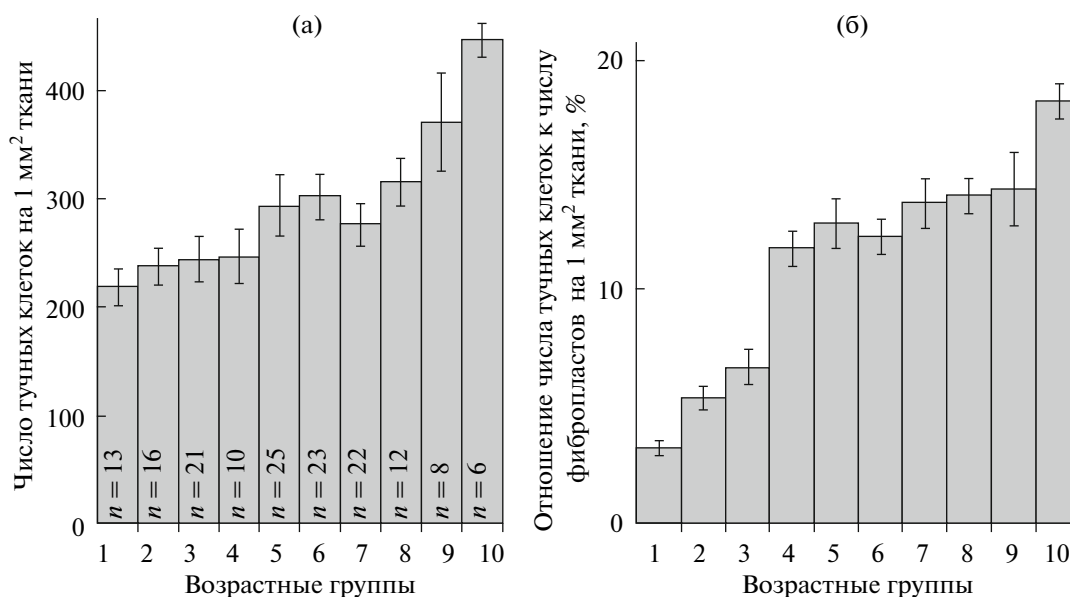
Число фибробластов определяли в препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Число тучных клеток, эозинофилов, PCNA+ фибробластов и общее количество фибробластов определяли с помощью микроскопа Olympus CX-21, цифровой камеры Olympus Camedia 4040z и программы Sigma Scan Pro 5.0. Для этого находили участки дермы без волосяных фолликулов и кровеносных сосудов, которые фотографировали при увеличении объектива 40 $\times$  (Gunin et al., 2004, 2005). Затем вычисляли площадь сфотографированных участков и подсчитывали количество соответствующих клеток в них. Как минимум 10 случайно выбранных участков среза кожи анализировали в каждом случае.

Для подсчета числа тучных клеток были использованы 156 кусочков кожи (110 мужчин и 46 женщин). Для анализа числа эозинофилов в дерме использовано 46 кусочков кожи. Для подсчета числа фибробластов были использованы 357 кусочков кожи (218 мужчин и 139 женщин). Для исследования числа PCNA положительных клеток было использовано 139 кусочков кожи (104 мужчины и 35 женщин). Для антенатального периода все случаи группировали в 10-недельные промежутки: 20–30 недель беременности (группа 1), 31–40 недель беременности (группа 2). Для постнатального периода все случаи группировали по 10-годовым интервалам: 1–10 лет (группа 3), 11–20 лет (группа 4), 21–30 лет (группа 5), 31–40 лет (группа 6), 41–50 лет (группа 7), 51–60 лет (группа 8), 61–70 лет (группа 9). Группа 10 сформирована с 71 до 85 лет.

По каждой группе данных рассчитывали средние арифметические величины (M) и их стандартные ошибки (m). Достоверность влияния возраста или пола на исследуемые параметры кожи оцени-



**Рис. 1.** Тучные клетки (показаны стрелками) в коже человека при сроке беременности 32 недели (а) и в возрасте 62 лет (б). Видно существенное увеличение числа тучных клеток в дерме у человека 62 лет. Иммуногистохимическая реакция на триптазу тучных клеток. Участок шкалы – 50 мкм.



**Рис. 2.** Число тучных клеток (а), процентное соотношение тучных клеток к фибробластам (б) в дерме людей различного возраста ( $M \pm m$ ). Разделение на возрастные группы указано в разделе “Материалы и методы”.  $n$  – Количество случаев.

вали с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Взаимосвязи между возрастом и параметрами кожи оценивали с применением непараметрического рангового корреляционного анализа Спирмена. Корреляционный анализ выполняли без разделения данных на возрастные группы. Достоверными считали отличия при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Тучные клетки выявлялись в коже человека во всех возрастных группах. Однако в препаратах

плодов и молодых людей тучные клетки встречались редко. С прогрессированием возраста число тучных клеток возрастало, и в материале от лиц пожилого возраста тучные клетки визуализировались достаточно часто (рис. 1, 2). Так, у плодов на сроке 20–30 недель беременности (1 группа) было выявлено  $218.78 \pm 16.88$  ( $M \pm m$ ) тучных клеток на 1 мм² ткани дермы (рис. 1, 2). А в возрасте 31–40 лет (6 группа) в дерме насчитывалось  $303.02 \pm 19.84$  ( $M \pm m$ ) тучных клеток в 1 мм² ткани (рис. 1, 2). В возрасте 71–85 лет (10 группа) в дерме выявлено

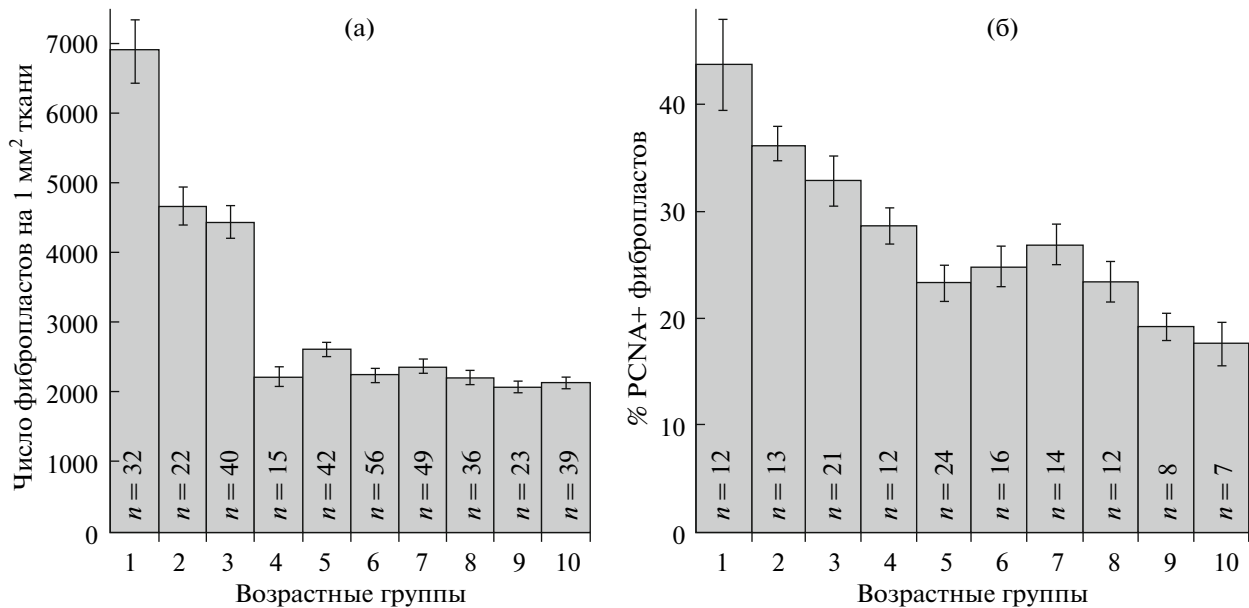


Рис. 3. Число фибробластов (а), число PCNA+ фибробластов (б) в дерме людей различного возраста ( $M \pm m$ ). Разделение на возрастные группы указано в разделе “Материалы и методы”.  $n$  – Количество случаев.

447.77 ± 15.44 ( $M \pm m$ ) тучных клеток на 1 мм<sup>2</sup> ткани (рис. 2). Корреляционный анализ между изменениями возраста и числом тучных клеток выявил высокую достоверную положительную зависимость ( $r = 0.37$ ,  $p < 0.05$ ). Однофакторный дисперсионный анализ также показал достоверное ( $p < 0.001$ ) влияние возраста на число тучных клеток в дерме. Кроме определения общего количества тучных клеток в дерме на единицу площади, был подсчитан процент тучных клеток по отношению к числу фибробластов (рис. 2). Результаты показали более выраженное возрастное увеличение числа тучных клеток в дерме (рис. 2). Корреляционный анализ между изменениями возраста и процента тучных клеток в дерме показал наличие высокой положительной достоверной взаимосвязи ( $r = 0.69$ ,  $p < 0.05$ ). Однофакторный дисперсионный анализ также выявил достоверное ( $p < 0.001$ ) влияние возраста на изменение процента тучных клеток в дерме человека.

В дерме плодов, людей молодого, среднего и пожилого возрастов эозинофилы встречались крайне редко. В большинстве случаев лишь единичный эозинофил обнаруживался в целом срезе ткани. Имелись также препараты, в которых не удалось обнаружить эозинофилов. Возрастных изменений в содержании эозинофилов в дерме не отмечено.

В дерме плодов человека визуализировались многочисленные фибробласты и небольшое количество межклеточного вещества. Показано, что число фибробластов в дерме снижается с возрастом (рис. 3). В дерме пожилых людей превалировало межклеточное вещество, в котором разреженно

располагались фибробласты. Наиболее значительное снижение числа фибробластов было видно на протяжении от пренатального периода до 11–20 лет. В последующих возрастных группах практически не наблюдалось дальнейшего уменьшения числа фибробластов в дерме. Корреляционный анализ между изменениями возраста и числом фибробластов в дерме показал наличие достоверной высокой отрицательной взаимосвязи ( $r = -0.61$ ;  $p < 0.05$ ). Однофакторный дисперсионный анализ выявил наличие достоверного влияния ( $p < 0.001$ ) возраста на число фибробластов в дерме.

В дерме плодов человека и людей раннего возраста визуализировались многочисленные PCNA+ фибробласты. Их число прогрессивно уменьшалось с возрастом (рис. 3). В препаратах 1 группы (20–30 недель беременности) было выявлено 43.8% PCNA+ клеток в дерме, а в препаратах 10 группы (71–85 лет) – 17.6%. Корреляционный анализ между изменениями возраста и числом PCNA+ клеток в дерме показал наличие высокой отрицательной достоверной зависимости ( $r = -0.54$ ;  $p < 0.05$ ). Однофакторный дисперсионный анализ выявил наличие достоверного влияния ( $p < 0.001$ ) возраста на изменения числа PCNA+ фибробластов в дерме.

В исследовании использован материал, полученный от плодов мужского и женского пола, мужчин и женщин. Был проведен анализ половых различий для возрастных изменений параметров дермы. Для этого был выполнен однофакторный дисперсионный анализ, где в качестве фактора использована половая принадлежность. Результаты

этого анализа не выявили достоверного ( $p < 0.05$ ) влияния пола на изменения числа тучных клеток, общего числа и количества PCNA+ фибробластов в дерме.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящего исследования демонстрируют, что в дерме человека с 20 недель беременности и до 85 лет присутствуют тучные клетки, количество которых увеличивается с возрастом. Возможно, возрастание числа тучных клеток связано с воспалительными процессами, протекающими в дерме на протяжении жизни. Воспаление в дерме может быть индуцировано как внешними, так и внутренними факторами, включая ультрафиолетовое облучение, изменения температуры и влажности окружающей среды, компоненты пищи, токсические метаболиты. Клетки эпидермиса, фибробласты дермы, клетки сосудов, лейкоциты, макрофаги, вовлеченные в воспалительный процесс, продуцируют факторы, привлекающие в место воспаления лейкоциты, тучные клетки (Levakov et al., 2012; Wolf et al., 2012). Клетки воспалительного очага активируются и начинают вырабатывать множество биологически-активных веществ, среди которых также имеются факторы, способствующие привлечению новых тучных клеток (Hwang et al., 2011). С течением времени воспалительные процессы в дерме повторяются, что и, возможно, приводит к возрастному увеличению числа тучных клеток. Данные других исследований демонстрируют нарастание количества тучных клеток в дерме при ультрафиолетовом облучении (Harvima, Nilsson, 2011).

Не исключено, что возрастному увеличению числа тучных клеток в дерме способствуют не только воспалительные процессы, но и другие реакции связанные с локальным высвобождением цитокинов лейкоцитами и самими тучными клетками. Высвобождение цитокинов и изменение микроциркуляции в коже наблюдается при адаптации к изменениям внешней температуры (Iddamalgoda et al., 2008; Kenny, Journeay, 2010). Известно, что тучные клетки являются активными участниками подобных адаптационных механизмов (Kenny, Journeay, 2010). Таким образом, вполне возможно, что колебания температуры окружающей среды и изменения в продукции тепла в организме требуют наличия в коже эффекторов, которые могли бы адекватно регулировать ее микроциркуляцию для обеспечения терморегуляции.

Возможен и другой механизм возрастного увеличения числа тучных клеток в дерме. Тучные клетки являются потомками гематопоэтических стволовых клеток (Gilfillan et al., 2011), которые описаны в дерме человека (Vukmanovic-Stejic et al.,

2011; Wang et al., 2012). Следовательно, возрастное увеличение числа тучных клеток в дерме может происходить за счет дифференцировки предшественников тучных клеток непосредственно в дерме. Подобный механизм дифференцировки тучных клеток из предшественников в дерме описан в модельных экспериментах по ксенотрансплантации CD34+ клеток пуповинной крови в кожу (Nakahata, Toru, 2002).

Как следует из полученных нами результатов, число фибробластов в дерме снижается на ранних стадиях онтогенеза с пренатального периода до 20 лет. Дальнейшего снижения числа фибробластов не отмечено. Число PCNA+ фибробластов уменьшается плавно с возрастом за все сроки наблюдения. Таким образом, в ранние периоды онтогенеза снижение числа PCNA+ фибробластов сочетается с уменьшением общего числа фибробластов, а начиная с 20-и лет уменьшение числа PCNA+ фибробластов не ассоциировано с уменьшением общего числа фибробластов. PCNA является маркером пролиферирующих клеток, или клеток находящихся в клеточном цикле, а не в  $G_0$ -периоде (Gunin et al., 2005). Следовательно, можно предположить, что в ранние стадии онтогенеза снижение общего числа фибробластов в дерме обусловлено уменьшением доли клеток, находящихся в клеточном цикле. Возможно, что в более поздние стадии онтогенеза (с 20-лет) стабилизация популяции фибробластов достигается путем увеличения продолжительности их жизни за счет удлинения  $G_0$ -периода, во время которого клетки не содержат PCNA.

Настоящее исследование выявило взаимосвязь между возрастным увеличением числа тучных клеток и снижением числа фибробластов в дерме. Была также обнаружена отрицательная корреляционная взаимосвязь между увеличением числа тучных клеток и уменьшением числа PCNA+ фибробластов. Нельзя исключить, что изучаемые популяции изменяют свою численность независимо друг от друга под влиянием общих причин. В то же время можно предположить, что уменьшение числа фибробластов и их пролиферативного пула обусловлено деятельностью тучных клеток. Механизмы этих взаимоотношений не ясны. Можно предположить, что данный эффект обусловлен секреторными продуктами тучных клеток. Тучные клетки являются источником высокотоксичных веществ, которые способны оказывать влияние на синтез белков, необходимых для прохождения клеток по клеточному циклу, а также приводить к нарушению функций и к гибели фибробластов (Gilfillan et al., 2011; Naylor et al., 2011).

Наши результаты показали практически полное отсутствие эозинофилов в дерме человека независимо от возраста. Другие исследователи также отметили, что в норме в дерме человека имеется очень незначительное количество эозинофилов (Steigleder, Inderwisch, 1975; Leiferman et al., 1989). Вместе с тем имеется множество заболеваний кожи, в патогенезе которых эозинофилам отводится немаловажная роль (Steigleder, Inderwisch, 1975). Эозинофилия в дерме также продемонстрирована после ультрафиолетового облучения (Leiferman et al., 1989). Поэтому эозинофилы как источник высокотоксичных продуктов потенциально могут вносить свой вклад в возрастные изменения в коже.

Таким образом, работа показала, что число тучных клеток в дерме человека прогрессивно увеличивается, а общее количество фибробластов и PCNA+ фибробластов в дерме уменьшается с течением жизни. Возрастное увеличение числа тучных клеток в дерме статистически взаимосвязано с уменьшением общей численности фибробластов и PCNA+ фибробластов. Возрастное увеличение числа тучных клеток в дерме следует рассматривать в качестве существенного механизма, реализующего воспалительную реакцию и появление признаков старения. Эозинофилы встречаются очень редко в дерме человека, и их популяция не обнаруживает возрастных изменений.

Исследование поддержано РФФИ (12-04-00005, 12-04-31605), Минобрнауки России (4.1166.2011), ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (2012-1.3.2-12-000-1002-023).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Akuthota P., Weller P.F.* Eosinophils and disease pathogenesis // *Semin. Hematol.* 2012. V. 49. P. 113–119.
- Amin K.* The role of mast cells in allergic inflammation // *Respir. Med.* 2012. V. 106. P. 9–14.
- Cho S., Shin M.H., Kim Y.K. et al.* Effects of infrared radiation and heat on human skin aging *in vivo* // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2009. V. 14. P. 15–19.
- Enerback L., Wingren U.* Histamine content of peritoneal and tissue mast cells of growing rats // *Histochemistry.* 1980. V. 66. P. 113–124.
- Gilchrest B.A., Stoff J.S., Soter N.A.* Chronologic aging alters the response to ultraviolet-induced inflammation in human skin // *J. Invest. Dermatol.* 1982. V. 79. P. 11–15.
- Gilfillan A.M., Austin S.J., Metcalfe D.D.* Mast cell biology: introduction and overview // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011. V. 716. P. 2–12.
- Gunin A.G., Bitter A.D., Demakov A.B. et al.* Effects of peroxisome proliferator activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  agonists on estradiol-induced proliferation and hyperplasia formation in the mouse uterus // *J. Endocrinol.* 2004. V. 182. P. 229–239.
- Gunin A.G., Kapitova I.N., Suslonova N.V.* Effects of histone deacetylase inhibitors on estradiol-induced proliferation and hyperplasia formation in the mouse uterus // *J. Endocrinol.* 2005. V. 185. P. 539–549.
- Harvima I.T., Nilsson G.* Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity // *Acta. Derm. Venereol.* 2011. V. 91. P. 644–650.
- Hwang K.A., Yi B.R., Choi K.C.* Molecular mechanisms and *in vivo* mouse models of skin aging associated with dermal matrix alterations // *Lab. Anim. Res.* 2011. V. 27. P. 1–8.
- Iddamalgoda A., Le Q.T., Ito K. et al.* Mast cell tryptase and photoaging: possible involvement in the degradation of extra cellular matrix and basement membrane proteins // *Arch. Dermatol. Res.* 2008. V. 300. S. 1. P. S69–S76.
- Kenny G.P., Journeay W.S.* Human thermoregulation: separating thermal and nonthermal effects on heat loss // *Front. Biosci.* 2010. V. 15. P. 259–290.
- Khavkin J., Ellis D.A.* Aging skin: histology, physiology, and pathology // *Facial. Plast. Surg. Clin. North. Am.* 2011. V. 19. P. 229–234.
- Kim M.S., Kim Y.K., Lee D.H. et al.* Acute exposure of human skin to ultraviolet or infrared radiation or heat stimuli increases mast cell numbers and tryptase expression in human skin *in vivo* // *Br. J. Dermatol.* 2009. V. 160. P. 393–402.
- Kita H.* Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease // *Immunol. Rev.* 2011. V. 242. P. 161–177.
- Kohl E., Steinbauer J., Landthaler M., Szejmies R.M.* Skin ageing // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2011. V. 25. P. 873–884.
- Leiferman K.M., Norris P.G., Murphy G.M. et al.* Evidence for eosinophil degranulation with deposition of granule major basic protein in solar urticaria // *J. Am. Acad. Dermatol.* 1989. V. 21. P. 75–80.
- Levakov A., Vuckovic N., Dolai M. et al.* Age-related skin changes // *Med. Pregl.* 2012. V. 65. P. 191–195.
- Montagna W., Carlisle K.* Structural changes in ageing skin // *Br. J. Dermatol.* 1990. V. 122. S. 35. P. 61–70.
- Nakahata T., Toru H.* Cytokines regulate development of human mast cells from hematopoietic progenitors // *Int. J. Hematol.* 2002. V. 75. P. 350–356.
- Naylor E.C., Watson R.E., Sherratt M.J.* Molecular aspects of skin ageing // *Maturitas.* 2011. V. 69. P. 249–256.
- Rijken F., Bruijnzeel-Koomen C.A.* Photoaged skin: the role of neutrophils, preventive measures, and potential pharmacological targets // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011. V. 89. P. 120–124.
- Rijken F., Bruijnzeel P.L.* The pathogenesis of photoaging: the role of neutrophils and neutrophil-derived enzymes // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2009. V. 14. P. 67–72.
- Steigleder G.K., Inderwisch R.* Eosinophilic leucocytes in the skin lesions of psoriasis and atopic dermatitis // *Arch. Dermatol. Res.* 1975. V. 254. P. 253–255.

*Tsai M., Grimaldeston M., Galli S.J.* Mast cells and immunoregulation/immunomodulation // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011. V. 716. P. 186–211.

*Vukmanovic-Stejic M., Rustin M.H., Nikolich-Zugich J., Akbar A.N.* Immune responses in the skin in old age // *Curr. Opin. Immunol.* 2011. V. 23. P. 525–531.

*Wang Y., Sun Y., Yang X.Y. et al.* Mobilised bone marrow-derived cells accelerate wound healing // *Int. Wound. J.* 2012. doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.01007.x

*Wolf J., Weinberger B., Arnold C.R. et al.* The effect of chronological age on the inflammatory response of human fibroblasts // *Exp. Gerontol.* 2012. doi: 10.1016/j.exger.2012.07.001

## Age-Related Changes in Mast Cells and Eosinophils of Human Dermis

**V. V. Petrov, O. V. Vasilyeva, N. K. Kornilova, and A. G. Gunin**

*Chuvashia State University, Moskovskii pr. 15, Cheboksary, 428015 Russia*

*e-mail: histol@mail.ru*

**Abstract**—In this study, quantitative analysis of inflammatory effectors—mast cells and eosinophils—in derma of people of different ages is performed. The study shows that mast cell quantity in derma increases with age. Eosinophils are rarely observed in human dermis. There are no age-correlated changes of dermal eosinophils quantity observed. Age-correlated dermal fibroblast quantity is established. PCNA+ fibroblast percentage demonstrating their proliferative pool also reliably decreases with age. Results of correlation analysis show that age-correlated increase in mast cells' quantity is reliably correlated with decrease in total number and percentage of PCNA+ fibroblasts in derma. Consequently, age-correlated increase in dermal mast cell may be proposed to be one of the inflammatory and aging mechanisms. Mast cells, whose number increases with aging, may influence dermal fibroblast number with aging.

**Keywords:** dermis, aging, mast cells, eosinophils, fibroblasts, proliferation, PCNA.



УДК 591

## РОЛЬ ВИМЕНТИНА В МИГРАЦИИ КЛЕТОК

© 2013 г. И. С. Черноиваненко<sup>1</sup>, Ан. А. Минин<sup>1</sup>, А. А. Минин<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Институт белка РАН,  
142290 Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 4  
E-mail: alexminin@gmail.com

Поступила в редакцию 09.08.12 г.

Окончательный вариант получен 22.11.12 г.

Миграция клеток является процессом, играющим роль в эмбриональном развитии, заживлении ран и регенерации, воспалении и иммунном ответе, а также метастазировании злокачественных опухолей. Виментин — один из маркеров мигрирующих клеток, но его роль в миграции клеток остается недостаточно изученной. Однако в последнее время появляется все больше данных о новых функциях виментина, связанных с миграцией, таких как определение полярности мигрирующей клетки, регуляция образования различных клеточных контактов, организация и транспорт сигнальных белков, участвующих в регуляции клеточной подвижности. В обзоре суммированы последние представления о функциях виментина и его участии в молекулярных механизмах, лежащих в основе миграции клеток.

Ранние работы показали, что экспрессия виментина в процессе эмбрионального развития ассоциирована с мигрирующими клетками. Однако после получения мышей, нокаутных по гену виментина, но без видимых нарушений в развитии и способности к размножению, появились большие сомнения в необходимости виментина для миграции клеток в эмбриональном развитии. В настоящем обзоре мы также рассматриваем проблему участия виментина в процессах миграции на разных стадиях развития и делаем попытку объяснить существующие противоречия в трактовке роли виментина в различных событиях клеточной миграции.

*Ключевые слова:* миграция клеток, виментин, промежуточные филаменты, эмбриональное развитие.

DOI: 10.7868/S0475145013030026

### ВВЕДЕНИЕ

Миграция представляет собой направленное движение клеток в ответ на внеклеточные стимулы, такие как цитокины и факторы роста, а также изменение химических или механических свойств субстрата. В многоклеточном организме в нормальных условиях миграция наряду с адгезией клеток разных типов и клеточных пластов является универсальным процессом, который определяет формирование и поддержание правильного расположения многоклеточных структур, а при эмбриогенезе — формирование различных органов и тканей. При повреждениях органов и тканей миграция клеток играет ведущую роль в защитных процессах, таких, как заживление ран, воспаление, иммунный ответ. Генетические дефекты механизмов миграции клеток приводят как к нарушениям развития организма в целом или даже гибели эмбриона, так и к нарушению его отдельных функций во взрослом состоянии. Особое место занимает миграция клеток в канцерогенезе, так как лежит в основе метастазирования раковых опухолей (Comen et al., 2011).

В основе миграции лежит клеточная подвижность: как перемещение внутриклеточных компонентов и структурных элементов клетки, так и движение самой клетки относительно субстрата. В мигрирующих клетках внутриклеточная подвижность характеризуется полярной морфологией — имеется передний и задний край, при этом на переднем крае образуются выросты, так называемые ламеллоподии и филоподии, которые обеспечивают протрузию переднего края клетки, а в остальной клетке и ее задней части преобладают актомиозиновые пучки или стресс-фибриллы, сокращение которых обеспечивает подтягивание тела клетки. Недавно появилась новая работа, в которой обнаружен новый тип миграции клеток в 3D-окружении, в этом случае на переднем крае клетки образуются так называемые лобоподии (Petrie et al., 2012). Для того чтобы клетка двигалась в определенном направлении, она должна поддерживать правильно ориентированную полярность на протяжении всего движения. Механизмы, определяющие выбор и поддержание определен-

ного направления, интенсивно изучаются на протяжении нескольких десятков лет.

Полярная морфология клетки формируется и поддерживается цитоскелетом. В обеспечении полярности участвуют все три основных компонента цитоскелета – актиновые микрофиламенты, микротрубочки и промежуточные филаменты (Pollard, Borisy, 2003). Актин выполняет двоякую роль в миграции клеток. С одной стороны, актиновые микрофиламенты являются компонентом цитоскелета, обеспечивающим механическую основу движения клетки. С другой стороны регуляция формирования актинового цитоскелета играет основную роль в поляризации клетки. Полимеризация актиновых микрофиламентов на переднем крае обеспечивает рост ламеллоподий и филоподий, а в задней части клетки происходит сокращение стресс-фибрилл, которые представляют собой пучки актиновых и миозиновых филаментов. Формирование структур актинового цитоскелета разных типов в разных частях мигрирующей клетки регулируется внешними факторами через систему регуляторных белков и вторичных посредников. Важнейшую роль при этом играют малые ГТФ-азы семейства Rho, включая Rac1, RhoA и Cdc42. Регулируемая активность малых ГТФ-аз лежит в основе клеточной подвижности, связанной с актином, а полярная регуляция активности этих белков в цитоплазме обеспечивает переднезаднюю полярность организации актиновых структур в мигрирующей клетке (Pollard, Borisy, 2003).

Микротрубочки также играют важную роль в определении направления движения клетки. Преимущественная переднезадняя направленность микротрубочек в поляризованной клетке поддерживает вытянутую морфологию мигрирующей клетки. Кроме того, участвуя в регуляции активности малых ГТФ-аз, система микротрубочек участвует в формировании полярности клетки: на переднем крае клетки она определяет места формирования ламеллоподий и активирует полимеризацию актина через Rac1 (Vasiliev et al., 1970; Wittmann, Waterman-Storer, 2001); на заднем крае – влияет на сократимость актомиозиновых комплексов через RhoA (Krendel et al., 2002). Кроме того, микротрубочки обеспечивают полярное распределение различных органелл и их правильное позиционирование в мигрирующей клетке за счет транспорта.

Роль в миграции клеток третьего основного компонента цитоскелета – промежуточных филаментов (ПФ) – изучена значительно хуже. Белки ПФ, одним из которых является виментин, очень разнообразны. На разных этапах эмбрионального развития, на разных стадиях дифференцировки, в разных типах клеток экспрессируются ПФ, состо-

ящие из разных белков. В процессе дифференцировки набор белков ПФ в одной клетке может сильно изменяться.

В наиболее изученных мигрирующих клетках взрослого организма, фибробластах и лейкоцитах, виментин экспрессируется в качестве основного белка ПФ (Franke et al., 1978; Fuchs, Weber, 1994). Предположения о том, что экспрессия виментина в клетках связана с их способностью к миграции, были высказаны около 30 лет назад (Osborn, Weber, 1983). К настоящему времени получено большое количество экспериментальных данных, подтверждающих важную роль виментина в клеточной миграции. Особое развитие это направление исследований получило после получения мышей, нокаутных по гену виментина (Eckes et al., 2000). У этих мышей в первую очередь были изучены процессы, связанные с миграцией клеток. В частности, было показано, что у мышей, лишенных виментина, нарушен процесс заживления ран (Eckes et al., 2000). У фибробластов, полученных из таких мышей, нарушена способность к направленной миграции и сокращению (Eckes et al., 1998). Выход лимфоцитов в ткани и лимфатическую систему сквозь стенки сосудов у таких мышей также нарушен (Nieminen et al., 2006).

Важные сведения о роли виментина в миграции клеток были получены при изучении раковых опухолей различного происхождения. Показано, что экспрессия виментина в раковых клетках коррелирует с появлением у них способности к миграции и инвазии в окружающие ткани (Sommers et al., 1992; Santini et al., 1996; Gilles et al., 1999). Для клеток многих опухолей эпителиального происхождения экспрессия виментина характерна при метастазировании. Она сопровождается увеличением подвижности и инвазивности клеток опухоли (Hendrix et al., 1996; Wei et al., 2008; Mendez et al., 2010). Подавление экспрессии виментина в опухолевых клетках приводит к снижению их подвижности и способности к инвазии (McInroy, Maatta, 2007).

Несмотря на многочисленные факты, указывающие на роль виментина в миграции клеток, молекулярные механизмы его участия в этом процессе долгое время оставались неясными. Однако в последнее время появляется все больше данных о новых функциях виментина, связанных с миграцией, таких как определение полярности мигрирующей клетки, регуляция образования различных клеточных контактов, организация и транспорт различных сигнальных белков, участвующих в регуляции клеточной подвижности.

Важной нерешенной проблемой до сих пор остается участие виментина в миграции клеток в эмбриональном развитии. Ранние работы по анализу экспрессии виментина в процессе эмбриогенеза

неза показали, что у млекопитающих и птиц экспрессия виментина ассоциирована с мигрирующими клетками. Эти факты были получены при изучении клеток, мигрирующих через первичную полосу при гаструляции (Frankel et al., 1982; Page, 1989), а также клеток нервного гребня (Bronner-Fraser et al., 1991). Однако после получения мышей, нокаутных по гену виментина без видимых нарушений в развитии и размножении (Colucci-Guyon et al., 1994), появились большие сомнения в непосредственном участии виментина в процессах миграции клеток в эмбриогенезе. Таким образом, возникло противоречие: с одной стороны, существуют многочисленные наблюдения, свидетельствующие о важной роли виментина в миграции клеток взрослого организма, наблюдается экспрессия виментина в мигрирующих клетках зародыша, а с другой стороны — процессы эмбриогенеза у мышей, лишенных виментина, не обнаруживают видимых нарушений.

В настоящем обзоре всесторонне рассмотрена проблема участия виментина в процессах миграции клеток на основе современных представлений о его функциях в молекулярных клеточных процессах. Одной из главных задач при написании статьи было объяснение существующих противоречий в трактовке роли виментина в различных событиях клеточной миграции в эмбриогенезе на основе предлагаемой авторами гипотезы. Для этого были проанализированы основные механизмы и параметры миграции клеток, как на основе литературных, так и собственных экспериментальных данных. Основное внимание при этом было уделено изученным наиболее подробно на клеточных культурах функциям виментина, связанным с механизмами поляризации клетки.

## ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ И ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МИГРАЦИИ КЛЕТОК

### *Миграция фибробластов в культуре.*

#### *Роль актинового цитоскелета.*

#### *Фокальные контакты*

Основные закономерности миграции клеток, связанные с механизмами поляризации, а также клеточной подвижности, были изучены наиболее подробно на модельных системах клеточных культур. Именно поэтому описание основных механизмов миграции будет дано именно для фибробластов в культуре.

Миграция клетки представляет собой сложный циклический многостадийный процесс. Движение в определенном направлении начинается с поляризации, которая заключается в приобретении клеткой асимметричной формы с выраженным передним краем (ламеллой) и отстающим (задним) краем клетки. Таким образом, движение клетки

можно разделить на следующие стадии: 1) формирование выростов на переднем крае клетки (ламеллоподий и филоподий); 2) интегрин-зависимое прикрепление клетки к субстрату путем образования фокальных контактов; 3) сокращение акто-миозиновых цитоскелетных структур и подтягивание заднего края клетки; 4) открепление заднего края от субстрата (Ridley et al., 2003). Рассмотрим последовательно процессы поляризации и перемещения клетки, которые определяют ее миграцию в определенном направлении.

1) Образование выростов на переднем крае клетки обеспечивается полимеризацией актина. В ламеллоподиях формируется разветвленная сеть, состоящая из отдельных микрофиламентов. В филоподиях актин образует пучки параллельных микрофиламентов, скрепленных между собой актин-связывающими белками. При этом и в ламеллоподиях, и филоподиях растущие (“плюс”) концы актиновых филаментов “толкают” мембрану вперед по направлению движения. В это же время происходит разборка “минус” концов актиновых филаментов, направленных в сторону центра клетки, освобождая таким образом субъединицы актина для последующей полимеризации на “плюс”-концах (Pollard, Boris, 2003). Образование двух разных типов структур актиновых филаментов — разветвленных сетей и параллельных пучков — происходит при помощи двух разных механизмов полимеризации актина (Pollard, 2007). В первом механизме полимеризации актина участвует белковый комплекс Arp2/3, который инициирует образование нового филамента под углом 70° к существующему. В результате такой полимеризации образуется разветвленная сеть актиновых микрофиламентов, в местах ветвления которой находится комплекс Arp2/3 (Mullins, Pollard, 1999; Pollard, Beltzner, 2002). Второй механизм реализуется при участии белков семейства форминов, которые стимулируют сборку актина в длинные параллельные пучки филаментов, связанных между собой поперечными шивками из актинсвязывающих белков (Evangelista et al., 2003; Zigmund, 2004; Pollard, 2007).

2) По мере передвижения клетка формирует с субстратом контакты, в которых интегрины связываются с внеклеточным матриксом (ВКМ) снаружи и с актиновым цитоскелетом внутри. Интегриновые контакты с ВКМ бывают разных типов: (1) фокальные комплексы — небольшие (0.5–1 мкм) точечные контакты, располагающиеся в ламеллоподиях (Bershadsky et al., 1985; Nobes, Hall, 1995); (2) фокальные контакты, представляющие собой более крупные удлиненные структуры (3–10 мкм в длину), которые образуются на границе ламеллы и ламеллоподий из фокальных комплексов (Geiger, Bershadsky, 2001). Фокальные контак-

ты являются основным типом контактов с ВКМ и образуются на границе ламеллы и ламеллоподий из фокальных комплексов при связывании последних со стресс-фибриллами. Различают также (3) фибриллярные контакты (Zamir et al., 2000), которые обогащены тензином и участвуют в формировании фибрилл фибронектина во внеклеточном матриксе (Pankov et al., 2000; Mao, Schwarzbauer, 2005).

Интегрины представляют собой трансмембранные белки, выступающие в роли рецепторов различных белков ВКМ (Bershadsky et al., 2006; Takada et al., 2007). Они состоят из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц разных типов, формирующих в различных комбинациях у млекопитающих 24 различных рецептора, взаимодействующих с разными компонентами ВКМ. Цитоплазматические домены интегринов связаны с комплексом белков, включая винкулин, талин, паксиллин, тензин и многие другие (BurrIDGE, Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Geiger, Bershadsky, 2001), участвующих в динамическом взаимодействии с актиновыми микрофиламентами. Кроме прикрепления к ВКМ фокальные контакты также участвуют в передаче сигналов от компонентов ВКМ (DeMali et al., 2003). Состав и структура ВКМ играют важную роль в определении особенностей внутриклеточного транспорта, связанного с полярностью клетки, например, влияет на транспорт и структуру митохондрий (Некрасова и др., 2005). Среди компонентов фокальных контактов обнаруживаются несколько типов сигнальных молекул, включая тирозин-киназы, тирозин-фосфатазы и другие сигнальные белки (Geiger, Bershadsky, 2001). Таким образом, фокальные контакты играют роль прикрепляющей и сигнальной органеллы и принимают участие в поляризации клетки. Рецепторы контактов информируют клетку о составе окружающего матрикса, связанных с ним сигнальных молекулах и других свойствах субстрата.

3) На третьей стадии движения происходит подтягивание тела клетки за счет сокращения стресс-фибрилл, которые являются основным типом сократимых структур в немускульных клетках. Стресс-фибриллы представляют собой параллельные пучки актиновых и миозиновых филаментов разной направленности, прикрепленные к фокальным контактам (BurrIDGE, 1981; Geiger, Bershadsky, 2001; Bershadsky et al., 2006). Кроме актина и миозина они также содержат типичные для актомиозиновых комплексов белки, такие как тропомиозин, альфа-актинин, филамин и некоторые другие (BurrIDGE, Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Стресс-фибриллы в комплексе с фокальными контактами работают как единый сократительный аппарат, обеспечивая подтягивание тела клетки в направлении движения.

4) Затем в передней части клетки начинают формироваться новые выросты, и фокальные контакты, образовавшиеся спереди постепенно перемещаются назад, а в задней части клетки происходит разборка фокальных контактов, что позволяет клетке открепляться от субстрата и подтягиваться к переднему краю (Ridley et al., 2003).

Дополнительное значение для миграции клетки имеет транспорт органелл, в котором участвуют все цитоскелетные структуры, микрофиламенты, микротрубочки и ПФ. Для транспорта органелл существенное значение имеет взаимодействие разных компонентов цитоскелета, например, при транспорте митохондрий (Кулик и др., 2006). Подробнее об этом будет сказано ниже.

*Выбор направления. Поляризация клетки.  
Роль ГТФаз семейства Rho в передаче сигналов.  
Роль перекиси водорода в поляризации*

Направление движения клетки определяется различными внешними факторами. В качестве таких стимулов могут выступать градиенты различных хемоаттрактантов — цитокинов и факторов роста, как свободных, так и связанных с ВКМ, а также изменение химических или механических свойств субстрата. Кроме того, для некоторых типов клеток также характерна спонтанная поляризация в отсутствие внеклеточных стимулов. Внешние сигналы действуют через сложную систему рецепторов, находящихся в плазматической мембране. Сигнал от рецепторов далее передается в цитоплазму клетки через системы вторичных посредников и регуляторных белков, которые в свою очередь регулируют перестройки цитоскелета, заставляя клетку менять форму и двигаться в выбранном направлении.

Ключевую роль в передаче сигналов играют малые ГТФ-азы семейства Rho. В мигрирующей клетке они регулируют все перестройки актинового цитоскелета, обеспечивающие подвижность. Белок Rac1 отвечает за формирование ламеллоподий и распластывание передней части клетки, стимулируя полимеризацию сети актиновых микрофиламентов по Arp2/3-зависимому механизму через активацию белкового комплекса WAVE (Ridley, 2006). Белок Cdc42 регулирует образование филоподий. RhoA отвечает за образование стресс-фибрилл в задней части клетки по формин-зависимому механизму и регулирует их сокращение через Rho-киназу (ROCK), контролирующую активность миозина (Ridley, 2006). Кроме того, RhoA регулирует сборку фокальных контактов (Ridley et al., 2003).

Малые ГТФ-азы семейства Rho активируются в результате замены ГДФ на ГТФ в их активном центре, и, наоборот, инактивируются при гидролизе

ГТФ до ГДФ. Активность ГТФ-аз, в свою очередь, регулируют другие группы белков: факторы обмена гуанидилнуклеотидов (GEF – guanine nucleotide exchange factor); белки, активирующие ГТФ-азу (GAP – GTPase-activating protein); и ингибиторы диссоциации гуанидил-нуклеотидов (GDI – guanine nucleotide dissociation inhibitor) (Ridley, 2006). Множественная регуляция малых ГТФ-аз обеспечивает цикличность активации-ингибирования этих белков при миграции клетки (Machacek et al., 2009).

Для поляризации клетки, необходимо чтобы процессы, связанные с изменением активности регуляторных белков, были разнесены в клетке во времени и в пространстве. Фактически при миграции в передней части клетки преобладают процессы, связанные с активацией белков Rac1 и Cdc42, в задней части – с белком RhoA (Nalbant et al., 2004; Wu et al., 2009). Локальная активация малых ГТФ-аз семейства Rho может обеспечиваться несколькими разными механизмами. Важным фактором поляризации клетки является распределение фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфата (PIP3) в плазматической клеточной мембране (Funamoto et al., 2002; Weiger et al., 2009; Arai et al., 2010). PIP3 синтезируется фосфатидилинозитол-3-киназой (PI3-киназой), а деградирует в результате дефосфорилирования инозитольного кольца фосфатазами PTEN (3-е положение) или SHIP (5-е положение). При наличии внешнего сигнала, поступающего спереди, PI3-киназа активируется на переднем крае клетки сигналами от рецепторов, что ведет к локальному накоплению там PIP3 и активации Rac1 (Ridley et al., 2003).

Другим способом поддержания локальной активации малых ГТФ-аз служат положительные и отрицательные обратные связи между ними. Известно, что Rac1 и RhoA могут действовать как антагонисты, ингибируя активность друг друга (Evers et al., 2000; Nimnual et al., 2003). Rac1 белок также может активировать PI3-киназу, увеличивая таким образом свою собственную активацию (Welch et al., 2003). Сходным образом белки WAVE/WASP, активирующие Arp2/3-комплекс, могут активировать Rac1 и Cdc42, связываясь с соответствующими GEF и GAP.

Последние исследования, посвященные изучению миграции клеток, активно развивают гипотезу о важной роли пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) в определении поляризации клетки.  $H_2O_2$  может действовать как внутри клетки, так и в качестве межклеточного посредника, поскольку хорошо проходит через плазматическую мембрану (Nithammer et al., 2009).

Основными источниками  $H_2O_2$  в клетке являются дыхательная цепь митохондрий и мембран-

ные NADPH-оксидазы. Аргументом в пользу роли пероксида водорода как сигнальной молекулы в клеточной миграции служит то, что он способен окислять остатки цистеина в активном центре некоторых ферментов, регулируя их активность, а его образование может регулироваться белком Rac1. Белок Rac1 входит в состав наиболее изученных NADPH-оксидаз (NOX1, NOX2, NOX3) в качестве регуляторной субъединицы и необходим для работы комплекса (Bedard, Krause, 2007). Было также показано, что Rac1 может регулировать образование АФК в митохондриях (Wegner, Werb, 2002).

К числу белков, регулируемых  $H_2O_2$ , относится фосфатаза PTEN, активность которой снижается под действием пероксида (Kwon, 2004). Также показано, что  $H_2O_2$  может ингибировать низкомолекулярную фосфотирозин-фосфатазу (LMW-PTP), фосфорилирующую и активирующую p190Rho-GAP, который переводит RhoA в неактивное состояние (Nimnual et al., 2003). LMW-PTP является важным регулятором клеточной адгезии, который дефосфорилирует киназу фокальных контактов (ФАК) (Chiarugi et al., 2003).

Новые данные, указывающие на роль пероксида водорода в поляризации клетки, были получены благодаря использованию белковых биосенсоров на основе химерного белка HyPer (Markvicheva et al., 2011). Исследователям удалось прямо показать неоднородность распределения в живой клетке пероксида водорода при ее поляризации (Mishina et al., 2011).

Возможная роль пероксида водорода в поляризации клетки позволяет по-новому взглянуть на участие внутриклеточного транспорта в этом процессе. Митохондрии, как было указано, являются одним из основных источников пероксида водорода в клетке. Поэтому транспорт митохондрий в направлении активного края клетки может быть тесно связан с процессом поляризации. Особое значение в связи с этим приобретают новые данные по влиянию виментиновых ПФ на функции митохондрий в клетке (Черноиваненко и др., 2011). Эти данные позволяют предположить, что участие виментина в поляризации и миграции клетки может быть связано с работой митохондрий.

#### *Участие виментина в молекулярных механизмах миграции*

В последнее время были получены новые данные, свидетельствующие об участии виментиновых ПФ в процессах клеточной миграции. В настоящей работе не ставится задача исчерпывающего описания всех клеточных функций виментина,

поэтому мы остановимся только на нескольких важных в методическом отношении работах.

#### **Виментин и клеточные контакты**

Фокальные контакты обычно описываются как структуры, фиксирующие актиновый цитоскелет, однако было показано, что виментин также может входить в состав особых клеточных контактов с внеклеточным матриксом (ВКМ). Эти структуры названы контактами с ВКМ, содержащими виментин (vimentin-associated matrix adhesions – VMAs) (Gonzales et al., 2001). VMAs обычно содержат интегрины  $\alpha 2\beta 1$  или  $\alpha V\beta 3$ . Такие контакты взаимодействуют как с актиновыми микрофиламентами при помощи винкулина, так и с виментиновыми ПФ при помощи плектина (Burgstaller et al., 2010). Виментиновые ПФ по-видимому играют важную роль в регуляции размера и стабильности VMAs (Tsuruta, Jones, 2003). Виментин также может регулировать специфичность контактов к различным компонентам ВКМ. Например, контакты, содержащие интегрины  $\alpha 2\beta 1$ , в нетрансформированных эпителиальных клетках способны узнавать ламинин и коллаген, в то время как в трансформированных клетках, экспрессирующих виментин, они узнают только коллаген (Maemura et al., 1995).

Было показано, что виментин участвует в регуляции везикулярного транспорта интегринов в направлении к плазматической мембране. Виментин подвергается быстрому фосфорилированию и дефосфорилированию, которые влияют на его сборку в филаменты. Некоторые сайты фосфорилирования контролируются различными изоформами протеинкиназы С. Было показано, что важную роль в транспорте интегринов играет фосфорилирование N-концевой части виментина протеинкиназой С – эпсилон (PKC $\epsilon$ ) (Ivaska et al., 2005). Замена N-концевых сайтов фосфорилирования (Ser 4, 6, 7, 8, 9) на аланин нарушает интегриновый гаптотаксис фибробластов, в то время как замена этих серинов на отрицательно-заряженные остатки поддерживает гаптотаксис даже в отсутствие PKC $\epsilon$  (Ivaska et al., 2007).

#### **Виментин как каркасный белок**

В последнее время многие исследования связывают виментиновые ПФ с процессами передачи сигналов в клетке. Делаются предположения о том, что виментиновые ПФ могут выступать в качестве сигнальных платформ и каркасов для различных сигнальных молекул. Хорошим примером является способность виментина регулировать передачу сигнала в последовательности, включающей протеинкиназу ERK. ERK1/2-путь – один из сигнальных путей, активируемых стимуляцией  $\beta$ -адренергических рецепторов катехоламинами. Src-киназа напрямую связывается с цитоплазматическим доменом рецептора и является одним из

ключевых звеньев в активации ERK. Однако в отсутствие сети виментиновых ПФ активация ERK не происходит. Возможно, виментиновые ПФ являются в данном случае одной из регуляторных структур рецептора, которая обеспечивает передачу сигнала через Src на ERK (Kumar et al., 2007).

Важная информация о способности виментина регулировать передачу сигналов была получена из исследований RhoA киназы (ROK $\alpha$ ), эффектора белка RhoA. Было показано, что она может фосфорилировать виментин с высокой специфичностью. Обнаруженное прямое взаимодействие виментина с киназой ограничено его N-концевой областью. Активация белка RhoA приводит к ROK $\alpha$ -зависимому коллапсу виментиновых ПФ, одновременной диссоциации киназы от ПФ и ее перемещению на периферию клетки (Sin et al., 1998).

#### **Виментин и динамика ПФ**

Виментиновые ПФ являются динамичными структурами. Происходит постоянный обмен между ПФ и свободными субъединицами виментина (Goldman et al., 1999; Helfand et al., 2003). Скорость обмена виментиновых ПФ зависит от их фосфорилирования, и увеличивается, например, во время митоза или стресса. Было показано, что низкополимерные предшественники ПФ транспортируются по микротрубочкам, основной системе внутриклеточного транспорта, при помощи моторных белков – кинезинов и динеина (Helfand et al., 2004). ПФ могут выступать в роли посредников транспорта по микротрубочкам белков, взаимодействующих с ними.

### **ВЛИЯНИЕ ВИМЕНТИНА НА ПОДВИЖНОСТЬ КЛЕТОК ВО ВЗРОСЛОМ ОРГАНИЗМЕ**

Рассмотрев основные универсальные молекулярные механизмы миграции клеток, исследованные в основном на клеточных культурах, перейдем к проблемам, связанным с миграцией разных типов клеток в организме и роли виментина в этих процессах.

Наиболее значимыми процессами, связанными с миграцией клеток во взрослом организме, являются процессы регенерации, заживления ран и иммунного ответа. Фибробласты и лейкоциты сохраняют способность к индивидуальной миграции и после окончания эмбрионального развития в отличие от большинства других типов клеток. Оба эти типа клеток имеют мезенхимальное происхождение и содержат ПФ, построенные из виментина.

Значительные успехи в изучении роли виментина в миграции фибробластов и лейкоцитов были достигнуты благодаря использованию мышей, нокаутных по гену виментина. Кроме проведения экспериментов на животных, клетки которых не

содержат виментин, для изучения роли этого белка были получены культуры виментин-нуль фибробластов. Кроме того, важные данные о роли виментина в миграции клеток были получены при исследовании раковых опухолей различного происхождения. В этой части мы кратко рассмотрим миграцию фибробластов и лейкоцитов и нарушения, связанные с миграцией этих клеток у безвимиентиновых животных. Также мы рассмотрим роль виментина в клетках раковых опухолей.

### 1. Фибробласты

Фибробласты в культуре являются одной из наиболее изученных моделей миграции клеток, на которой было сделано большинство открытий в данной области. Они представляют собой основной тип клеток волокнистой соединительной ткани, которая образует строму и капсулы различных органов, связки и сухожилия, заполняет пространства между функциональными элементами других тканей, сопровождает нервы и сосуды, а также входит в состав кожи и слизистых оболочек. Основные функции фибробластов связаны с поддержанием целостности соединительной ткани и с процессами регенерации. В нормальной ткани фибробласты малоподвижны и образуют множество стабильных контактов с белками внеклеточного матрикса (Hinz et al., 2007). При повреждении ткани они активируются цитокинами, высвобождающимися из очага воспаления, что приводит к увеличению их подвижности и секреции белков внеклеточного матрикса. Важную роль в активации фибробластов играют изменения механических свойств их микроокружения при повреждении ткани. После активации цитокинами фибробласты мигрируют в поврежденный участок ткани, где далее превращаются в миофибробласты, которые обеспечивают механическое сокращение поврежденного участка и восстановление внеклеточного матрикса (Hinz et al., 2007). В культуре клеток на твердых субстратах фибробласты постоянно находятся в активированном состоянии и характеризуются высокой подвижностью, наличием стресс-фибрилл и повышенной секрецией белков внеклеточного матрикса (Hinz et al., 2007). Скорости миграции фибробластов в культуре составляют порядка 0.5–1.0 мкм/мин.

На модели мышей, нокаутных по гену виментина, было показано, что отсутствие виментина приводит значительному замедлению заживления ран у взрослых животных, а в эмбрионе заживление ран в отсутствие виментина блокируется практически полностью (Eckes et al., 2000). Эти нарушения связаны со снижением способности фибробластов к сокращению и к миграции в поврежденную область и, как следствие, с задержкой трансформации фибробластов в миофибробласты.

В эмбрионах мышей, где заживление ран происходит за счет сократительных способностей самих фибробластов, без их превращения в миофибробласты (McCluskey, Martin, 1995), заживление раны замедляется гораздо сильнее, чем во взрослом организме (Eckes et al., 2000). Похожие данные были получены на культурах фибробластов, полученных из таких мышей. Исследования подвижности таких фибробластов показали снижение способности к спонтанной миграции, миграции в искусственную рану и миграции в направлении градиента различных хемоаттрактантов, таких как фибронектин и PDGF (Eckes et al., 1998). Эксперименты по определению клеточной прочности и жесткости показывают, что фибробласты без виментина менее устойчивы к скручиванию, т.е. менее прочные по сравнению с нормальными. Также снижается их способность сокращать трехмерный коллагеновый гель, на котором они растут (Eckes et al., 1998). Анализ морфологии цитоскелета в таких фибробластах показал ряд изменений в структуре сети актиновых микрофиламентов и фокальных контактов (Eckes et al., 1998). Таким образом, данные, полученные на культуре клеток, соответствуют результатам исследований заживления ран у мышей, лишенных виментина.

### 2. Лейкоциты

Способность клеток иммунной системы к миграции позволяет им эффективно распознавать и быстро прибывать к месту повреждения или инфекции. Способностью к миграции из сосудистого русла в периферические ткани во взрослом организме обладают все лейкоциты. Однако для лимфоцитов и моноцитов характерна высокая не стимулированная миграция в ткани, тогда как миграция гранулоцитов достигает максимальной активности только при наличии очагов воспаления. Отличается также и дальнейшая судьба разных типов клеток иммунной системы после миграции в ткани. Лимфоциты способны к возвращению из тканей обратно в кровяное русло (рециркуляции) или в лимфатические узлы в зависимости от окружения в котором они впервые встретили чужеродный антиген (Springer, 1994). Моноциты и гранулоциты мигрируют из кровяного русла в ответ на молекулярные изменения на поверхности клеток эндотелия, но не способны к рециркуляции (Springer, 1994).

Важную роль в миграции лейкоцитов играют различные стимулы, которые обеспечивают прибытие определенного типа лейкоцитов в нужное место. Такими стимулами могут быть компоненты бактериальной клеточной стенки, лейкотриены, факторы комплемента и различные хемокины (Jones, 2000). Недавно также была показана роль пероксида водорода как фактора, определяющего

направление миграции лейкоцитов. У личинки Zebrafish при повреждении хвостового плавника клетки эпителия начинают продуцировать увеличенное количество пероксида водорода, который образует устойчивый градиент на расстояние около 100–200 мкм вокруг области повреждения, который выступает в качестве хемоаттрактанта для лейкоцитов (Niethammer et al., 2009).

Лейкоциты являются одними из самых быстрых и чувствительных клеток млекопитающих, мигрирующих со скоростями порядка 10–20 мкм/мин. При этом они способны определять разницу концентраций хемоаттрактанта до 1% на дистанции длины клетки, т.е. около 10–40 мкм (Zigmond, 1977).

Миграция лейкоцитов в ткани происходит в основном в микроциркуляторном русле и наиболее активно протекает на уровне посткапиллярных венул. Она включает в себя серию последовательных адгезионных взаимодействий между лейкоцитами и клетками эндотелия сосудов (Marchesi, Gowans, 1964). Одним из важнейших этапов миграции лейкоцитов является их трансмиграция сквозь эндотелий кровеносных сосудов. Оказалось, что виментиновые ПФ в процессе трансмиграции лейкоцитов также играют важную роль. Они формируют динамичные структуры и в клетках эндотелия, и в лейкоцитах в местах контактов этих двух типов клеток (Ivaska et al., 2007)

Виментин был обнаружен также в филоподиях и подосомах прикрепленных макрофагов. Подосомы – ранние структуры клеточной адгезии, найденные в миелоидных клетках и необходимые для направленного движения и трансмиграции (Calle et al., 2006). В них неполимерный виментин связан с фимбрином, образующим поперечные сшивки между актиновыми микрофиламентами. Это связывание осуществляется N-концевой частью молекулы виментина и зависит от его фосфорилирования (Sogreia et al., 1999). Эндотелиоциты и лейкоциты из мышей, нокаутных по гену виментина, значительно хуже взаимодействуют между собой, вследствие чего нарушается миграция лейкоцитов в ткани, лимфатические узлы и селезенку. Это связано с нарушением экспрессии и распределения поверхностных молекул, необходимых для взаимодействия лейкоцитов с эндотелием (ICAM-1 и VCAM-1 на поверхности эндотелиальных клеток и интегрин- $\beta 1$  на поверхности лейкоцитов) (Niemiinen et al., 2006).

### 3. Клетки раковых опухолей

Экспрессия различных белков ПФ уже давно используется для выяснения происхождения и агрессивности различных раковых опухолей. Еще в ранних работах было показано, что экспрессия виментина в раковых клетках коррелирует с их

способностью к миграции и инвазии в окружающие ткани (Sommers et al., 1992; Santini et al., 1996; Gilles et al., 1999) и связана с высоким риском метастазирования и неблагоприятным прогнозом (Thomas et al., 1999).

Для развития раковых опухолей эпителиально-го происхождения на поздних стадиях характерно явление эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), когда эпителиальные клетки могут приобретать черты мезенхимальных клеток и способность к индивидуальной миграции и инвазии в окружающие ткани. Для таких клеток характерно появление виментина, потеря базально-апикальной полярности и межклеточных контактов (Thiery, 2002). Этот процесс может ускоряться различными ростовыми факторами, такими как эпидермальный ростовой фактор (EGF) и трансформирующий ростовой фактор- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Miyazaki et al., 2006). В настоящее время ЭМП рассматривается как показатель прогрессии опухоли, характеризующая высокоинвазивные или метастатические опухоли.

При анализе экспрессии белков ПФ в клетках рака прямой кишки было показано, что наличие виментина характерно для клеток метастаз и не наблюдается в клетках первичной опухоли. Экспрессия виментина сопровождается снижением уровня кератинов и увеличением подвижности клеток (Pascione et al., 2008), а подавление экспрессии виментина с помощью РНК-интерференции приводит к снижению как клеточной пролиферации, так и миграции и инвазии через базальную мембрану в 3 раза по сравнению с независимым контролем. В клетках со сниженной экспрессией виментина начинают появляться тканеспецифичные кератины K13, K14 и K15, и они обладают значительно более низким потенциалом образования новых опухолей. То есть, обращение мезенхимального фенотипа при подавлении экспрессии виментина приводит к восстановлению эпителиальных характеристик и снижению агрессивности опухоли (Pascione et al., 2008).

Похожие результаты были получены также для клеток рака простаты и рака груди. Стабильная экспрессия виментина в клетках рака груди приводит к увеличению инвазивности, в то время как подавление экспрессии с помощью РНК-интерференции приводит к ее значительному снижению (Wei et al., 2008). Кроме того, повышенная экспрессия виментина снижает содержание E-кадгерина, который в норме обеспечивает прочное взаимодействие эпителиальных клеток друг с другом. При экспрессии виментина в клетках эпителия нарушается распределение десмосом и значительно увеличивается динамика фокальных контактов (Wei et al., 2008). Подавление экспрессии вименти-



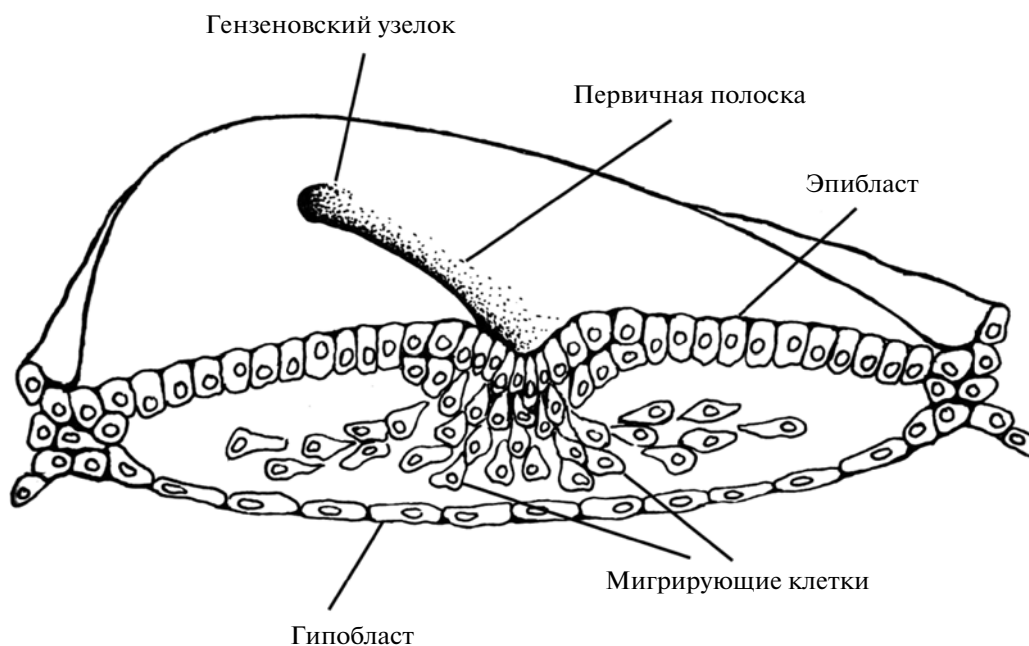


Рис. 1. Миграция клеток через первичную полосу при гаструляции высших позвоночных.

на в клетках метастазирующего рака груди приводит к подавлению миграции и в модели “искусственная рана”, и при инвазии в коллагеновый гель (McInroy, Maatta, 2007). Таким образом, экспрессия виментина характерна для клеток метастазирующих раковых опухолей и является необходимым условием для инвазии раковых клеток в окружающие ткани.

#### МИГРАЦИЯ КЛЕТОК В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ И ЭКСПРЕССИЯ ВИМЕНТИНА

Развитие любого многоклеточного организма представляет собой сложный многостадийный процесс, в результате которого из одной клетки зиготы образуется все многообразие клеток, тканей и органов. Одним из ключевых процессов, определяющих их своевременное формирование и правильное расположение в организме, является координированная миграция клеток. Миграция клеток играет важную роль на всех стадиях развития, однако можно выделить несколько наиболее важных связанных с ней событий.

##### *Основные события миграции в эмбриогенезе*

#### **Гаструляция**

Первым и важнейшим событием в эмбриогенезе, для которого необходима миграция клеток, является гаструляция. До гаструляции в процессе дробления также происходит перераспределение

клеток эмбриона, однако оно обусловлено не индивидуальной миграцией клеток, а их делением.

Основной структурой, характерной для процесса гаструляции у высших позвоночных (рептилий, птиц и млекопитающих), является первичная полоска. Она представляет собой центрально расположенное утолщение клеточного пласта на заднем крае зародышевого диска (эпибласта), образующееся в результате миграции клеток из латеральной области заднего отдела эпибласта к центру. По мере поступления клеток в первичную полосу она удлиняется в направлении будущего головного конца зародыша, и в ней возникает углубление, называемое первичной бороздкой, через которую клетки мигрируют в бластоцель (рис. 1). В процессе гаструляции из однослойного зародышевого диска формируется многослойный зародыш, состоящий из 3 зародышевых листков — эктодермы, мезодермы и энтодермы. У высших позвоночных клетки, которые затем дают начало мезодермальному и энтодермальному зародышевым листкам, мигрируют в бластоцель индивидуально, а не в составе эпителиальных пластов, как это происходит у рыб и земноводных. Однако миграция происходит на небольшие расстояния, порядка 1–5 мкм, ее скорость достаточно мала и составляет менее 0.5 мкм/час (Gilbert, 2000).

#### **Миграция клеток нервного гребня**

После гаструляции у позвоночных из образовавшихся трех зародышевых листков происходит

формирование различных органов и тканей, органогенез. Из эктодермы образуются клетки трех разных типов — клетки эпидермиса кожи, клетки нервной трубки и клетки нервного гребня. Одним из ключевых событий является образование нейральной эктодермы и замыкание нервной трубки. Нервный гребень представляет собой временную структуру, образующуюся при замыкании нервной трубки между ней и эктодермальным эпителием. Клетки нервного гребня мигрируют на большие расстояния и дают начало огромному числу разнообразных структур (Bronner-Fraser et al., 1991).

Клетки нервного гребня подразделяются на несколько типов в зависимости от происхождения и расположения в эмбрионе. Клетки черепного нервного гребня происходят из головного и шейного отделов и дают начало хрящам и костям черепа, черепным нервам, глии, соединительной ткани тимуса и щитовидной железы, зубам, костям среднего уха и нижней челюсти (Serbedzija et al., 1992; Trainor, 2005). Клетки сердечного нервного гребня мигрируют из похожих регионов головы и шеи и формируют выходящие из сердца сосуды, сердечные перегородки и часть вентрикулярного миокарда (Hutson, Kirby, 2003; Brown, Baldwin, 2006; Hutson, Kirby, 2007). Клетки туловищного отдела нервного гребня мигрируют со спинной части эмбриона и дают начало сенсорным и симпатическим нейронам, надпочечникам, клеткам Шванна и пигментным клеткам кожи (Hutson, Kirby, 2007). Клетки вагусного и крестцового нервного гребня мигрируют из двух противоположных сторон, заселяют желудочно-кишечный тракт и дифференцируются в нейроны, его иннервирующие (Young, Newgreen, 2001; Anderson et al., 2006).

Для разных частей нервного гребня расстояние и продолжительность миграции могут сильно варьировать. В развитии мыши миграция клеток разных отделов нервного гребня начинается с 8.5—9 дня развития и продолжается для некоторых отделов до 14 дня. Соответственно, длительность миграции разных популяций клеток нервного гребня колеблется от 24 часов для головного нервного гребня до 5 суток для вагусного и сердечного отделов (Serbedzija et al., 1992; Young, Newgreen, 2001). Расстояния миграции также сильно варьируют: от 1000 мкм для клеток крестцового нервного гребня до 5000—6000 мкм для клеток вагусного отдела нервного гребня (Young, Newgreen, 2001). Примерные пути и продолжительность миграции разных отделов нервного гребня показаны на рис. 2.

#### **Миграция первичных половых клеток**

Индивидуальная миграция также характерна для предшественников половых клеток (Chiquoine, 1954; Molyneaux, Wylie, 2004). В развитии мыши первичные половые клетки формируются

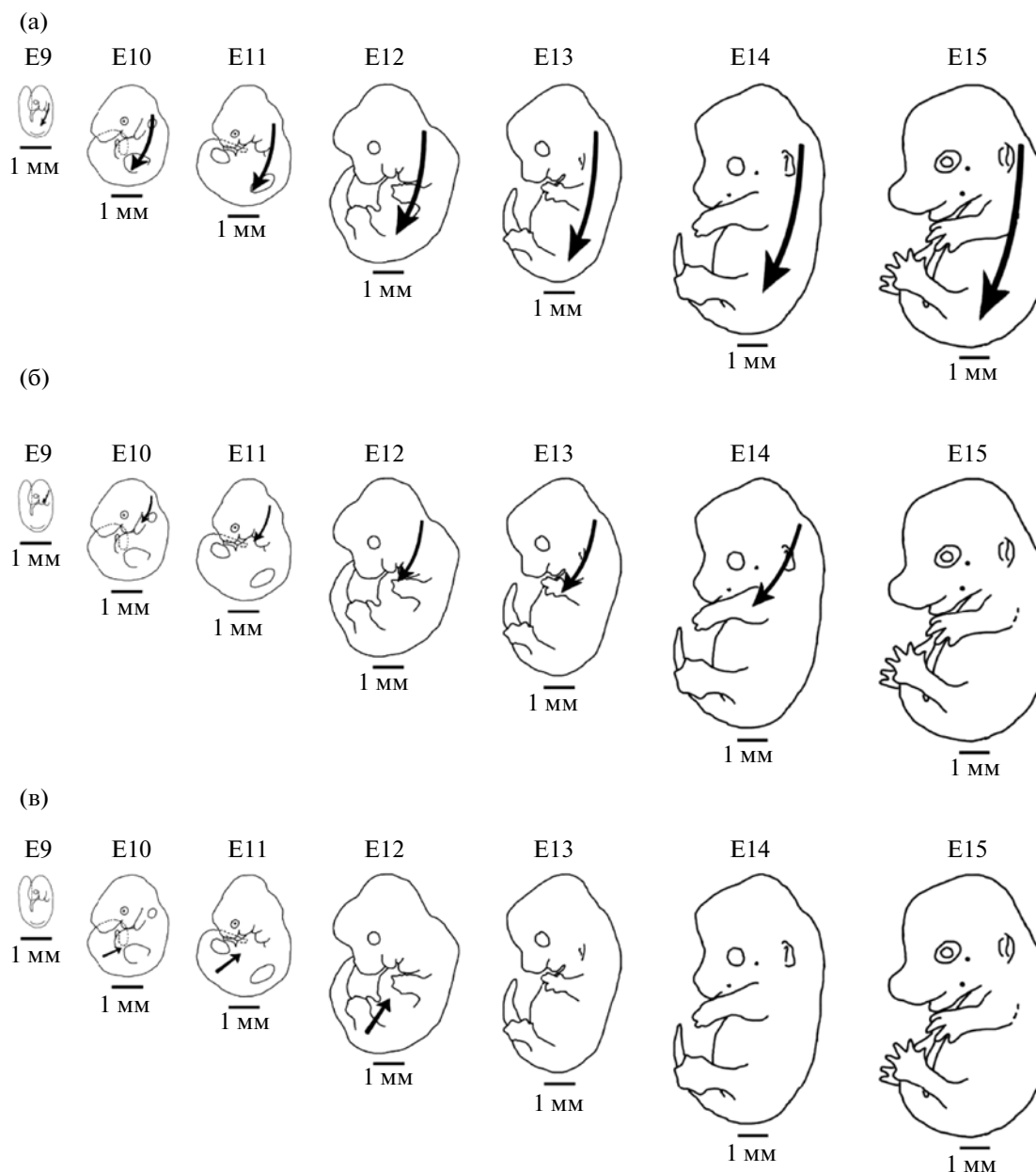
из задней части зародышевого диска и в процессе гастрюляции мигрируют через первичную полосу. На срок развития 7.5 суток они обнаруживаются в основании аллантаоиса (Ginsburg et al., 1990). Затем на 9—9.5 сутки развития они мигрируют через новообразованную заднюю кишку и затем вверх по ее дорсальной стороне в половой гребень. Большая часть первичных половых клеток достигает развивающейся гонады к 11 суткам после оплодотворения (Molyneaux, Wylie, 2004). Средняя скорость их миграции может достигать 21 мкм/час для эмбриона мыши.

#### *Экспрессия виментина в эмбриогенезе*

Экспрессия виментина у разных классов позвоночных сильно отличается по времени. В целом, у высших позвоночных виментин начинает экспрессироваться гораздо раньше, чем у рыб и земноводных. В развитии млекопитающих и птиц виментин впервые обнаруживается уже на стадии гастрюляции в первичных мезенхимальных клетках — клетках, которые мигрируют из эктодермы через специальную область, называемую первичной полоской, и затем дают начало мезодерме (Franke et al., 1982; Page, 1989). Исследование экспрессии белков ПФ на ранних стадиях эмбриогенеза птиц и млекопитающих с помощью иммунохимического окрашивания показало, что антитела к виментину окрашивают центральную область зародышевого диска, включая первичную полосу (Page, 1989). Клетки, расположенные ближе к периферии зародышевого диска, экспрессируют кератины (Page, 1989). У рыб и амфибий на стадии гастрюляции виментин не обнаруживается (Dent et al., 1989). Считается, что такое различие может быть обусловлено разными механизмами гастрюляции. У высших позвоночных гастрюляция осуществляется за счет миграции индивидуальных клеток, в то время как у рыб и амфибий происходит миграция целых эпителиальных пластов.

После окончания гастрюляции экспрессия виментина наблюдается в клетках формирующейся нервной трубки. У высших позвоночных виментин появляется еще в нервной пластинке, до замыкания нервной трубки (Cochard, Paulin, 1984; Page, 1989). У амфибий виментин обнаруживается впервые во время замыкания нервной трубки, в клетках, находящихся на ее латеральных границах (Dent et al., 1989). Кроме того виментин обнаруживается в клетках нервного гребня, находящимися между нервной трубкой и эктодермальным эпителием. Однако в некоторых линиях клеток нервного гребня он появляется уже после начала их миграции (Bronner-Fraser et al., 1991).

На более поздних стадиях развития виментин обнаруживается в клетках эндотелия формирую-



**Рис. 2.** Миграция клеток нервного гребня на разных стадиях эмбрионального развития мыши. а – Миграция клеток вагусного НГ; б – миграция клеток сердечного НГ; в – миграция клеток крестцового НГ (на основе данных <http://www.emouseatlas.org>).

щихся кровеносных сосудов, различных мезенхимальных клетках, в клетках глии и нейронах, а также в предшественниках мышечных клеток.

Таким образом, в эмбриогенезе высших позвоночных практически все мигрирующие индивидуально клетки, кроме первичных половых клеток, экспрессируют виментин в качестве основного белка ПФ.

Однако получение мышей, нокаутных по гену виментина, показало, что отсутствие виментина, к

всеобщему удивлению, не приводит к серьезным нарушениям в отношении развития и способности к размножению (Colucci-Guyon et al., 1994). При этом в клетках, в норме экспрессирующих виментин, не наблюдается компенсаторной экспрессии других белков ПФ. Позднее более детальный анализ показал, что отсутствие виментина все же приводит к нарушениям миграции клеток у таких мышей, но уже во взрослом состоянии. У них наблюдается замедленное заживление ран, связанное с

нарушением способности фибробластов к миграции, и нарушение миграции лейкоцитов в ткани (Eckes et al., 1998; Nieminen et al., 2006).

#### *Нужен ли виментин для миграции в эмбриогенезе?*

Суммируя рассмотренные выше события миграции клеток в течение эмбриогенеза и во взрослом организме, можно сделать вывод, что практически все индивидуально мигрирующие клетки содержат ПФ, построенные из виментина. Однако отсутствие виментина приводит к нарушению миграции только клеток взрослого организма, в то время как эмбриональное развитие без виментина происходит нормально. В чем же причины таких различий?

Одним из ключевых различий может являться разница в скоростях движения клеток. В таблице суммированы скорости движения разных линий клеток в процессе эмбрионального развития, клеток во взрослом организме и в культуре. Оценки скоростей в эмбриональном развитии даны на основе известного времени миграции каждой линии клеток и размеров эмбриона на соответствующих стадиях. Размеры эмбриона и максимальные расстояния миграции каждой линии клеток подсчитаны по интерактивному атласу развития мыши доступному на <http://www.emouseatlas.org>. При подсчете скоростей миграции клеток в эмбриональном развитии нами учитывалось значительное для некоторых линий клеток увеличение размеров эмбриона за время их миграции. Такое увеличение может быть более чем 10–20-кратным для длительно мигрирующих клеток. Приведенные данные показывают, что в целом миграция клеток на ранних стадиях (гастрюляция) и миграция первичных половых клеток происходят с достаточно низкими скоростями: <0.5 мкм/час (<0.01 мкм/мин) и 10–20 мкм/час (0.15–0.3 мкм/мин). В то же время скорости миграции клеток во взрослом организме значительно выше: 10–20 мкм/мин – для лейкоцитов и 0.5–1.0 мкм/мин для фибробластов. У фибробластов, полученных из мыши нокаутной по гену виментина, наблюдается снижение скорости миграции в рану и в направлении градиента хемоаттрактантов на 45–60% (Eckes et al., 1998), то есть примерно до скоростей порядка 0.25–0.5 мкм/мин, что все равно остается выше скорости миграции половых клеток и значительно выше скорости миграции клеток при гастрюляции.

Скорости миграции клеток нервного гребня, с другой стороны, сопоставимы со скоростями миграции фибробластов и оценочно составляют 20–40 мкм/час (0.3–0.7 мкм/мин), хотя некоторые источники приводят и большие значения. Однако при этом стоит учитывать, что миграция этих кле-

ток в эмбриогенезе продолжается достаточно долго (от 1 до 4 суток для развития мыши), за это время размеры эмбриона могут увеличиваться в несколько раз (рис. 2). Например, миграция клеток сердечного отдела нервного гребня происходит с 8.5 по 13.5 дни развития мыши. За это время размеры эмбриона увеличиваются от 1000 мкм до 10–15 мм, то есть в 10–15 раз (рис. 26). То есть значительную часть расстояния мигрирующие клетки преодолевают за счет роста самого эмбриона, а не за счет индивидуальной миграции. Средние скорости с поправкой на рост эмбриона составляют уже порядка 0.2–0.4 мкм/мин, что примерно в 2 раза меньше средней скорости движения фибробластов и сопоставимо со скоростями движения фибробластов без виментина и эпителиальных клеток. Таким образом, в культуре и во взрослом организме клетки с виментином мигрируют с большими средними скоростями, чем клетки без виментина. А в процессе эмбриогенеза миграция даже клеток с виментином происходит в несколько раз медленнее.

Линия клеток	Скорость, мкм/мин
<i>Миграция клеток в эмбриональном развитии</i>	
Клетки эпибласта	<0.05
Нервный гребень	0.2–0.4
Первичные половые клетки	0.15–0.30
<i>Фибробласты</i>	
В ткани	~0.7
В культуре	0.5–1.0
<i>Фибробласты без виментина</i>	
Без виментина в ткани	~0.4
Без виментина в культуре	0.25–0.5
Лейкоциты	5.0–10.0

ток в эмбриогенезе продолжается достаточно долго (от 1 до 4 суток для развития мыши), за это время размеры эмбриона могут увеличиваться в несколько раз (рис. 2). Например, миграция клеток сердечного отдела нервного гребня происходит с 8.5 по 13.5 дни развития мыши. За это время размеры эмбриона увеличиваются от 1000 мкм до 10–15 мм, то есть в 10–15 раз (рис. 26). То есть значительную часть расстояния мигрирующие клетки преодолевают за счет роста самого эмбриона, а не за счет индивидуальной миграции. Средние скорости с поправкой на рост эмбриона составляют уже порядка 0.2–0.4 мкм/мин, что примерно в 2 раза меньше средней скорости движения фибробластов и сопоставимо со скоростями движения фибробластов без виментина и эпителиальных клеток. Таким образом, в культуре и во взрослом организме клетки с виментином мигрируют с большими средними скоростями, чем клетки без виментина. А в процессе эмбриогенеза миграция даже клеток с виментином происходит в несколько раз медленнее.

Можно предположить, что виментин необходим только в случае движения с достаточно высокими скоростями, как при миграции клеток во взрослом организме. Поскольку средняя скорость определяется как расстояние пройденное за определенное время без учета траектории движения, ее значение будет сильно зависеть от направленности движения клетки. Возможно, виментин не влияет непосредственно на способность клеток к движению, но при этом увеличивает направленность их миграции. Например, наличие виментина может влиять на длительность движения клетки в уже выбранном направлении. Или, другими словами, виментин может поддерживать уже мигрирующую клетку в поляризованном состоянии и уменьшает

вероятность смены направления движения, что в целом приводит к увеличению общей эффективности миграции. Такое действие виментина подтверждается снижением способности фибробластов без виментина мигрировать в направлении градиента различных ростовых факторов (Eckes et al., 1998). В пользу этого предположения также говорят результаты недавней работы, в которой исследовалось влияние экспрессии виментина в эпителиальных клетках на их форму и подвижность (Mendez et al., 2010). Было показано, что экспрессия виментина приводит к удлинению клеток, нарушению контактов с соседними эпителиальными клетками и увеличению подвижности почти в 2 раза с 0.24 до 0.4 мкм/мин.

Наши недавние результаты показывают, что виментин может регулировать распределение и функциональные свойства митохондрий, такие как их трансмембранный потенциал (Черноиваненко и др., 2011). По нашим предварительным данным связывание митохондрий с виментином снижает в них продукцию пероксида водорода. Кроме того наши данные показывают, что связь митохондрий с виментином может регулироваться различными внутриклеточными факторами, такими как протеинкиназа С (Некрасова и др., 2007). Можно предположить, что в поляризованной клетке такая регуляция приводит к неравномерному распределению митохондрий, связанных и не связанных с виментином, и таким образом, к созданию градиента пероксида водорода в клетке. Как уже обсуждалось выше, такой градиент пероксида водорода в мигрирующей клетке может поддерживать ее поляризацию и, как следствие, увеличивать эффективность миграции.

На основе сравнения экспрессии виментина у разных классов позвоночных можно предложить еще одно объяснение нормального развития мышцы без виментина. У рыб и земноводных экспрессия виментина начинается гораздо позже, чем у высших позвоночных, что может быть связано с различием механизмов раннего развития. У низших позвоночных миграция клеток в течение гаструляции происходит в составе эпителиальных пластов, в которых клетки прочно связаны друг с другом, в то время как у высших клетки мигрируют индивидуально. Возможно, регуляция полярности и подвижности клеток виментином является эволюционно новым механизмом и его присутствие обеспечивает лишь дополнительную надежность системам миграции, но не является необходимым для эмбрионального развития.

Таким образом, на основании вышеизложенного можно сделать вывод, что виментин играет роль в клеточной миграции во взрослом организме, а в эмбриональном развитии его роль не принципи-

альна. Также, нужно учитывать, что в эмбриогенезе процессы миграции клеток строго запрограммированы во времени и пространстве и практически одинаковы во всех организмах одного вида. Миграция же клеток во взрослом организме, напротив, является более непредсказуемой и определяется различными внешними факторами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 10-04-00414-а, 10-04-01582-а и 12-04-32280-мол-а).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода; ВКМ – внеклеточный матрикс; ПФ – промежуточные филаменты; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; Arp 2/3 (actin related protein 2 and 3 containig comlex) – содержащий актин-связанные белки 2 и 3 комплекс, регулирующий полимеризацию актина; Cdc42, Rac1, RhoA – регуляторные белки, малые ГТФ-азы семейства Rho; EGF (epidermal growth factor) – эпидермальный фактор роста; ERK (extracellular regulated MAP-kinase) – MAP-киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; FAK (focal adhesion kinase) – киназа фокальных контактов; GEF (guanine nucleotide exchange factor) – фактор обмена гуанидилнуклеотидов; GAP (GTPase-activating protein) – белок, активирующий ГТФ-азу; GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) – ингибиторы диссоциации гуанидил-нуклеотидов; LMW-PTP (low molecular weight phosphotyrosine-phosphatase) – низкомолекулярная фосфотирозин-фосфатаза; NADPH – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид-фосфат; NOX – NADPH-оксидаза; PDGF (platelet-derived growth factor) – тромбоцитарный фактор роста; PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) – фосфатидилинозитол-3-киназа; PIP3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат; PKCε – протеинкиназа C-ε; PTEN (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten) – фосфатаза, содержащая участок гомологии с тензином, отсутствующая в 10-й хромосоме ряда опухолевых клеток; ROCK (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) – активируемая Rho-белком киназа, содержащая суперспираль; ROKα (RhoA-kinase) – киназа, активируемая белком RhoA.

SHIP (Src homology 2 domain containing inositol-5-phosphatase) – фосфатаза, дефосфорилирующая фосфатидилинозитолы по 5'-положению и содержащая SH2-домен; Src (Rous Sarcoma) – киназа, характерная для вирусной саркомы Рауса; TGFβ (transforming growth factor-β) – трансформирующий ростовой фактор-β; VMAs (vimentin-associated matrix adhesions) – содержащие виментин кон-

такты с внеклеточным матриксом; WASP (Wiscott–Aldrich Syndrome protein) – белок, характерный для синдрома Вискотта–Олдриха; WAVE (WASP and verprolin homologous protein) – белок, гомологичный WASP и верпролину.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anderson R.B., Stewart A.L., Young H.M.* Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways // *Cell. Tissue Res.* 2006. V. 323 (1). P. 11–25.
- Arai Y., Shibata T., Matsuoka S., Sato M.J., Yanagida T., Ueda M.* Self-organization of the phosphatidylinositol lipids signaling system for random cell migration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107 (27). P. 12399–12404.
- Bedard K., Krause K.H.* The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87 (1). P. 245–313.
- Bershadsky A.D., Ballestrem C., Carramusa L., Zilberman Y., Gilquin B., Khochbin S., Alexandrova A.Y., Verkhovskiy A.B., Shemesh T., Kozlov M.M.* Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models // *Eur. J. Cell Biol.* 2006. V. 85 (3–4). P. 165–173.
- Bershadsky A.D., Tint I.S., Neyfakh A.A., Jr., Vasiliev J.M.* Focal contacts of normal and RSV-transformed quail cells. Hypothesis of the transformation-induced deficient maturation of focal contacts // *Exp. Cell Res.* 1985. V. 158 (2). P. 433–444.
- Bronner-Fraser M., Stern C.D., Fraser S.* Analysis of neural crest cell lineage and migration // *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 1991. V. 11 (4). P. 214–222.
- Brown C.B., Baldwin H.S.* Neural crest contribution to the cardiovascular system // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006. V. 589. 134–154.
- Burgstaller G., Gregor M., Winter L., Wiche G.* Keeping the vimentin network under control: cell-matrix adhesion-associated plectin 1f affects cell shape and polarity of fibroblasts // *Mol. Biol. Cell* 2010. V. 21 (19). P. 3362–3375.
- Burridge K.* Are stress fibres contractile? // *Nature.* 1981. V. 294 (5843). P. 691–692.
- Burridge K., Chrzanowska-Wodnicka M.* Focal adhesions, contractility, and signaling // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996. V. 12. 463–518.
- Calle Y., Burns S., Thrasher A.J., Jones G.E.* The leukocyte podosome // *Eur. J. Cell Biol.* 2006. V. 85 (3–4). P. 151–157.
- Chiarugi P., Pani G., Giannoni E., Taddei L., Colavitti R., Raugei G., Symons M., Borrello S., Galeotti T., Ramponi G.* Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion // *J. Cell Biol.* 2003. V. 161 (5). P. 933–944.
- Chiquoine A.D.* The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo // *Anat. Rec.* 1954. V. 118 (2). P. 135–146.
- Cochard P., Paulin D.* Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo *in vivo* // *J. Neurosci.* 1984. V. 4 (8). P. 2080–2094.
- Colucci-Guyon E., Portier M.M., Dunia I., Paulin D., Pournin S., Babinet C.* Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype // *Cell* 1994. V. 79 (4). P. 679–694.
- Comen E., Norton L., Massague J.* Clinical implications of cancer self-seeding // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011. V. 8 (6). P. 369–377.
- Correia I., Chu D., Chou Y.H., Goldman R.D., Matsudaira P.* Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages // *J. Cell Biol.* 1999. V. 146 (4). P. 831–842.
- DeMali K.A., Wennerberg K., Burridge K.* Integrin signaling to the actin cytoskeleton // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003. V. 15 (5). P. 572–582.
- Dent J.A., Polson A.G., Plymkowsky M.W.* A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus* // *Development.* 1989. V. 105 (1). P. 61–74.
- Eckes B., Colucci-Guyon E., Smola H., Nodder S., Babinet C., Krieg T., Martin P.* Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin // *J. Cell Sci.* 2000. V. 113 (Pt 13). P. 2455–2462.
- Eckes B., Dogic D., Colucci-Guyon E., Wang N., Maniotis A., Ingber D., Merckling A., Langa F., Aumailley M., Delouvee A., Koteliansky V., Babinet C., Krieg T.* Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts // *J. Cell Sci.* 1998. V. 111 (Pt 13). P. 1897–1907.
- Evangelista M., Zigmond S., Boone C.* Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116 (Pt 13). P. 2603–2611.
- Evers E.E., Zondag G.C., Malliri A., Price L.S., ten Klooster J.P., van der Kammen R.A., Collard J.G.* Rho family proteins in cell adhesion and cell migration // *Eur. J. Cancer.* 2000. V. 36 (10). P. 1269–1274.
- Franke W.W., Grund C., Kuhn C., Jackson B.W., Illmensee K.* Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments // *Differentiation.* 1982. V. 23 (1). P. 43–59.
- Franke W.W., Schmid E., Osborn M., Weber K.* Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978. V. 75 (10). P. 5034–5038.
- Fuchs E., Weber K.* Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease // *Annu. Rev. Biochem.* 1994. V. 63. P. 345–382.
- Funamoto S., Meili R., Lee S., Parry L., Firtel R.A.* Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis // *Cell.* 2002. V. 109 (5). P. 611–623.
- Geiger B., Bershadsky A.* Assembly and mechanosensory function of focal contacts // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001. V. 13 (5). P. 584–592, 2000.
- Gilbert S.F.* *Developmental biology*, Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2000.
- Gilles C., Polette M., Zahm J.M., Tournier J.M., Volders L., Foidart J.M., Birembaut P.* Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration // *J. Cell Sci.* 1999. V. 112 (Pt 24). P. 4615–4625.

- Ginsburg M., Snow M.H., McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation // *Development*. 1990. V. 110 (2). P. 521–528.
- Goldman R.D., Chou Y.H., Prahla V., Yoon M. Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems // *Faseb. J.* 1999. V. 13. Suppl 2. S. 261–265.
- Gonzales M., Weksler B., Tsuruta D., Goldman R.D., Yoon K.J., Hopkinson S.B., Flitney F.W., Jones J.C. Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells // *Mol. Biol. Cell* 2001. V. 12 (1). P. 85–100.
- Helfand B.T., Chang L., Goldman R.D. The dynamic and motile properties of intermediate filaments // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003. V. 19. P. 445–467.
- Helfand B.T., Chang L., Goldman R.D. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117 (Pt 2). P. 133–141.
- Hendrix M.J., Seftor E.A., Chu Y.W., Trevor K.T., Seftor R.E. Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis // *Cancer. Metastasis. Rev.* 1996. V. 15 (4). P. 507–525.
- Hinz B., Phan S.H., Thannickal V.J., Galli A., Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins // *Am. J. Pathol.* 2007. V. 170 (6). P. 1807–1816.
- Hutson M.R., Kirby M.L. Neural crest and cardiovascular development: a 20-year perspective // *Birth. Defects. Res. C. Embryo. Today*. 2003. V. 69 (1). P. 2–13.
- Hutson M.R., Kirby M.L. Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2007. V. 18 (1). P. 101–110.
- Ivaska J., Pallari H.M., Nevo J., Eriksson J.E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling // *Exp. Cell Res.* 2007. V. 313 (10). P. 2050–2062.
- Ivaska J., Vuoriluoto K., Huovinen T., Izawa I., Inagaki M., Parker P.J. PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility // *EMBO J.* 2005. V. 24 (22). P. 3834–3845.
- Jones G.E. Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis // *J. Leukoc. Biol.* 2000. V. 68 (5). P. 593–602.
- Krendel M., Zenke F.T., Bokoch G.M. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton // *Nat. Cell Biol.* 2002. V. 4 (4). P. 294–301.
- Kumar N., Robidoux J., Daniel K.W., Guzman G., Floering L.M., Collins S. Requirement of vimentin filament assembly for beta3-adrenergic receptor activation of ERK MAP kinase and lipolysis // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282 (12). P. 9244–9250.
- Kwon J.L.S.-R., Yang K.-S., Ahn Y., Kim Y.J., Stadtman E.R., Rhee S.G. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. V. 101. P. 16419–16424.
- Machacek M., Hodgson L., Welch C., Elliott H., Pertz O., Nalbant P., Abell A., Johnson G.L., Hahn K.M., Danuser G. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion // *Nature*. 2009. V. 461 (7260). P. 99–103.
- Maemura M., Akiyama S.K., Woods V.L., Jr., Dickson R.B. Expression and ligand binding of alpha 2 beta 1 integrin on breast carcinoma cells // *Clin. Exp. Metastasis*. 1995. V. 13 (4). P. 223–235.
- Mao Y., Schwarzbauer J.E. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process // *Matrix. Biol.* 2005. V. 24 (6). P. 389–399.
- Marchesi V.T., Gowans J.L. The Migration of Lymphocytes through the Endothelium of Venules in Lymph Nodes: An Electron Microscope Study // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1964. V. 159. P. 283–290.
- Markvicheva K.N., Bilan D.S., Mishina N.M., Gorokhovatsky A.Y., Vinokurov L.M., Lukyanov S., Belousov V.V. A genetically encoded sensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with expanded dynamic range // *Bioorg. Med. Chem.* 2011. V. 19 (3). P. 1079–1084.
- McCluskey J., Martin P. Analysis of the tissue movements of embryonic wound healing—DiI studies in the limb bud stage mouse embryo // *Dev. Biol.* 1995. V. 170 (1). P. 102–114.
- McInroy L., Maatta A. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 360 (1). P. 109–114.
- Mendez M.G., Kojima S., Goldman R.D. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition // *Faseb. J.* 2010. V. 24 (6). P. 1838–1851.
- Mishina N.M., Tyurin-Kuzmin P.A., Markvicheva K.N., Vorotnikov A.V., Tkachuk V.A., Laketa V., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V.V. Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? // *Antioxid. Redox. Signal.* 2011. V. 14 (1). P. 1–7.
- Miyazaki H., Patel V., Wang H., Ensley J.F., Gutkind J.S., Yeudall W.A. Growth factor-sensitive molecular targets identified in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma using microarray analysis // *Oral. Oncol.* 2006. V. 42 (3). P. 240–256.
- Molyneaux K., Wylie C. Primordial germ cell migration // *Int. J. Dev. Biol.* 2004. V. 48 (5–6). P. 537–544.
- Mullins R.D., Pollard T.D. Structure and function of the Arp2/3 complex // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999. V. 9 (2). P. 244–249.
- Nalbant P., Hodgson L., Kraynov V., Tutchkine A., Hahn K.M. Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells // *Science*. 2004. V. 305 (5690). P. 1615–1619.
- Nieminen M., Henttinen T., Merinen M., Marttila-Ichihara F., Eriksson J.E., Jalkanen S. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8 (2). P. 156–162.
- Niethammer P., Grabher C., Look A.T., Mitchison T.J. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish // *Nature*. 2009. V. 459 (7249). P. 996–999.
- Nimnual A.S., Taylor L.J., Bar-Sagi D. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac // *Nat. Cell Biol.* 2003. V. 5 (3). P. 236–241.
- Nobes C.D., Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia // *Cell*. 1995. V. 81 (1). P. 53–62.

- Osborn M., Weber K.* Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology // *Lab. Invest.* 1983. V. 48 (4). P. 372–394.
- Paccione R.J., Miyazaki H., Patel V., Waseem A., Gutkind J.S., Zehner Z.E., Yeudall W.A.* Keratin down-regulation in vimentin-positive cancer cells is reversible by vimentin RNA interference, which inhibits growth and motility // *Mol. Cancer. Ther.* 2008. V. 7 (9). P. 2894–2903.
- Page M.* Changing patterns of cytokeratins and vimentin in the early chick embryo // *Development.* 1989. V. 105 (1). P. 97–107.
- Pankov R., Cukierman E., Katz B.Z., Matsumoto K., Lin D.C., Lin S., Hahn C., Yamada K.M.* Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis // *J. Cell Biol.* 2000. V. 148 (5). P. 1075–1090.
- Petrie R.J., Gavara N., Chadwick R.S., Yamada K.M.* Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration // *J. Cell Biol.* 2012. V. 197 (3). P. 439–455.
- Pollard T.D.* Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2007. V. 36. P. 451–477.
- Pollard T.D., Beltzner C.C.* Structure and function of the Arp2/3 complex // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. V. 12 (6). P. 768–774.
- Pollard T.D., Borisy G.G.* Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments // *Cell.* 2003. V. 112 (4). P. 453–465.
- Ridley A.J.* Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking // *Trends. Cell Biol.* 2006. V. 16 (10). P. 522–529.
- Ridley A.J., Schwartz M.A., Burridge K., Firtel R.A., Ginsberg M.H., Borisy G., Parsons J.T., Horwitz A.R.* Cell migration: integrating signals from front to back // *Science.* 2003. V. 302 (5651). P. 1704–1709.
- Santini D., Ceccarelli C., Taffurelli M., Pileri S., Marrano D.* Differentiation pathways in primary invasive breast carcinoma as suggested by intermediate filament and biopathological marker expression // *J. Pathol.* 1996. V. 179 (4). P. 386–391.
- Serbedzija G.N., Bronner-Fraser M., Fraser S.E.* Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo // *Development.* 1992. V. 116 (2). P. 297–307.
- Sin W.C., Chen X.Q., Leung T., Lim L.* RhoA-binding kinase alpha translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network // *Mol. Cell Biol.* 1998. V. 18 (11). P. 6325–6339.
- Sommers C.L., Heckford S.E., Skerker J.M., Worland P., Torri J.A., Thompson E.W., Byers S.W., Gelmann E.P.* Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines // *Cancer. Res.* 1992. V. 52 (19). P. 5190–5197.
- Springer T.A.* Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm // *Cell.* 1994. V. 76 (2). P. 301–314.
- Takada Y., Ye X., Simon S.* The integrins // *Genome. Biol.* 2007. V. 8 (5). P. 215.
- Thiery J.P.* Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression // *Nat. Rev. Cancer.* 2002. V. 2 (6). P. 442–454.
- Thomas P.A., Kirschmann D.A., Cerhan J.R., Folberg R., Seftor E.A., Sellers T.A., Hendrix M.J.* Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype, and survival in postmenopausal breast cancer patients // *Clin. Cancer. Res.* 1999. V. 5 (10). P. 2698–2703.
- Trainor P.A.* Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2005. V. 16 (6). P. 683–693.
- Tsuruta D., Jones J.C.* The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116 (Pt 24). P. 4977–4984.
- Vasiliev J.M., Gelfand I.M., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Komm S.G., Olshevskaja L.V.* Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1970. V. 24 (3). P. 625–640.
- Wei J., Xu G., Wu M., Zhang Y., Li Q., Liu P., Zhu T., Song A., Zhao L., Han Z., Chen G., Wang S., Meng L., Zhou J., Lu Y., Ma D.* Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation // *Anticancer. Res.* 2008. V. 28 (1A). P. 327–334.
- Weiger M.C., Wang C.C., Krajcovic M., Melvin A.T., Rhoden J.J., Haugh J.M.* Spontaneous phosphoinositide 3-kinase signaling dynamics drive spreading and random migration of fibroblasts // *J. Cell Sci.* 2009. V. 122 (Pt 3). P. 313–323.
- Welch H.C., Coadwell W.J., Stephens L.R., Hawkins P.T.* Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac // *FEBS Lett.* 2003. V. 546 (1). P. 93–97.
- Werner E., Werb Z.* Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases // *J. Cell Biol.* 2002. V. 158 (2). P. 357–368.
- Wittmann T., Waterman-Storer C.M.* Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? // *J. Cell Sci.* 2001. V. 114 (Pt 21). P. 3795–3803.
- Wu Y.I., Frey D., Lungu O.I., Jaehrig A., Schlichting I., Kuhlman B., Hahn K.M.* A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells // *Nature.* 2009. V. 461 (7260). P. 104–108.
- Young H.M., Newgreen D.* Enteric neural crest-derived cells: origin, identification, migration, and differentiation // *Anat. Rec.* 2001. V. 262 (1). P. 1–15.
- Zamir E., Katz M., Posen Y., Erez N., Yamada K.M., Katz B.Z., Lin S., Lin D.C., Bershadsky A., Kam Z., Geiger B.* Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts // *Nat. Cell Biol.* 2000. V. 2 (4). P. 191–196.
- Zigmond S.H.* Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors // *J. Cell Biol.* 1977. V. 75 (2 Pt 1). P. 606–616.
- Zigmond S.H.* Formin-induced nucleation of actin filaments // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004. V. 16 (1). P. 99–105.
- Кулик А.В., Некрасова О.Е., Минин А.А.* Фибриллярный актин регулирует подвижность митохондрий // *Биологические мембраны.* 2006. Т. 23. С. 42–51.



Некрасова О.Е., Кулик А.В., Минин А.А. Протеинкиназа С регулирует подвижность митохондрий // Биологические мембраны. 2007. Т. 24. С. 126–132.

Некрасова О.Е., Минин А.А., Кулик О.В., Минин А.А. Регуляция фибронектином формы и внутриклеточно-

го распределения митохондрий // Биологические мембраны. 2005. Т. 22 (1). С. 55–65.

Черноиваненко И.С., Матвеева Е.А., Минин А.А. Виментиновые промежуточные филаменты увеличивают потенциал митохондрий // Биологические мембраны. 2011. Т. 28 (1). С. 43–51.

## Role of Vimentin in Cell Migration

I. S. Chernoiivanenko<sup>a</sup>, An. A. Minin<sup>a</sup>, and A. A. Minin<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

<sup>b</sup> Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 4, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia  
e-mail: alexminin@gmail.com

**Abstract**—Cell migration plays a crucial role in embryonic development, wound healing, regeneration, inflammation, and immune response, as well as in dissemination of malignant tumors. Vimentin is the marker of migrating cells, but its role in cell migration is still unclear. However, recent studies have revealed novel functions for vimentin related to the migration, such as determination of cellular polarity, regulation of cell contact formation, and arrangement and transport of signal proteins involved in cell motility. The review sums up the latest data on vimentin functions and its involvement in molecular mechanisms underlying cell migration.

Early studies demonstrated that vimentin expression during embryonic development is associated with cell migration. However, having obtained vimentin knockout mice without apparent impairments in development and ability to reproduce, doubts have appeared if vimentin is required for cell migration during embryonic development. In the present review, we also discuss involvement of vimentin in migration processes at different stages of development and try to resolve current contradictions concerning the role of vimentin in various events of cell migration.

**Keywords:** cell migration, vimentin, intermediate filaments, embryonic development.

## МОРФОГЕНЕЗ В СООБЩЕСТВЕ НИТЧАТЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

© 2013 г. Е. Л. Сумина<sup>1</sup>, Д. Л. Сумин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова

119992 Москва, ГСП-2, Ленинские горы

<sup>2</sup> СНИИПЭБ, 103009 Москва, Б. Никитская, д. 6

E-mail: stromatolit@list.ru

Поступила в редакцию 25.02.12 г.

Окончательный вариант получен 21.11.12 г.

Экспериментальным путем в сообществе современных нитчатых цианобактерий *Oscillatoria terebri-formis* обнаружено явление обратимой дифференцировки, заключающееся в расчленении первоначально однородного сообщества на дифференцированные части (тяжи, многолучевые агрегаты, сети и т.д.), возникающие только на время выполнения функции, деятельность которых направлена на поддержание жизнедеятельности сообщества как целостного образования. Образование структур происходит в результате перегруппировки нитей, без их специализации. При действии экстремального фактора выявлено наличие морфологически оформленной управляющей системы – полигональной сети. Сопоставлены структурные уровни организации нитчатых цианобактерий и многоклеточных эукариот (отдельные клетки нити – клеточные органеллы; нити – отдельные клетки; сообщество – организм), на основании чего проанализированы сходства и различия в протекании морфогенеза сравниваемых групп с использованием данных по эмбриональным регуляциям многоклеточных эукариот. Показано, что пространственная информация в морфогенезе не является непосредственно реализуемой ранее возникшей наследственной программой, а создается элементами целостных организмов (здесь – нитями, клетками) в процессе развития.

**Ключевые слова:** цианобактерии, сообщество, прокариоты, эукариоты, дифференцировка, морфогенез, морфогенетическая информация.

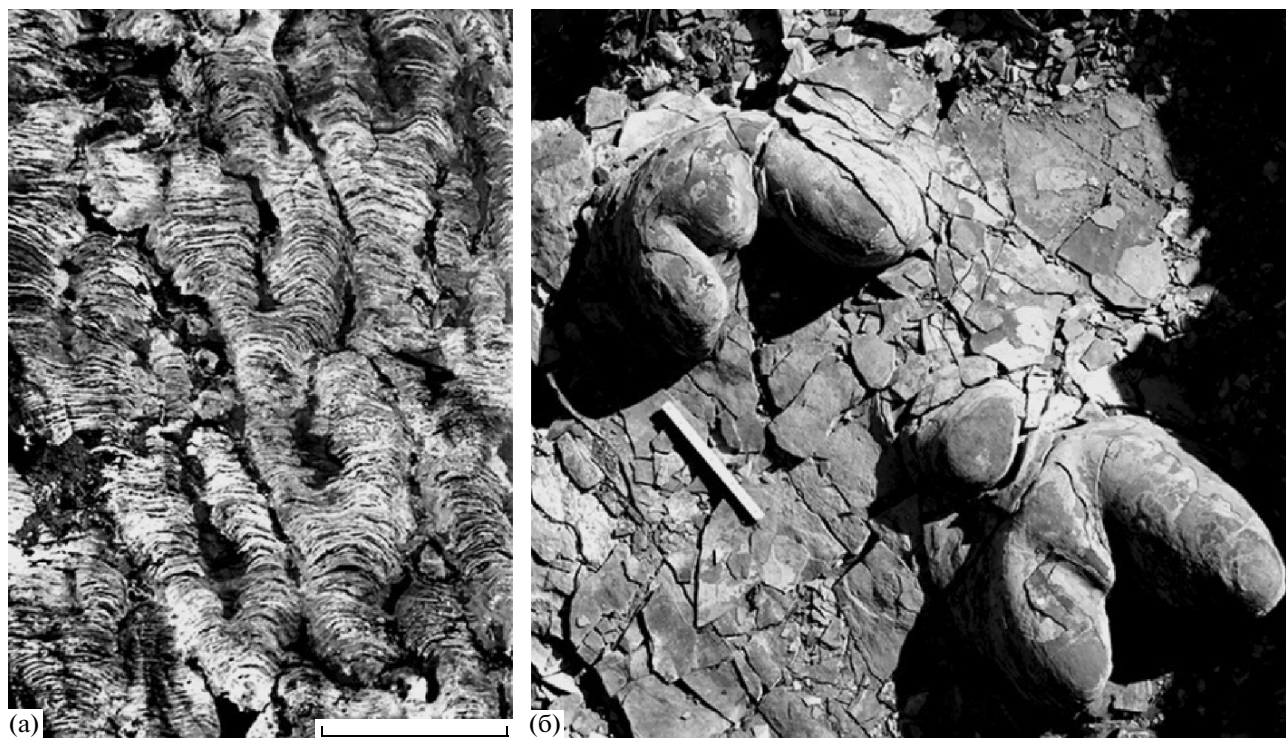
DOI: 10.7868/S0475145013030087

### ВВЕДЕНИЕ

В геологической летописи, начиная с самых древних отложений, встречаются две категории макроскопических ископаемых – появляющиеся с рубежа 3.5 миллиарда лет строматолиты, и остатки многоклеточных эукариот, единичные находки которых известны с рубежа 2.7 миллиарда, а массовое появление – с 600 миллионов лет назад. Процессы, лежащие в основе морфогенеза ископаемых эукариот, достаточно хорошо изучены на их современных представителях. Основной проблемой в понимании природы строматолитов, являющихся следами существования прокариотных сообществ и характеризующихся морфологической оформленностью, дискретностью таксонов и направленностью эволюции не в меньшей степени, чем скелеты низших многоклеточных эукариот, до сих пор являлось отсутствие носителя морфогенетических процессов, которые могли бы создавать эти скелетоподобные образования.

Строматолиты (stroma (греч.) – ковер; lithos (греч.) – камень) – это макроскопические минеральные прикрепленные к субстрату закономерно слоистые образования преимущественно карбонатного состава, возникающие в результате жизнедеятельности нитчатых цианобактерий (рис. 1). Природа строматолитов дискуссионна – одни авторы считают их результатом связывания осадка в процессе роста водорослей и цианобактерий (Герасименко, 2002), другие – прокариотным аналогом скелета эукариот (Сумина, 2002), но палеонтологическое изучение показало, что строматолиты в геологическом времени ведут себя как любая естественная группа организмов (Комар и др., 1965).

У современных прокариот не предполагалось наличие макроскопических многоклеточных тел, по размерам (первые дециметры) сопоставимых со строматолитами, несмотря на то, что в работах (Еленкин, 1936, 1938; Горюнова, 1955; Кондратьева, 1995; 2001) имелись данные, позволяющие го-



**Рис. 1.** а – Вертикальный разрез ветвящихся столбчатых строматолитов, верхний рифей (1 млрд. лет), Ю. Урал (фото Е. Суминой). б – Строматолит с трехлопастным контуром (вид сверху), венд (600 млн. лет), Якутия (фото Ю. Шуваловой). Масштабная линейка 20 см.

ворить о возможности морфогенеза у цианобактерий на уровне их “поселения” в целом.

Поскольку современные строматолиты образуются нитчатыми цианобактериями, авторы, основываясь на данных предшествующего биологического и палеонтологического изучения, предположили у этой группы прокариот способность осуществлять морфогенез в макроскопических масштабах – на уровне сообщества, что и легло в основу постановки задач экспериментальных исследований. Необходимо отметить, что в данной статье применительно к цианобактериям термин “сообщество” употребляется в смысле “компактное поселение самостоятельных элементов (нитей цианобактерий)” без определения его уровня целостности, так как к нему равно не применимы ни термин “организм”, ни термин “популяция” и, безусловно, оно не является биоценозом. Здесь же отметим, что, поскольку в природе и в условиях культивирования цианобактерии существуют в виде сообществ, имеющих вид кожистых пленок, термины “сообщество” и “пленка” используются нами как синонимы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В проведенных экспериментах использовалась культура нитчатых цианобактерий, выделенная из термальных источников кальдеры вулкана Узон на Камчатке. Цианобактерии культивировались в накопительной культуре, состоящей из представителей двух видов – *Oscillatoria terebriformis* (Ag.) Elenk. emend., которая является основным структурообразующим компонентом сообщества, и *Phormidium angustissimum* W. et G.S. West, являющимся минорным компонентом, а также разнообразного населения – бактерий, инфузорий, клещей и др.<sup>1</sup>

По ботанической классификации эти организмы относятся к порядку *Oscillatoriales* (осцилляториевые) класса *Hormogoniophyceae* (гормогониевые) из отдела *Cyanophyta* (синезеленые водоросли). По бактериальной – к группе 11 (оксигенные фототрофные бактерии), подгруппе 3 (= порядок *Oscillatoriales*). Осцилляториевые – микроскопические многоклеточные фотосинтетики, клетки которых образуют нити, имеющие средние размеры до 400 микрометров в длину и 7 микрометров в

<sup>1</sup> Культура из коллекции Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН.

толщину для *Oscillatoria*; *Phormidium* имеет меньшие размеры – до 100 микрометров в длину и 1.5–2 микрометра в толщину. Нити способны передвигаться по субстрату в жидкой среде в обоих направлениях путем скольжения со скоростью до 100 мкм в минуту.

Осцилляториевые – нитчатые формы, имеющие длинные гомоцитные, как правило, прямые многоклеточные трихомы, состоящие из одинаковых по форме цилиндрических клеток. Терминальные клетки либо не отличаются от остальных клеток трихома, либо могут быть дифференцированы и имеют выпуклые перегородки. Форма терминальных клеток специфична для вида, в данном случае, конечные клетки более или менее сильно суживаются, дифференцировка распространяется на участок длиной в несколько клеток. Дифференцированные концевые клетки могут утрачивать способность к делению. Трихомы гибкие, особенно около концов, подвижные. Перегородки, как правило, тоньше, чем боковые клеточные стенки. При делении цитоплазматическая мембрана образует инвагинации вместе с тонким слоем пептидогликана, разделяющим новые мембраны дочерних клеток. Диаметр трихомов варьирует от 1 мкм до более чем 100 мкм. Постоянные чехлы обычно отсутствуют, но при скольжении трихома по плотной поверхности за ним остаются почти невидимые прозрачные, подобные чехлу, следы или просто слизь. В некоторых случаях вокруг трихомов образуется более заметный слизистый чехол – особенно в старых культурах в жидкой среде. Если трихомы находятся в скоплениях или кожистых пленках, то они окружены морфологически выраженным общим чехлом. Скользящее движение возможно по поверхности твердого или уплотненного субстрата. Движение вперед или назад сопровождается лево- или правонаправленным вращением трихома. Если терминальные участки трихомов не находятся в контакте с субстратом, свободный конец может колебаться при вращении трихома, особенно, если он изогнут. Скорость движения варьирует от менее чем 1 мкм с<sup>-1</sup> до примерно 11 мкм с<sup>-1</sup> (Определитель ..., 1997). Размножение – только бинарным делением клеток в одной плоскости путем трансцеллюлярного распада трихомов по “жертвенным” клеткам на более короткие подвижные участки, состоящие из нескольких клеток и называемые гормогониями. Они вырастают в новые нити. Часто распад происходит по уже мертвым клеткам – некридиям (Горбунова, 1991).

*Oscillatoria terebriformis* (осциллятория буравовидная) является в сообществе видом, осуществляющим все морфогенетические преобразования.

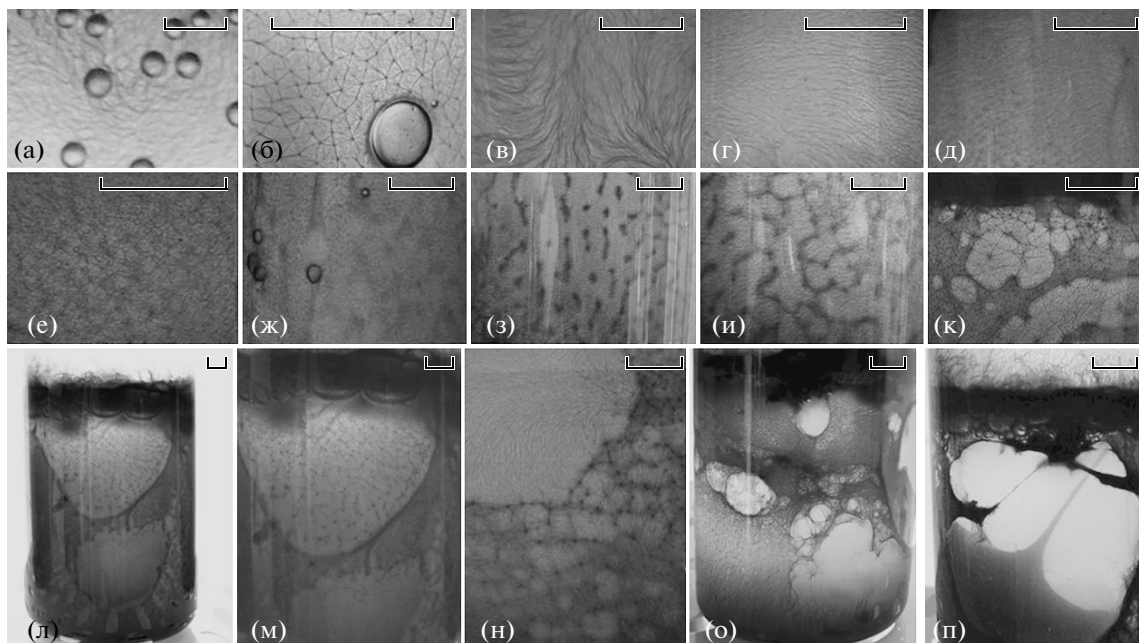
Формы этого вида способны к фотоавтотрофии, а также к очень медленному росту в темноте в анаэробных условиях за счет сбраживания экзогенных сахаров. Представители вида образуют темные сине-зеленого цвета дерновинки (пленки). Обитают в горячих источниках с температурой до 45°C.

Цианобактерии культивировались на среде, по составу аналогичной среде горячих источников (в граммах на литр): CaCl<sub>2</sub> – 0.1, NaH<sub>4</sub>Cl – 0.1, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.2, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.1, NaHCO<sub>3</sub> – 0.3, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> – 0.3, FeSO<sub>4</sub> – 0.01, микроэлементы – 0.01 (B, Mg, Zn, Na, Cu, Co).

Сообщество цианобактерий выращивали в чашках Петри стандартного размера, колбах и кристаллизаторах.

Наблюдения проводились невооруженным глазом и с применением микроскопической техники – бинокулярной лупы фирмы Carl Zeiss Jena (×32; 44 и 56), микроскопа NU 2 Carl Zeiss Jena (×123; 312). Препараты приготавливались стандартным методом с использованием предметных и покровных стекол. Растущую культуру освещали лампами накаливания с интенсивностью 2000 лк. Лампы находились на расстоянии 40–50 см от сосудов с культурой. Наблюдения проводились в двух режимах – при постоянном освещении искусственным светом и при естественном освещении с суточными колебаниями.

Отдельного комментария требует вопрос о воспроизводимости экспериментов. Поскольку процессы полностью не детерминированы и не эквивифинальны, в одинаковых условиях морфогенез сообщества может идти как сходных, так и в совершенно различных направлениях, с различными результатами и в течение разного времени. В двух и более стоящих рядом сосудах могут возникать совершенно непохожие картины, поэтому авторы описывают картину явлений, наблюдавшуюся в конкретных экспериментах. Топология событий, происходящих в сосуде, описывается принципиально неполно, поскольку структуры, образуемые цианобактериями, не только обладают малой прочностью, но и механочувствительностью, поэтому поворот лабораторного сосуда для наблюдений и фотографирования в большинстве случаев невозможен без нарушения хода процессов. В связи с тем, что структуры обладают фоточувствительностью, затруднена также фотосъемка процессов, идущих при малом освещении, так как для этого требуется изменение освещенности.



**Рис. 2.** Обобщенная последовательность стадий морфогенеза при сильном естественном освещении. а – Ячеистая структура молодой пленки; б – нити группируются в сеть; в, г – зрелая пленка (“потоки” из нитей); д – начало образования сети в зрелой пленке; е – начало образования 2 морфогенетических слоев; ж – пузырьки кислорода между слоями; з, и – преобразование внешнего слоя; к – образование сети во внутреннем слое; л, м, н – окна пропускания во внешнем слое; о, п – финальная стадия – сокращение фотосинтезирующей поверхности. Масштабная линейка 1 см.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Преыдушие экспериментальные исследования авторов сводились к изучению реакции сообщества на ряд внешних воздействий – нарушение его механической целостности, засыпание минеральными осадками, слабую вибрацию. Проводились также наблюдения за распространением нитей цианобактерий по поверхности различных субстратов в процессе увеличения площади, занимаемого сообществом, и изучение способности сообщества к поддержанию и изменению своего положения в пространстве. В результате проведенных экспериментов был обнаружен целый ряд морфологически обособленных участков сообщества, называемых в описании экспериментов “структурами”, которые различаются по форме и функциям, и возникают как поведенческий ответ слагающих пленку нитей на различные внешние воздействия. Все структуры образуются путем перегруппировки нитей в пленке.

Ряд структур и способ их образования были описаны в публикациях (Сумина, 2005, 2006). Здесь мы уделим внимание наблюдениям, которые не были описаны ранее. Поскольку при описании наблюдений в ряде случаев используются названия структур, не рассматриваемых здесь подробно, мы дадим их краткую характеристику.

**Пленка** – представляет собой плоское многослойное образование, не имеет собственных постоянных границ; ее размеры определяются размерами лабораторных сосудов. Толщина определяется ее проницаемостью для света. Пленка достаточно прочная на разрыв, что определяется не только переплетением нитей, но и слизистым полисахаридным матриксом, выделяемым ими. Основной функцией пленки является объединение нитей в структурное и функциональное целое. Существование в виде пленки позволяет нитям сохранять благоприятное пространственное положение, закрепляет осадок, под которым они могут быть погребены, противостоять факторам внешней среды, которым отдельные нити противостоять не могут. В пленке происходят обменные процессы, объединяющие множество нитей и осуществляется взаимодействие специализированных структур. В пленке могут наблюдаться “потоки” – однонаправленные скопления нитей (перевидные, изогнутые и др.) (рис. 2в, 2г).

**Тяжи** представляют собой скопления, в которых нити располагаются параллельно друг другу, соприкасаясь боковыми сторонами. Могут иметь размеры от 25 мкм в толщину и 0.5 мм в длину до 1.5 мм в толщину и 10 см в длину. В строении тяжа можно выделить три части: в срединной части ни-

ти располагаются плотно и параллельно друг другу, в концевых частях, граничащих с пленкой или с субстратом — веерообразно, прикрепляясь к последним. В комплексе с многолучевыми агрегатами тяжи осваивают пространство на поверхности субстрата или в объеме жидкости: при перемещениях пленки или ее фрагментов способны к сокращению. Тяжи, располагающиеся в пределах пленки — армирующие, за ее пределами — прикрепительные (рис. 16–18<sup>2</sup>).

**Многолучевые агрегаты** — шарообразные скопления нитей размером до 2 мм. Свободные концы нитей по радиусам направлены наружу, в центре имеется плотное “ядро”. Способны к активному направленному движению со скоростью до 1.5 см в час. Функции — образование новых поселений, “сбор информации” о пространстве и “передача” ее основной массе сообщества. Способны также перемещать свободные концы тяжей (рис. 12).

**Фотосинтетические сети** — участки пленки, располагающиеся не горизонтально на субстрате, а подвешенные в объеме жидкости на тяжах. Образуются в фокусе светового потока (рис. 14в).

Поскольку цианобактерии являются фотосинтезирующими организмами, наиболее важными и выраженными морфогенетическими реакциями их сообществ являются реакции на изменение параметров освещенности.

#### Описание наблюдений

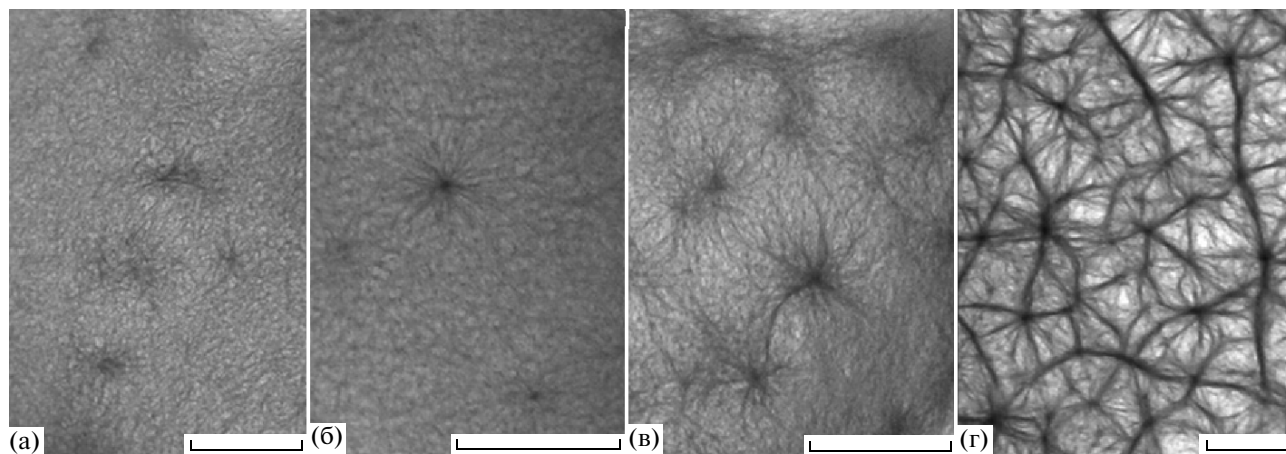
Фрагмент растущей пленки 5 × 5 см помещали в цилиндрический сосуд объемом 300 мл, заполненный средой. Далее сообщество увеличивало биомассу за счет фотосинтеза и осваивало поверхность стенок сосуда как в подводной части, так и в надводной. Морфогенез в надводной части во всех случаях соответствовал описанному ранее (Сумина, 2006), поэтому далее не рассматривается. Изначальный фрагмент пленки постоянно находился на поверхности среды, удерживаясь пузырями фотосинтетического кислорода. От него сообщество тонкой пленкой распространялось по поверхности среды и поверхности лабораторного сосуда выше и ниже уровня жидкости. Ниже уровня жидкости молодая пленка распространялась тонким слоем, прозрачность которого возрастает по направлению распространения. Пленка пронизана армирующими тяжами, образующими ячеистую структуру из плавно изогнутых элементов, не образующих узелки в местах соединения. Пузырьки фотосинтетического кислорода мелкие, округлые, образуются между пленкой и стенкой лабораторного сосуда

(рис. 2а). В более зрелой пленке (4–5-дневной) при интенсивном дневном освещении ячеистая структура начинает преобразовываться в полигональную сеть, состоящую из тяжей и узелков (рис. 2б). В однородной ячеисто организованной массе асинхронно начинают возникать уплотнения (рис. 2а). Расстояние между ближайшими уплотнениями около 1 мм. В уплотнениях одновременно наблюдалось формирование центрального ядра и лучей (рис. 3б). Формирование ядра достигает оформленных стадий раньше, чем формирование лучей. Затем по кратчайшему расстоянию между ядрами лучи соединяются и образуют систему тяжей, соединяющую ядра и образующую вместе с ними сеть, в которую преобразуется вся структура пленки (рис. 3в, 3г). Остальные лучи, сходящиеся к ядрам, значительно более тонкие и занимают пространство между основными тяжами. На этой стадии развития образование сети не приводит к другим морфологическим преобразованиям пленки, кроме изменения ее структуры. Также приблизительно на этой стадии сообщество полностью осваивает поверхность сосуда и дальнейший его рост происходит за счет увеличения толщины пленки и образования специализированных структур, осваивающих объем (будут описаны ниже). Сетчатая структура пленки собирается и разбирается за минимальное наблюдаемое время 45 минут.

При увеличении толщины пленки место сетчатой структуры занимают так называемые “потоки” (названные так благодаря внешнему сходству, а не какому-либо осуществляемому движению) (рис. 2в, 2г). “Потоковая” структура пленки закономерно изменчива. Затем она на отдельных участках поверхности начинает преобразовываться в сетчатую, но первая стадия образования сгущений может существовать достаточно долго, придавая пленке крапчатый вид (рис. 2д, 2е). В первую очередь преобразуются те участки пленки, которые находятся в фокусе сосуда. На этой стадии может происходить выделение двух морфогенетических слоев — внешнего, обращенного к жидкости, и внутреннего, находящегося между ним и стенкой сосуда. Вначале они не различаются по структуре, а их разделение можно фиксировать по закладке пузырей фотосинтетического кислорода между слоями и движению пузырей вверх по границе этих слоев (рис. 2ж).

Далее слои имеют существенно разную морфогенетическую судьбу. Во внешнем слое сетчатая структура формируется полностью, затем происходит сокращение площади слоя со скольжением по внутреннему слою. В течение всего этого времени внутренний слой может сохранять “потоко-

<sup>2</sup> Культура *Microcoleus chthonoplastes*.



**Рис. 3.** Стадии образования полигональной сети. а – Образование сгущений; б – образование ядер и лучей; в – установление связей между узлами сети; г – зрелая полигональная сеть. Масштабная линейка 1 мм.

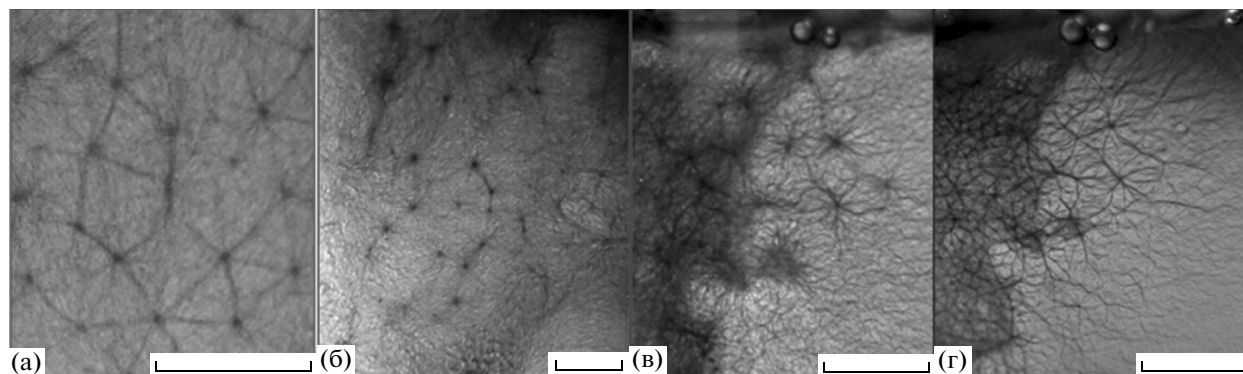
вую” структуру (рис. 2з–2н, 4а, 4б). Во время этих преобразований отсутствует влияние структуры одного слоя на другой. При сокращении наружного слоя внутренний слой приобретает непосредственный контакт со средой и преобразование его структуры начинается только после этого и только на тех участках, где это произошло. Образование полигональной сети во внутреннем слое идет путем индукции сетчатой структуры края внешнего слоя на внутренний слой и происходит соответственно от краев к центру освободившихся участков (рис. 2к–2н, 4в, 4г). В общем случае, сетчатая структура возникает при повышении освещенности. Однако, в наших опытах часто наблюдалось развитие сетчатой структуры внутреннего слоя при понижении освещенности, что может говорить не только о наличии самой индукции, но и о ее природе – о выработке некоторого аналога условного рефлекса, поскольку развитие участков сообщества не связано с определенными и однозначными корреляциями и определяется поведением его элементов (нитеями цианобактерий).

Выделение двух морфогенетических слоев не является неизбежной и обязательной стадией процесса: в большинстве случаев сообщество преобразуется как один слой. По нашим наблюдениям слои чаще всего выделяются в условиях повышения концентрации кислорода в герметически закрытых сосудах.

После образования сети начинается собственно процесс преобразования общей формы сообщества. В нем начинают формироваться зоны сжатия и растяжения (рис. 5). Структурно процесс идет в том же направлении, что и при образовании узелков сети, то есть путем возникновения иерархиче-

ских различий между первоначально однородными участками. Отдельные узелки сети утолщаются и отходящие от них тяжи начинают сократительные движения. В результате этого возникают центры слияния многих узелков и тяжей в единую плотную массу, являющуюся центром сокращения до его финальных стадий. Насколько можно проследить, в этой плотной массе длительное время сохраняется сетчатая структура, но сильно сжатая. Фрагменты сети, находящиеся между центрами сокращения, растягиваются вплоть до полного разрыва. На месте разрывов остается чистое стекло сосуда без фрагментов культуры цианобактерий, из чего можно сделать вывод, что не только сокращение, но и растяжение являются активной функцией. Пленка в однородном состоянии достаточно прочно прикреплена к стеклу всей поверхностью, а во время описанных морфогенетических преобразований прикрепляется только в области сжатия. В области растяжения нити ослабляют связи, как между собой, так и с субстратом, что вполне соответствует целям полной эвакуации всего сообщества с переосвещенных участков (рис. 6).

В целом, сообщество из тонкой пленки, равномерно расположенной на поверхности сосуда, может преобразовываться в систему компактных тяжей примерно за пять часов. Несмотря на то, что изначально на разные участки тяжа приходится разное количество материала сворачиваемой пленки, сами тяжи при завершении формирования на всем протяжении обладают одинаковой толщиной и плотностью, то есть при их образовании происходит перераспределение нитей в соответствии с заданной формой данной структуры (рис. 2о, 2п). Тонус тяжей определяется интенсив-



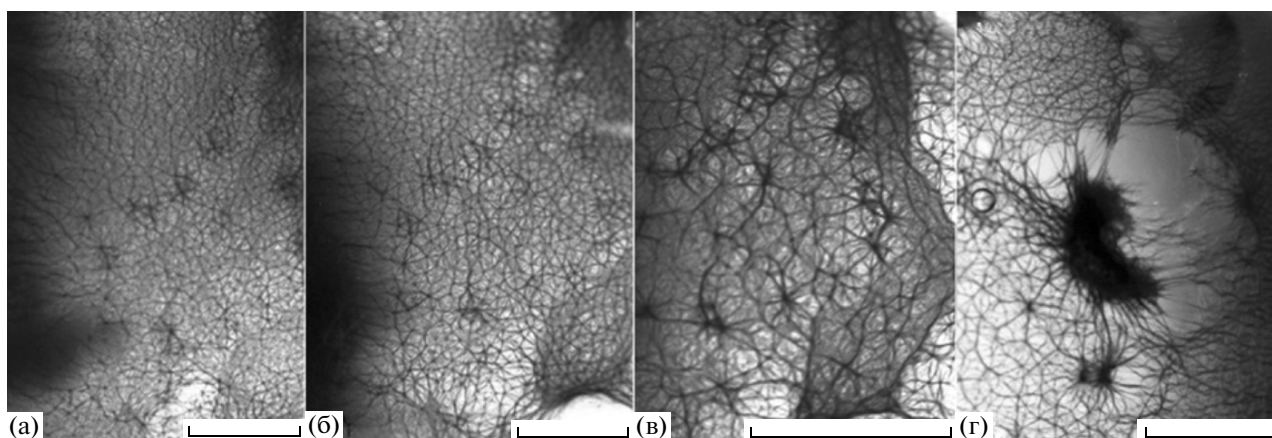
**Рис. 4.** Структура двух морфогенетических слоев. а, б – Образование сети во внешнем слое при сохранении потоковой структуры внутреннего; в, г – индукция сетью внешнего слоя образования сети во внутреннем слое за 1 час при ослаблении естественного освещения. Масштабная линейка 2 мм.

ностью освещения (фоточувствительность структур будет описана ниже). При падении интенсивности естественного освещения тяжи расслабляются и их система провисает (рис. 7а). Для поддержания связи с субстратом образуются прикрепительные тяжи по направлению и против направления движения всей системы вниз. Верхние тяжи растягиваются и существуют до момента прикрепления общей массы сообщества к субстрату. После этого они прикрепляются всей поверхностью к стеклу, сбрасывают напряжение и далее разбираются (рис. 7б). По направлению вниз в то же время тяжи растут и прикрепляются к субстрату (рис. 7в). Скорость роста тяжей превышает скорость провисания основной системы тяжей.

В ряде случаев сообщество принимает вид фотосинтетической сети, натянутой на тяже (рис. 8). Общий вид этой конструкции напоминает парус. Как было описано ранее (Сумина, 2006), на микроскопическом уровне сообщество имеет структу-

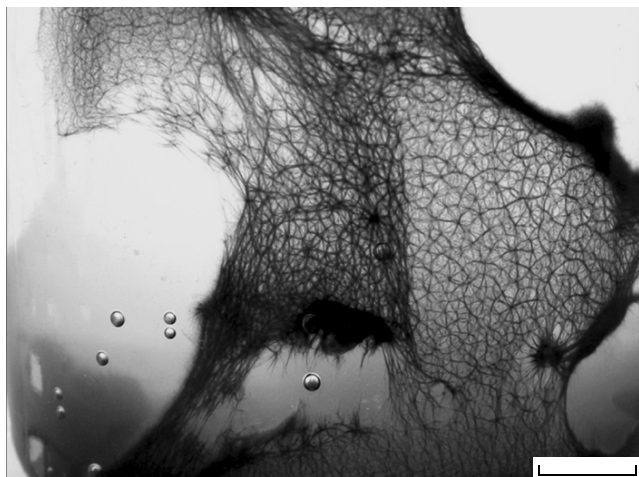
рированную границу, состоящую из трех зон: зоны сетчатого расположения нитей, зоны параллельного расположения нитей и зоны из нитей, расположенных перпендикулярно краю, имеющей вид бахромы (рис. 9б). Принципиально схожая картина наблюдается и в макроскопическом масштабе. Собственно площадь фотосинтетической сети пронизана армирующими тяжами. Ее край, обращенный к незанятому пленкой участку стенки сосуда, представляет собой четко различимую плотную границу, на которой расположены обращенные в среду пучки тонких коротких тяжей, расположенные примерно на равном расстоянии друг от друга. Важным отличием границы в макроскопическом масштабе является то, что она возникает не при распространении сообщества в среду, а при его сокращении.

Отдельные тяжи, возникающие при высокой интенсивности освещенности за счет сокращения пленки, при падении освещенности расслабляют-



**Рис. 5.** Образование зон сжатия и растяжения в полигональной сети. Масштабная линейка 1 см.





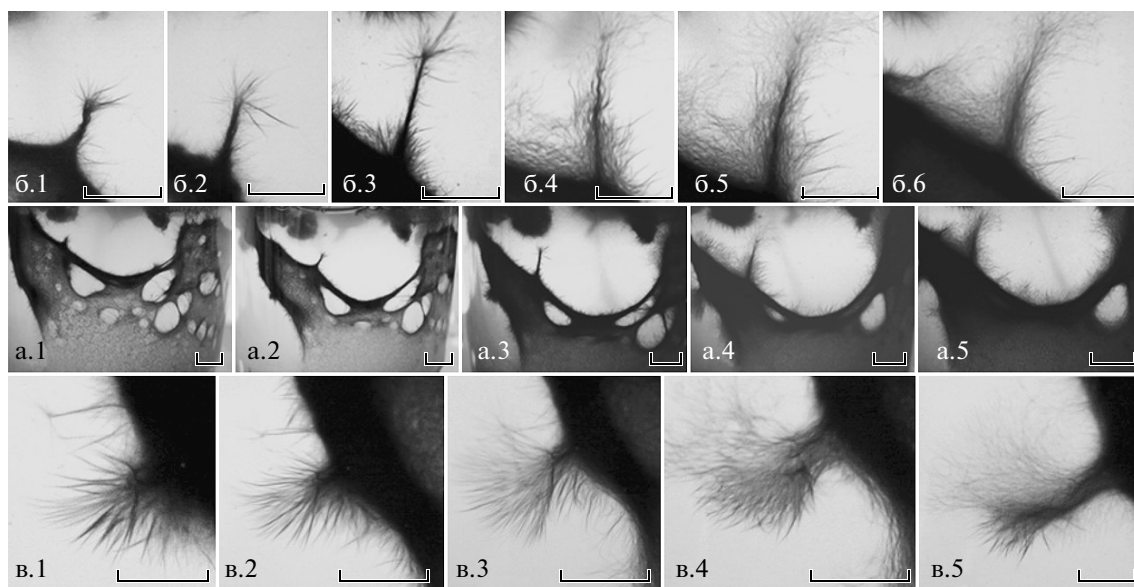
**Рис. 6.** Взаимодействие зон сжатия и растяжения в морфогенезе. Масштабная линейка 1 см.

ся, форма их становится извилистой, как на макро-, так и на микроскопическом уровне и они достигают поверхности стенки сосуда (рис. 10). В этом случае нити, слагающие тяж, распределяются по поверхности стекла в виде пленки; от тяжа остаются только реликты его структуры (рис. 10г). Однако, при повышении освещенности нити снова собираются в тяж, соответствующий первоначальной форме и расположению в пространстве, который в результате натяжения отходит от поверхности сосуда в толщу среды (рис. 10д). Возможно,

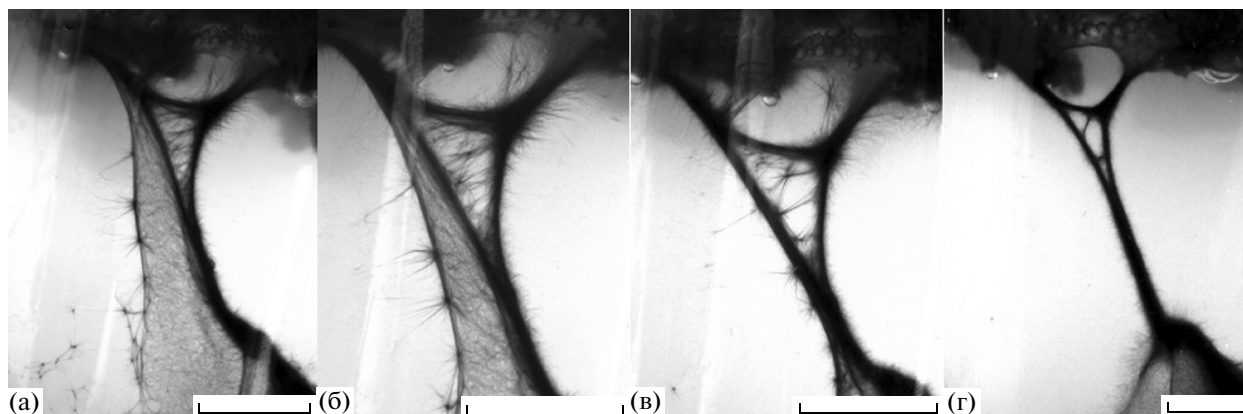
здесь наблюдается одно из наиболее ранних в эволюции проявлений эквифинальности. Реакция нитей, ранее входивших в тяж, по времени опережает подобную реакцию других частей сообщества и вызывается скорее не избыточной освещенностью, а просто ее ростом и наблюдаемый эффект может являться аналогом научения.

Выше были описаны преобразования, возникающие при суточных изменениях освещенности, скорость которых диктуется скоростью изменения фактора, а не возможностями самого сообщества. При искусственно создаваемых изменениях освещенности удалось наблюдать сокращение и расслабление тяжей и пленок, обусловленное фоточувствительностью, выраженные с максимальной для них в данных условиях скоростью. В частности, длинные тяжи расслаблялись и провисали при отключении света на 13–15 мм при длине тяжа около 60 мм за 4–6 минут (рис. 11а–11д). При включении света обратное натяжение происходит за то же время (рис. 11ж–11л). Сокращения и расслабления одного и того же тяжа в зависимости от освещенности удалось стимулировать более пяти раз.

Во время расслабления-сокращения меняется не только форма тяжа, но и его микроструктура. При натяжении он становится ровным и гладким, а при расслаблении извилистым и рыхлым (рис. 11е, 11м). При изменении освещения одновременно с тяжом испытывали сокращение и другие части сообщества, не прикрепленные к



**Рис. 7.** Образование прикрепительных тяжей при ослаблении естественного освещения. а – Динамика опадания пленки; б – образование и распад прикрепительного тяжа против направления опадания пленки; в – образование прикрепительного тяжа по направлению опадания пленки. Время протекания процесса 1.5 ч. Масштабная линейка а, в – 1 см, б – 5 мм.



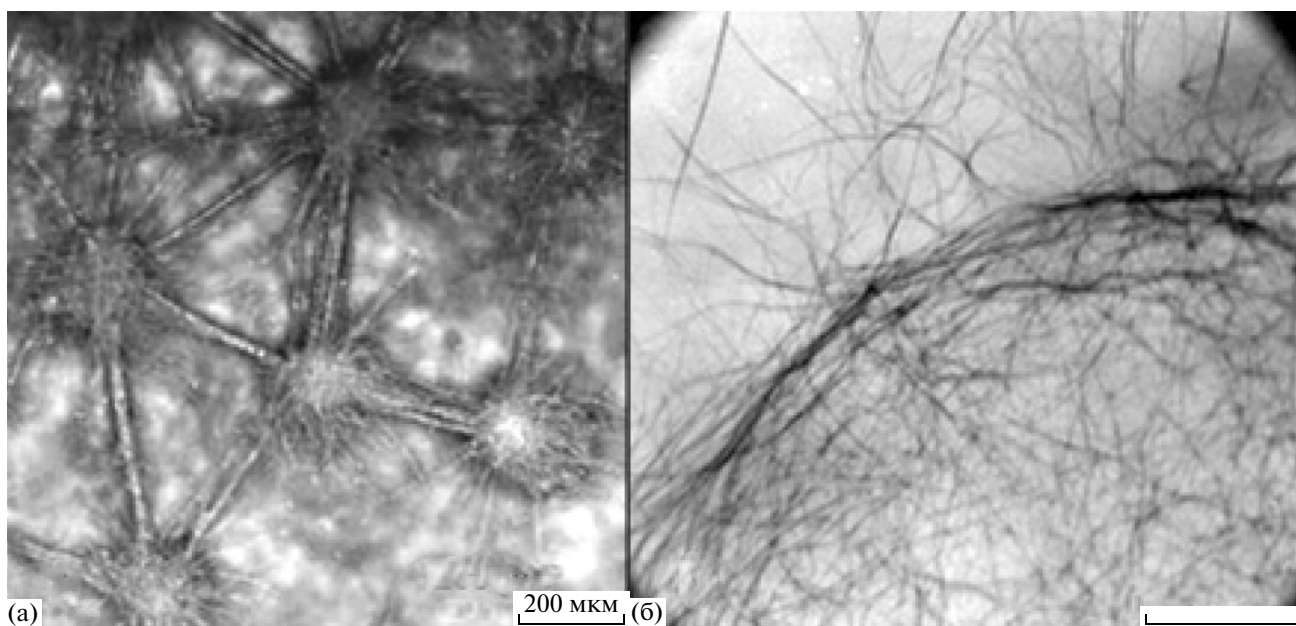
**Рис. 8.** Протекание морфогенеза при ослаблении естественного освещения. Время протекания процесса 2 ч 15 мин. Масштабная линейка 1 см.

субстрату: в частности, “висячие” тяжи — более, чем в два раза. Важно, что сокращался и свободный произвольный фрагмент пленки (рис. 11а–11д, 11ж–11м).

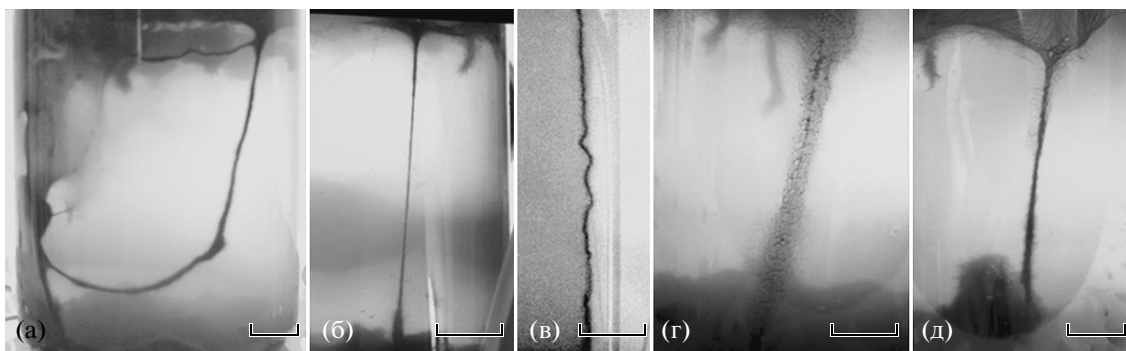
Способность к сокращению проявляет также не имеющая выраженных структур пленка, расположенная на стенке сосуда. Ее сокращение происходит по всей площади в вертикальном направлении около двух раз при длине около 60 мм. При отключении искусственного освещения она также испытывает расслабление и увеличивает свою площадь почти до первоначального размера. Преоб-

разование ее формы в процессе сокращения напоминает подъем шторы “маркиза” (рис. 12). Важным отличием от сокращения тяжа является то, что для пленки оно происходит примерно в течение часа, а расслабление — примерно за 15 минут — в отличие от 4–6 минут для тяжа, что еще раз подтверждает, что тяжи являются специализированными структурами для осуществления механических движений.

В условиях интенсивного естественного освещения сообщество не только сокращает свою поверхность, но и образует специфические структу-



**Рис. 9.** а — Полигональная сеть нитчатых цианобактерий (систематическое положение авторами не указано) Petroff et al., 2008, б — строение границы растущей пленки. Масштабная линейка 0.2 мм.

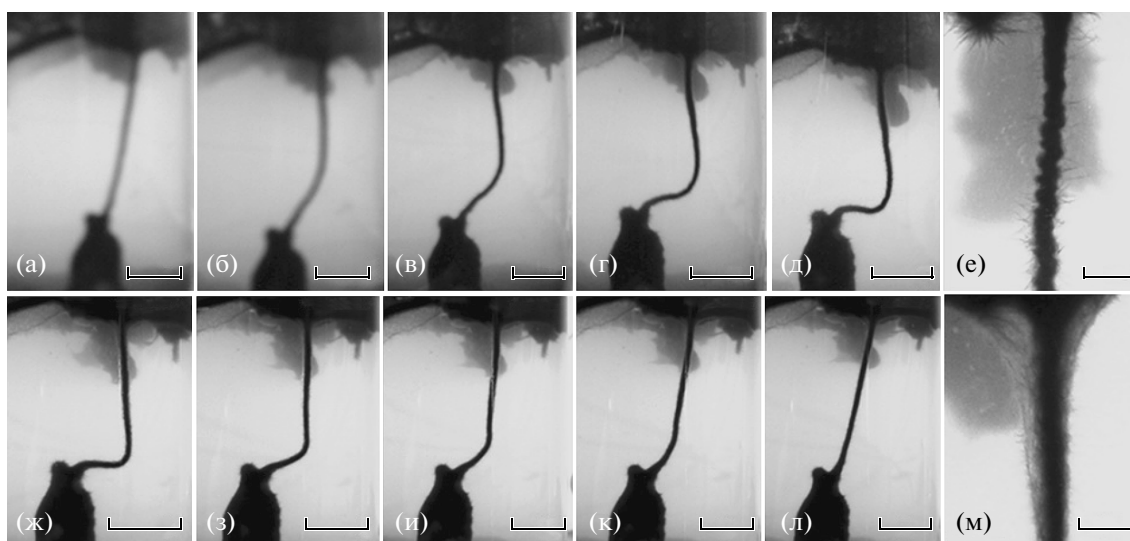


**Рис. 10.** Изменение строения тяжа и его положения в пространстве при изменении естественной освещенности. а–г – Уменьшение освещения, д – увеличение освещения. Время протекания – 10 ч. Масштабная линейка 1 см.

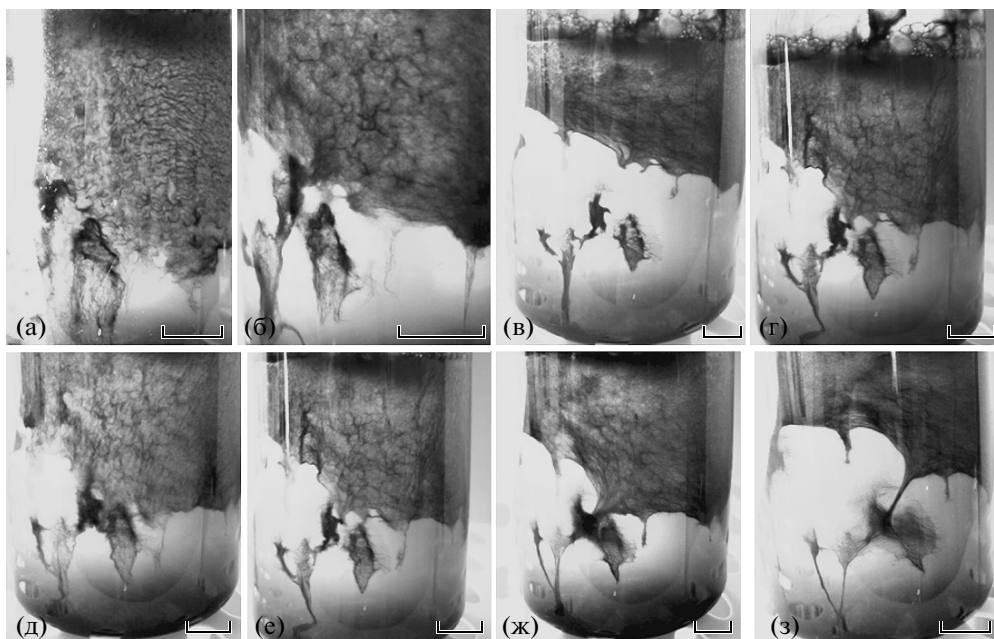
ры, увеличивающие поверхность фотосинтеза. К ним относятся “висячие” тяжи (рис. 13, 14). Морфогенез этих образований принципиально отличается от тяжей, возникающих в результате сокращения пленки, и проявляет сходство с образованием прикрепительных тяжей, описанных выше. Образование “висячих” тяжей начинается с возникновения на нижней стороне участка сообщества, находящегося на поверхности среды, особой выступающей области, напоминающей почку (рис. 13п). В области почки нити выходят в среду на значительно большую длину, чем на других участках. Затем из почки вниз начинает расти длинный ровный тяж, свободно висящий в жидкости. Структура “висячего” тяжа отличается от структуры двух видов упомянутых выше тяжей тем, что вся его поверхность плотно опущена хоро-

шо различными короткими тяжиками примерно равной длины и нижний его конец всегда свободен. На нем могут располагаться разрастания в виде кистей разной формы. Тяжи обладают механо- и фоточувствительностью, которые проявляются в сокращении и изгибании. В случае воздействия колебаниями среды тяж может изгибаться на  $90^\circ$  за пять минут после окончания воздействия (рис. 13). Фоточувствительность проявляется сходным образом, но за большее время и без столь однозначной связи с самим воздействием, поскольку оно значительно распределено по времени (рис. 14).

Все вышеописанные морфогенетические преобразования слишком сложны для того, чтобы объяснить их действием тех или иных физических сил, могущих возникать в сообществе при измене-



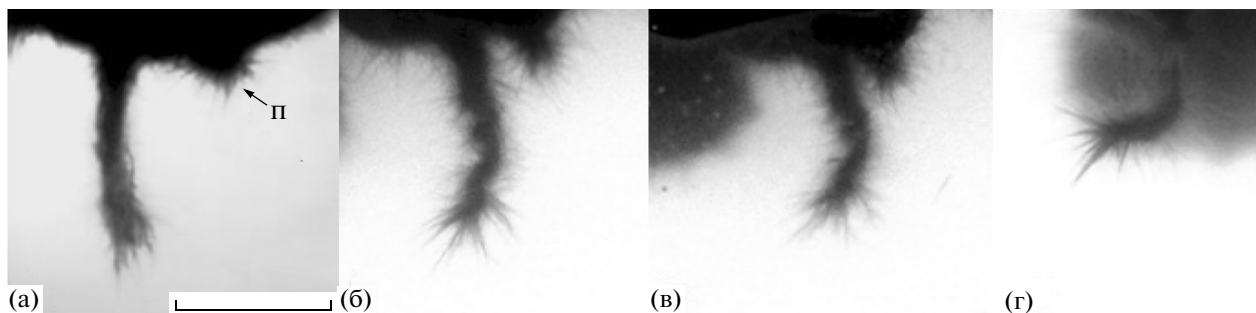
**Рис. 11.** Реакция тяжа на изменение освещения. а–д – Расслабление за 4 минуты при слабом искусственном освещении; ж–л – натяжение за 6 минут при сильном искусственном освещении; е – структура расслабленного тяжа; м – структура натянутого тяжа. Масштабная линейка а–д, ж–л – 2 см, е, м – 5 мм.



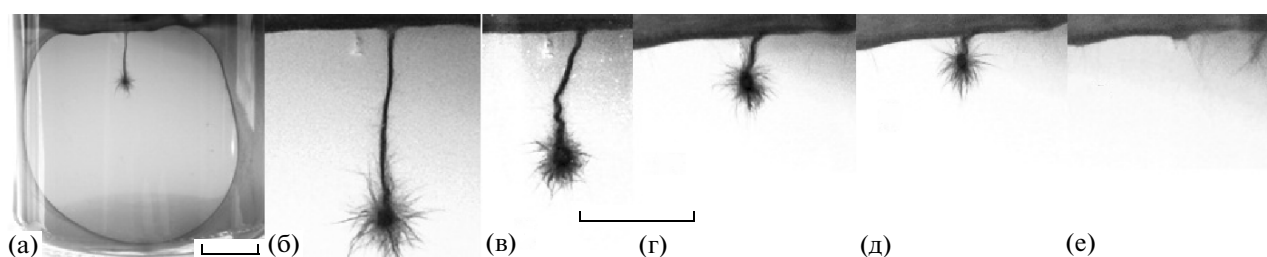
**Рис. 12.** Сокращение и расслабление пленки, не прикрепленной к стенке сосуда. а–в – Сокращение при сильном искусственном освещении (1.5 часа), г, д – расслабление при слабом искусственном освещении (15 минут), е–з – сокращение при возрастании естественного освещения (1 час 15 минут).

нии условий. Таким образом, встает вопрос о наличии в сообществе управляющей системы. В большинстве случаев ее в непосредственно выраженном виде наблюдать не удалось. Однако, в случае преобразования пленок в системы тяжей при избыточном освещении, механически этот процесс осуществляется сетчатой структурой, предварительно создаваемой сообществом для его обслуживания. Это наводит на мысль о том, что одновременно с механическими свойствами та же система может собирать и реализовывать информацию, необходимую для осуществления направленных морфогенетических преобразований. Общее сходство сетевых структур в сообществе цианобактерий со строением диффузной нервной системы низших многоклеточных может являться чисто внешним и само по себе ничего не доказывает. Однако, нам удалось наблюдать поведение изолированных объектов, названных нами многолучевыми агрегатами, которые аналогичны отдельным узлам сетчатых структур. Свойства поведения многолучевых агрегатов позволяют предполагать у них способность к сбору, созданию и реализации пространственной информации. Как было показано ранее (Сумина, 2006), эти образования способны к направленному движению в толще жидкости и к перемещению тяжей, что может задавать структуру сообщества при освоении им объема.

В экспериментах, результаты которых описываются ниже, наблюдалось образование и направленное перемещение многолучевых агрегатов по поверхности стенок лабораторного сосуда (рис. 15а–15р). При возрастании интенсивности естественного освещения, свежая пленка, покрывшая за ночь свободные от основной массы сообщества поверхности сосуда, начинает стягиваться в компактные образования, полностью освобождая участки поверхности между ними. Сами эти компактные образования примерно за 1 час приобретают вид звездчатого скопления с четко выраженным центральным ядром и лучами (сравнить с начальными стадиями образования узлов сети). Размер таких скоплений различен – от 0.5 до 5 мм. После окончания формирования некоторые многолучевые агрегаты начинают активное движение по поверхности стекла в направлении других ближайших агрегатов и объединяются с ними. В течение времени наблюдений удалось зафиксировать до пяти последовательных объединений. В процессе объединения их ядра могут полностью сливаться, но часто длительное время сохраняют оформленность. При этом “двухъядерный” многолучевой агрегат действует как единое целое (рис. 15х). Скорость движения агрегатов по стеклу достигает 3 см в час. При соприкосновении их лучей она несколько увеличивается. Некоторые многолучевые агрегаты образуют под углом к поверх-



**Рис. 13.** Висячий тяж. а–г — Изгибание в ответ на механическое воздействие; п — почка. Время протекания 5 мин. Масштабная линейка 1 см.



**Рис. 14.** Сокращение висячего тяжа. Усиление естественного освещения. Время протекания — 2.5 ч. Масштабная линейка 1 см.

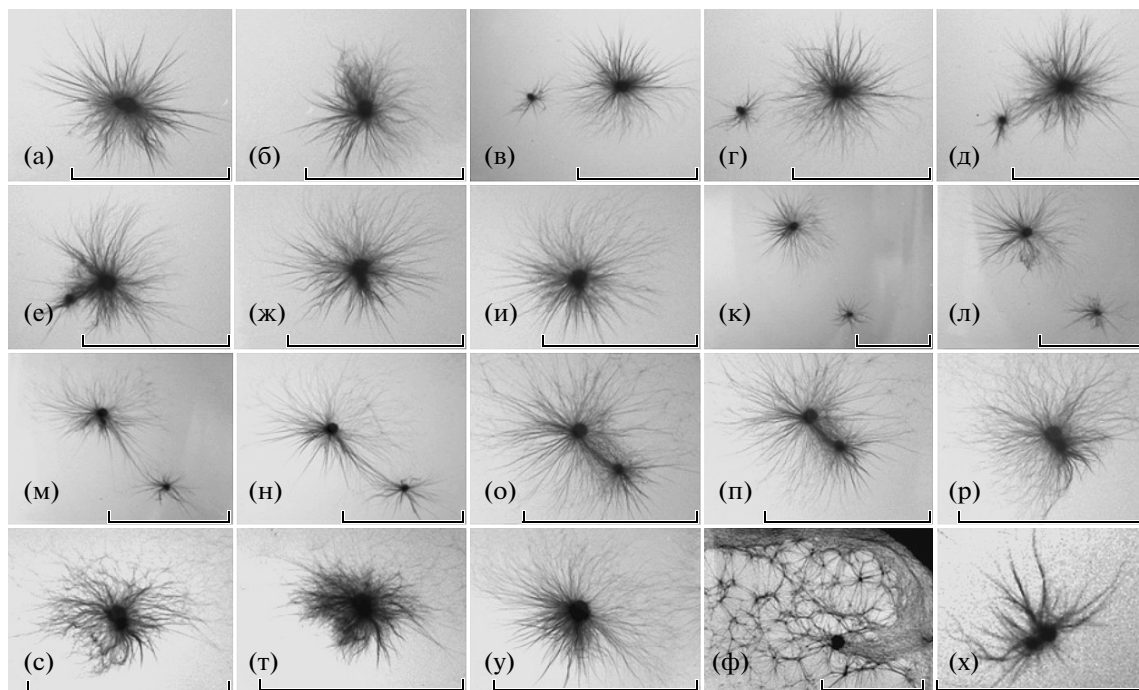
ности стекла вначале тонкий луч, а затем достаточно толстый тяж по направлению к близлежащему участку массы сообщества и подтягиваются к ней. Расстояние, первоначально разделяющее многолучевой агрегат и основную массу сообщества, может достигать сантиметра и более.

Многолучевые агрегаты обладают также механической чувствительностью. При возникновении колебаний в среде, например, от случайных толчков, их лучи сокращаются и изгибаются, при прекращении воздействия выпрямляются (рис. 15р–15у). При распространении от основной массы сообщества фронта нитей в область нахождения многолучевого агрегата возникает ячеистая структура, отличающаяся от других областей вновь возникающей пленки. Многолучевой агрегат обладает существенной автономией и способностью структурно влиять на вновь образующиеся участки сообщества (рис. 15ф). При включении многолучевых агрегатов во вновь образованную пленку и исчезновении структуры лучей, их ядра могут существовать более 12 часов, не испытывая на себе влияние других структур и даже продолжать влиять на вновь образующиеся структуры.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Предметом исследования явлений морфогенеза традиционно являлось становление морфологии по большей части крупных тел многоклеточных эукариот. Авторами исследован прокариотный объект, результаты морфогенеза которого вполне сопоставимы с таковыми у многоклеточных эукариот, однако здесь процессы идут по альтернативной схеме.

У нитчатых цианобактерий рода *Oscillatoria*, описанных выше, морфогенез в сообществе осуществляется исключительно за счет перемещения нитей и изменения пространственной структуры их расположения при отсутствии морфологической и физиологической специализации нитей. Это позволяет сообществу создавать крупные морфологически оформленные структуры, состоящие из специализированных частей, поддерживающих жизнедеятельность сообщества как целого (Сумина, 2006). При этом за счет отсутствия специализации нитей сообщество может в зависимости от изменения условий изменять свое строение любым необходимым ему образом. Фактически, наблюдаемый объект эволюционно находится на границе коллективного поведения его вполне самостоя-



**Рис. 15.** а–р – Перемещения и слияния многолучевых агрегатов. Усиление естественного освещения. а–ф – Единый ряд событий. а–р – 07:45–12:30; р–у – 12:30–13:15; ф – 16:00. х – Многолучевой агрегат с двумя ядрами. Масштабная линейка 5 мм.

тельных элементов (нитей) и онтогенеза в классическом понимании этого термина.

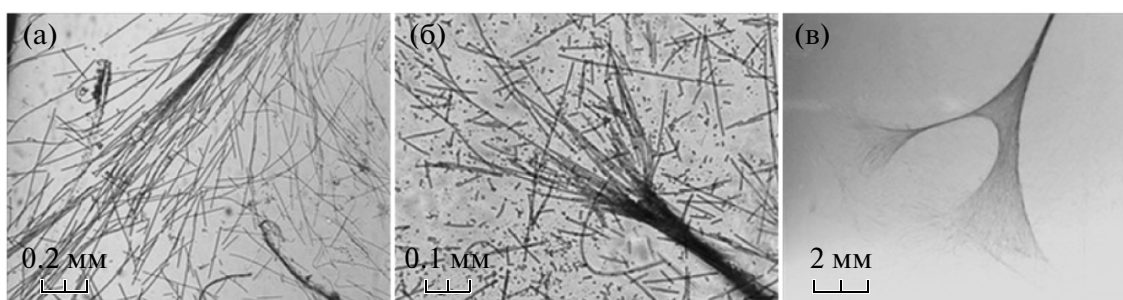
При сравнении прокариот и эукариот авторы придерживаются точки зрения, предложенной М.В. Гусевым и Г.Б. Гохлернер (1980) и полагают, что эукариотные клетки являются высокоспециализированными многоклеточными прокариотами, первичные однородные элементы которых при различных направлениях специализации дали все четыре типа полуавтономных органелл – митохондрии, пластиды, ядро и цитоплазму. Вероятнее всего, у многоклеточных эукариот наблюдается два иерархически соподчиненных уровня многоклеточности, которые являются фундаментом для согласованных специализаций, то есть биологического морфогенеза.

Если применительно к этой схеме рассматривать иерархию организации сообщества нитчатых цианобактерий, то, очевидно, что нити являются многоклеточными прокариотными организмами. Многоклеточность проявляется в наличии физиологических связей клеток через цитоплазматические мостики и наличии дифференцированных клеток в пределах одной нити (Гусев, Минеева, 2004). Таким образом, объединение прокариотных клеток в нить – это первый уровень многоклеточности, аналогичный тому, который лежит в основе

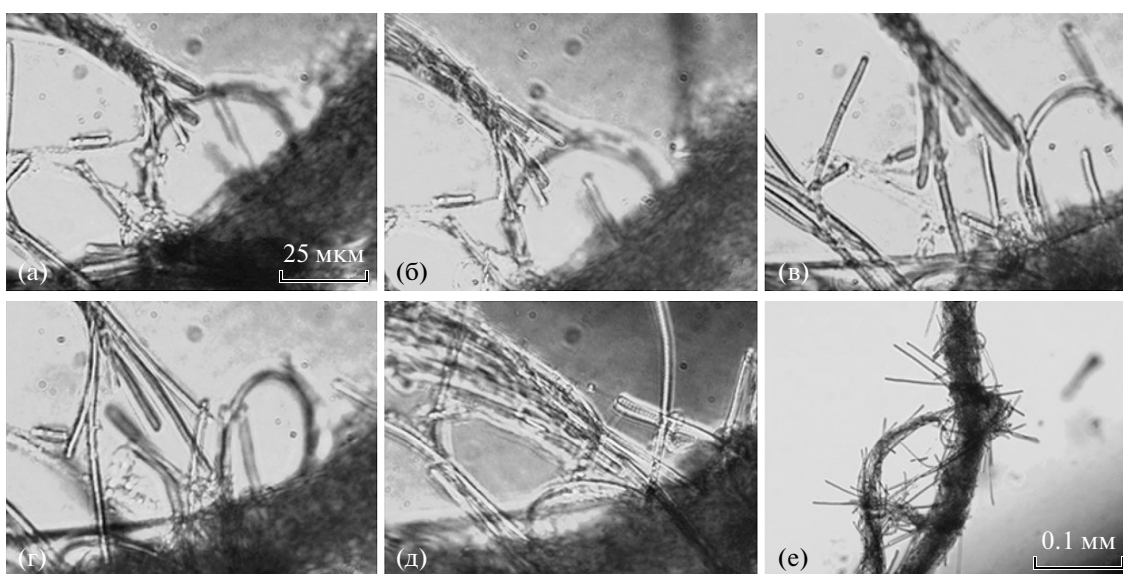
организации эукариотных клеток. Если в эукариотных клетках элементы прокариотного происхождения объединены в объеме, то у цианобактерий – линейно, что определяет как сходства, так и различия их организации.

Второй уровень представлен объединением нитей в сообщество, где осуществляется дифференцировка только пространственного положения элементов (нитей). Как представляется, это означает, что нитчатые цианобактерии соотносятся с эукариотами не как организмы предыдущего уровня развития, а как параллельная ветвь эволюции многоклеточности, находящаяся на той же стадии, что и многоклеточные эукариоты (рис. 19). Поэтому сходство их морфогенезов является вполне объяснимым.

Морфогенез в сообществах нитчатых цианобактерий обладает наибольшим сходством с морфогенезом многоклеточных эукариот в том, что представляется самым важным – в дифференциации на функционально согласованные части. Поведение отдельных нитей определяется не индивидуальными потребностями нитей, а потребностями большего целого, как показано для эукариот на примере гидроидов (Марфенин, 1993). Исходя из характера перемещений нитей в сообществе, можно предполагать наличие морфо-



**Рис. 16.** Прикрепительные тяжи. а – Механизм образования тяжа: полоса из параллельно движущихся нитей, начинающая консолидироваться в плотный тяж; б – сформированный тяж с оформленными дистальной и проксимальной частями; в – начало разворачивания тяжей в фотосинтетическую сеть.



**Рис. 17.** Последовательные стадии прикрепления тяжа к субстрату (в данном случае, другому тяжу). Время протекания – 20 мин.

генетических полей, аналогичных наблюдаемым в развитии эмбрионов многоклеточных эукариот (Белоусов, 1987). Масштабы согласования, то есть создание микроскопическими цианобактериями структур размером до 10 см (в наших экспериментах) и ископаемые следы существования таких структур, достигающих до 1 м в поперечнике (максимальный размер ископаемых строматолитов), соответствуют тому же размерному классу, в котором сосредоточено большинство морфогенетических явлений у многоклеточных эукариот. В данном случае размер можно воспринимать не как количественную, а как качественную характеристику. По-видимому, именно соотношение размера и физических и химических характеристик структур определяет в обоих случаях наличие организмов

трех уровней сложности: 1) органеллы эукариотных клеток – отдельные клетки нити цианобактерий; 2) клетки эукариот – отдельные нити цианобактерий; 3) многоклеточный организм – сообщество цианобактерий (пленка).

Все структуры формируются из цианобактериальных нитей, свободно движущихся друг относительно друга, и осуществляющих как контактные, так и дистантные взаимодействия. На время существования структур специализируется только пространственное положение нитей – 1) в отношении сообщества в целом, то есть в соответствии с его потребностями в данном месте и в данное время; 2) в отношении индивидуального положения в образующейся структуре, то есть в соответствии со строением данной части структуры и стадией ее

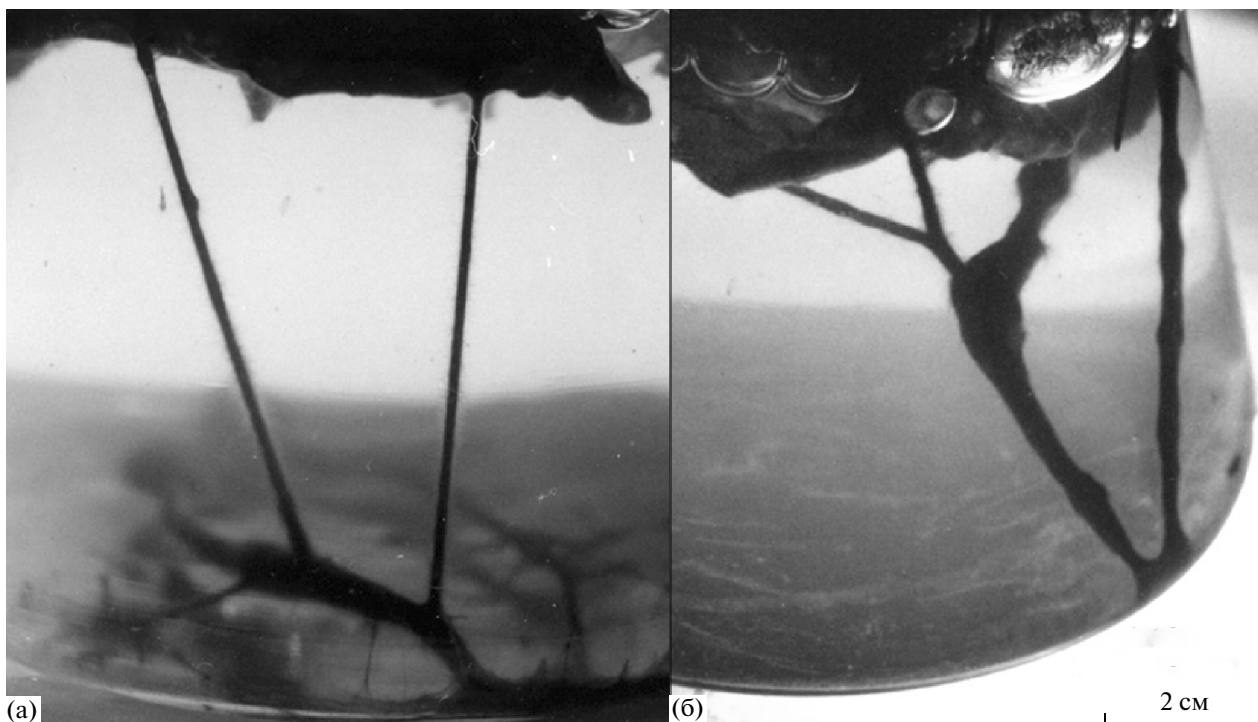


Рис. 18. Изменение пространственной структуры сообщества *Microcoleus chthonoplastes* при помощи сокращения тяжей. Искусственное освещение. Время протекания – 1 сутки.

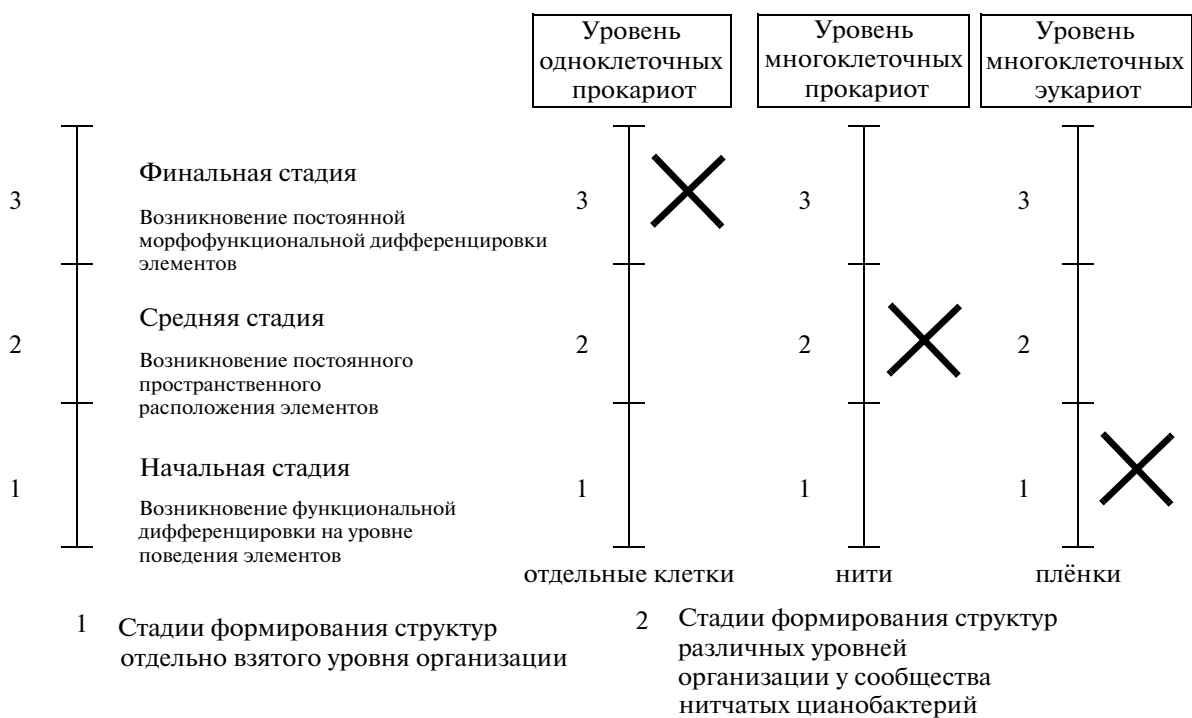


Рис. 19. Степень развития иерархических уровней организации цианобактерий (Сумина, 2005).



формирования; 3) по отношению друг к другу, то есть в соответствии с характером взаиморасположения нитей в том или ином участке структуры. Также наблюдается временная специализация адгезивных свойств нитей по отношению к субстрату и друг другу. Поскольку нити перемещаются в пределах структур при сохранении целостности последних, специализированными оказываются не те или иные нити, а именно определенные участки структур.

Отличия и сходства в протекании морфогенеза у цианобактерий и у многоклеточных эукариот по различным уровням организации распределены весьма мозаично.

У нитчатых цианобактерий порядка осцилляторных специализация клеток в нитях развита крайне слабо, в основном это касается концевых клеток, но в других порядках она может быть сильно развитой, как в морфологическом, так и в физиологическом плане (Кондратьева, 1995). Таким образом, здесь наблюдается не прямое структурное соответствие — нити состоят из неподвижных друг относительно друга специализированных элементов (клеток), а в структуру сообщества нити входят как подвижные и неспециализированные элементы.

На уровне отдельных элементов также наблюдается принципиальное отличие морфогенеза от такового многоклеточных эукариот. Элементы сообщества цианобактерий (нити), не испытывают специализации и не имеют постоянного пространственного положения в структуре.

На уровне самих структур, напротив, наблюдается принципиальное сходство с эукариотами — сложные структуры, демонстрирующие корреляцию в строении, возникают путем последовательной смены стадий, и могут иметь структуры-предшественники, что сходно с онтогенезом.

На уровне строения сообщества в целом опять наблюдается принципиальное различие — корреляция в образовании и расположении структур в сообществе отсутствует. Структуры возникают во времени и пространстве независимо друг от друга, но в зависимости от нужд сообщества в данное время и в данном месте. Также все структуры могут преобразовываться в любые другие (неэквивалентный морфогенез).

У многоклеточных эукариот сложная организация тел управляется и поддерживается множеством специализированных систем. В цианобактериальном сообществе пока обнаружена только одна система, одновременно выполняющая все три важнейшие функции — информационную, двигательную и распределительную — полигональная

сеть. Последняя функция была рассмотрена ранее (Сумина, 2006). О наличии у полигональных сетей информационных функций, помимо того, что они управляют направленными изменениями формы и структуры сообщества, свидетельствует также и то, что они состоят из элементов, даже в изолированном виде способных к созданию и реализации пространственной информации.

Неизбежно встает вопрос о субъекте (субъектах) создания и сохранения морфогенетической информации.

Высокая степень стереотипности морфогенезов многоклеточных эукариот в течение длительного времени создавала впечатление, что этот процесс происходит благодаря предопределенному механическому следованию наследственной информации. Наиболее распространенной в настоящее время точкой зрения является то, что наследственная информация возникает в структуре ДНК случайным путем и полезные изменения закрепляются естественным отбором. Однако, если организм теряет способность противостоять случайным изменениям своей структуры (поддерживать гомеостаз) и допускает свое приспособление к среде, это приводит к его специализации (потере целостности организации) и вымиранию (Сумин, Сумина, 2006). Только к такому исходу и может приводить воздействие низкоорганизованной системы на более высокоорганизованную. Возрастные степени независимости организма от среды, в частности, возникновение многоклеточности, пока остается без объяснения и пока не найден субъект, ответственный за ее информационное обеспечение.

Говоря о реализации информации клетками многоклеточных эукариот, необходимо обратить внимание на их способность к осуществлению эмбриональных регуляций при полном разрушении надклеточных структур эмбриона (Spiegel M., Spiegel E., 1975; Белоусов, 2005) и при культивировании тканей *in vitro* (Исаева, 1994). Это указывает на возможность создания и изменения морфогенетической информации самими клетками и их сообществами.

Таким образом, между цианобактериями и эукариотами наблюдается сходство в наличии коллективного поведении нитей и клеток, то есть на первичном уровне — уровне отношений их элементов. Различие же связано с отсутствием у цианобактерий вторичных, относительно поведения, эквивалентных морфогенезов.

На наш взгляд ценность цианобактериального сообщества как объекта морфогенетических наблюдений состоит в том, что здесь очевидным яв-

ляется факт создания и реализации пространственной информации самими нитями, поскольку нет никаких других источников ее возникновения. Другими словами, механические, электрические или иные градиенты, управляющие морфогенезом, не возникают в сообществе как внешние силы по отношению к его элементам (нитям), а создаются самими нитями с целью управления морфогенезом как процессом их взаимоорганизации при образовании целого. Также очевидно, что пространство, в котором информацию о структурных изменениях в котором реализует отдельная нить, значительно (на два порядка и более) превышает в размерах физически занимаемое ею пространство, причем это пространство является общим для всех нитей, вовлеченных в морфогенез. Это также не соответствует самоорганизации поведения отдельной нити или сумме таких самоорганизаций.

В.Я. Бродским (2009) выделено две ступени в работе информационной системы организмов: первая, геномная, реализующая информацию о собственных структурах и функциях организмов, и вторая, сигнальная, объединяющая организмы в агрегаты, и впоследствии, в постоянные организмы следующего уровня сложности. Результаты наблюдений над цианобактериями, как нитчатыми, так и одноклеточными (Кондратьева, 1995), вполне отвечают такой структуре отношений источников морфогенетической информации, и позволяют сделать вывод, что генетическая информация, определяющая постоянную структуру организма, является производной от деятельности сигнальной системы, обеспечивающей поведение его элементов.

Природа обнаруженного явления в дальнейшем требует специальных исследований, в частности, изучения сигнальных факторов морфогенеза.

Авторы выражают признательность Л.В. Белоусову, В.Я. Бродскому и В.В. Исaeвой за обсуждение и ценные замечания.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоусов Л.В.* Основы общей эмбриологии. М.: Изд-во МГУ, Изд-во Наука, 2005. 367 с.
- Белоусов Л.В.* Биологический морфогенез. М.: Изд-во Московского университета, 1987. 237 с.
- Бродский В.Я.* Прямые межклеточные взаимодействия и “социальное” поведение клеток млекопитающих, протистов и бактерий. Возможные причины многоклеточности // *Онтогенез*. 2009. Т. 40. № 2. С. 97–106.
- Герасименко Л.М.* Актуалистическая палеонтология циано-бактериальных сообществ // *Дисс. ... докт. биол. наук*. М., 2002. 70 с.
- Горбунова Н.П.* Альгология. М.: Изд-во Высшая школа, 1991. С. 54–71.
- Горюнова С.В.* Явление хищничества у синезеленых водорослей // *Микробиология*. 1955. 24. № 3. С. 271–274.
- Гусев М.В., Гохлернер Г.Б.* Свободный кислород и эволюция клетки. М.: Изд-во МГУ, 1980. 223 с.
- Гусев М.В., Минеева Л.А.* Микробиология. М.: Изд-во МГУ, 2004. С. 76–79.
- Еленкин А.А.* Синезеленые водоросли СССР. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1936, 1938. 977 с.
- Исаева В.В.* Клетки в морфогенезе. М.: Наука, 1994. 223 с.
- Комар Вл.А., Раабен М.Е., Семихатов М.А.* Конофитоны рифея СССР и их стратиграфическое значение // *Тр. ГИН АН СССР*. 1965. Вып. 131. 72 с.
- Кондратьева Н.В.* Флора водорослей континентальных водоемов Украины. Прокариотические водоросли. Киев: ин-т ботаники им. Холодного, 1995. Вып. 1. Часть 1. 235 с.
- Кондратьева Н.В.* Флора водорослей континентальных водоемов Украины. Прокариотические водоросли. Киев, 2001. Вып. 1. Часть 2. 342 с.
- Маргелис Л.* Роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Изд-во Мир, 1983. 351 с.
- Марфенин Н. Н.* Феномен колониальности. М.: Изд-во Московского университета. 1993. 237 с.
- Определитель бактерий Берджи*. М.: Изд-во Мир, 1997. Т. 1. С. 375–409.
- Сумин Д.Л., Сумина Е.Л.* Вымирание как результат приспособления / XX Люблинские чтения “Современные проблемы эволюции”. Ульяновск, 2006. С. 147–152.
- Сумина Е.Л.* Методические аспекты интерпретации морфологических структур строматолитов / *Материалы конф. памяти В.А. Вахрамеева*. М.: Геос, 2002. С. 129–131.
- Сумина Е.Л.* О формировании уровней организации клеточных организмов (на примере цианобионтов) / *Эволюционные факторы формирования разнообразия животного мира*. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. С. 95–102.
- Сумина Е.Л.* Поведение нитчатых цианобактерий в лабораторной культуре // *Микробиология*. 2006. Т. 75. № 4. С. 532–537.
- Dworkin M.* Recent Advances in the Social and Developmental Biology of the Muxobacteria // *Microbiol. Rev.* 1996. V. 60. № 1. P. 70–102.
- Petroff A., Sim M., Liang B., Rothman D., Bosak T.* Aggregation Phenomena in Cyanobacterial Analogues of Ancient Stromatolites / In: *Geobiology of Stromatolites*. J. Reitner, N. Quéric, M. Reich (Eds.) International Kalkowsky-Symposium, Universitätsverlag Göttingen. 2008. P. 106–107.
- Shimkets J.L.* Social and developmental biology of the Muxobacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1990. 54. (4). P. 473.
- Spiegel M., Spiegel E.* The reaggregation of dissociated embryonic sea urchin cells // *Amer. Zool.* 1975. V. 15. P. 583–606.

## Morphogenesis in a Community of Filamentous Cyanobacteria

E. L. Sumina and D. L. Sumin

<sup>a</sup> Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

<sup>b</sup> Network of Independent Scientists, Educators, and Experts in Biopolitics (NISEEB),  
Bolshaya Nikitskaya 6, Moscow, 103009 Russia

e-mail: stromatolit@list.ru

**Abstract**—Reversible differentiation was experimentally discovered in a community of modern filamentous cyanobacteria *Oscillatoria terebriformis*. Splitting of the initially uniform community into differentiated parts (strands, multiradiate aggregates, networks, etc.) occurs only for the duration of a function facilitating the activity of this community as an integral unit. The structures are formed as a result of regrouping of the filaments, without their specialization. A morphologically regulatory system (polygonal network) was found to develop under the impact of extreme factors. The levels of structural organization of filamentous cyanobacteria and multicellular eukaryotes were compared (individual cells in a filament—cell organelles; filaments—individual cells; community—organism), and the similarities and differences in morphogenesis of these groups were analyzed using the data on the embryonic regulation in multicellular eukaryotes. Spatial information in morphogenesis was shown to result not from direct realization of an inherited program but is created by the elements of integral organisms (cells and filaments) in the course of development.

**Keywords:** cyanobacteria, community, prokaryotes, eukaryotes, differentiation, morphogenesis, morphogenetic information.

---

Сдано в набор 10.01.2013 г.	Подписано к печати 02.04.2013 г.	Дата выхода в свет 23.05.	Формат 60 × 88 <sup>1</sup> / <sub>8</sub>
Цифровая печать	Усл. печ. л. 9.5	Усл. кр.-отг. 1.0 тыс.	Уч.-изд. л. 9.5
	Тираж 92 экз.	Зак. 1216	Цена свободная

---

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

---

Издатель: Российская академия наук. Издательство “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90  
Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”  
Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6