

	Название статьи	Страницы	Цит.
<b>ОБЗОРЫ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЧЛЕНИСТОНОГИХ И КЛАД ECDYSOZOA</b> Иванова-Казас О.М.	303	4
<input type="checkbox"/>	<b>ФОЛЛИКУЛЯРНЫЕ КЛЕТКИ ЯИЧНИКА АМФИБИЙ: ПРОИСХОЖДЕНИЕ, СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ</b> Кондукторова В.В., Лучинская Н.Н.	316	0
<input type="checkbox"/>	<b>УНИВЕРСАЛЬНЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЬ RAS И ЕГО РОЛЬ В РАЗВИТИИ ДРОЗОФИЛЫ</b> Митрофанов В.Г., Чекунова А.И., Прошаков П.А., Барсуков М.И.	331	0
<b>БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>УСТАНОВЛЕНИЕ ЛЕВО-ПРАВОЙ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ АСИММЕТРИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ: РОЛЬ БИЕНИЯ РЕСНИЧЕК И ЛЕВОСТОРОННЕГО ТОКА ЖИДКОСТИ В ОБЛАСТИ ГЕНЗЕНОВСКОГО УЗЕЛКА</b> Ермаков А.С.	341	0
<b>ОНТОГЕНЕЗ И ЭВОЛЮЦИЯ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ОБ ОДНОЙ УСТАРЕВШЕЙ ТРАДИЦИИ: СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ГАСТРУЛЯЦИЯ У ГУБОК?</b> Дондуа А.К., Костюченко Р.П.	357	0
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ В ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ОСТРОМОРДОЙ ЛЯГУШКИ (R. ARVALIS) ЧАСТЬ 3: МОДУЛЬНОСТЬ ИЛИ ЦЕЛОСТНОСТЬ РАЗВИТИЯ</b> Северцова Е.А., Северцов А.С.	364	0
<b>КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОЛА ПТЕНЦОВ ЖУРАВЛЕЙ ПО ДНК ИЗ КАПИЛЛЯРНЫХ СОСУДОВ АЛЛАНТОИСА</b> Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Гамбург Е.А., Гаврикова Е.Ю., Политов Д.В.	372	3
<b>ПОТЕРИ НАУКИ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ВАЛЕРИЙ ИВАНОВИЧ СТАРОСТИН (1939-2012)</b> Домарацкая Е.И., Паюшина О.В., Буторина Н.Н., Буеверова Э.И., Никонова Т.М.	377	0

УДК 591

## ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЧЛЕНИСТОНОГИХ И КЛАД ECDYSOZOA

© 2013 г. О. М. Иванова-Казас

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

E-mail: i-kazas@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.08.12 г.  
Окончательный вариант получен 05.02.13 г.

Проблема происхождения типа Членистоногих уже давно считалась решенной на основе данных эволюционной морфологии. Но молекулярно-биологические исследования последних лет выдвинули новое решение, противоречащее предыдущему. Таким образом, возникла необходимость пересмотра аргументации обеих сторон и поиска путей к достижению консенсуса. Это и составляет содержание настоящей статьи.

*Ключевые слова:* Arthropoda, Annelida, молекулярная биология, эволюционная морфология, переход от ресничного движения к мышечному.

DOI: 10.7868/S0475145013050042

Тип Arthropoda — один из самых крупных и процветающих таксонов животного царства, и его происхождение представляет собой важную проблему современной филогенетики. До недавнего времени считалось бесспорным, что Членистоногие произошли от Кольчатых червей, близких к современным Полихетам (В.Н. Беклемишев, 1964; А.В. Иванов, 1975). А Д.М. Федотов (1966) полагает, что различные подтипы Членистоногих произошли независимо от разных групп Кольчатых червей, в результате параллельной эволюции. Особенно убедительно развивает эту точку зрения Д.Т. Андерсон (Anderson, 1973), в монографии которого содержится детальный анализ индивидуального развития Аннелид и Членистоногих.

Но это, конечно, не означает, что Членистоногие произошли от каких-то конкретных современных групп Полихет. Поэтому особый интерес представляют результаты палеонтологических исследований. По данным А.Г. Пономаренко (2009), одним из компонентов так называемого “кембрийского взрыва”, происшедшего 510 млн. лет тому назад, была “артроподизация” — массовое появление животных, сходных с Членистоногими (нечто подобное отмечено и в эволюции других групп животных). Эти Членистоногие были очень разнообразными, но позднее большинство их вымерло. Однако “К концу кембрия среди членистоногих можно выделить формы, несомненно связанные с ракообразными и хелицеровыми” (с. 55).

\* \* \*

Однако в настоящее время достигло высокого развития новое научное направление — молекулярная биология. Основным результатом работы в этом направлении является признание того, что в зиготе в зашифрованном виде уже содержится наследственная программа индивидуального развития и его конечный результат. Эта программа осуществляется путем региональных и стадийных различий в экспрессии разных генов и взаимодействий между ними. В основе эволюции лежат наследственные изменения в этой программе и в ее реализации (Рэфф, Кофмен, 1986; Гилберт, Опиц, Рэф, 1997; Дондуа, 2005). В этой области уже достигнуто много интересных и важных результатов.

Но признание того, что формирование в онтогенезе морфологических признаков зависит от процессов, протекающих на молекулярном уровне, не означает, что эти признаки утратили значение очевидных свидетельств прошедшей эволюции. Тем не менее, окрыленные своими успехами современные молекулярные генетики стали пренебрежительно относиться к эволюционной морфологии, которую считают пройденным этапом науки. Опираясь в своих рассуждениях названиями разных генов, они часто не считают нужным сообщать, какие конкретные морфологические признаки от этих генов зависят. А это, в свою очередь, приводит к тому, что данные молекулярной генетики утрачивают интерес для морфологов.

Вследствие этого возникли значительные противоречия при решении некоторых филогенетических вопросов. Особенно важной (настоящим конфликтом) является различная трактовка проблемы происхождения Членистоногих. Рассмотрению аргументации обеих сторон и посвящена настоящая статья.

\* \* \*

Начну с того, что такие компетентные специалисты в области молекулярной генетики, как Рэфф и Кофмен (1986), разделяли традиционные представления о происхождении и эволюции Членистоногих. В их книге есть даже специальная глава “Филогения Членистоногих или как гомеология повторяет филогению”. Основная идея этих авторов состоит в том, что эволюционный путь от Кольчатых червей к Двукрылым Насекомым сопровождался серией гомеозисных мутаций, изменяющих структуру различных сегментов тела.

Но позднее Агвинальдо с соавторами (Aguinaldo et al., 1997) обнаружили, что многие животные, которым свойственны линьки, имеют сходную последовательность гена *18S rDNA*, и на этом основании создали новый клад, дав ему название Ecdysozoa (от слова ecdysis — линька). К этой группе причислены Членистоногие, Нематоды, Онихофоры, Киноринхи и Приапулиды, а Аннелиды, Моллюски и остальные Первичноротые в нее не включены. Таким образом, Arthropoda оказались оторванными от Кольчатых червей. А между тем линька, с эволюционной точки зрения, — это только один, и отнюдь не самый важный признак, из целого комплекса коррелятивно связанных признаков, возникшего в связи с переходом от ресничного движения к мышечному. Поэтому существование линек нельзя противопоставить сходству морфологических признаков, характеризующих планы строения Кольчатых червей и Членистоногих. Кроме того, линька, зависящая от 20-hydroxyecdysone, обнаружена также у Медицинской пиявки (Sauber et al., 1983; цитирую по Nielsen, 2003). При этом молекулярные биологи явно недооценивают возможность того, что линька и соответствующие гены могли возникнуть конвергентно (независимо) в разных группах животных, обладающих жесткими кожными покровами.

В связи с этим замечу, что глаза Насекомых и Позвоночных — органы бесспорно аналогичные (возникшие независимо в этих двух филогенетически далеких типах) — развиваются в результате экспрессии одинаковых генов *Pax-b*. Естественно предположить, что перед нами пример конвергенции на молекулярно-биологическом уровне.

Правда, авторы предполагают, что этот ген уже существовал и имел отношение фоторецепции у примитивных Metazoa (Гилберт и др., 1997), но пока это только предположение. В этой статье были приведены и другие примеры, показывающие, что существование одинаковых генов, выполняющих сходные морфогенетические функции, не может служить доказательством близкого родства сравниваемых групп. Возможно, некоторые гены возникают или начинают экспрессироваться тогда, когда это становится необходимым для благополучного прохождения через фильтр естественного отбора.

\* \* \*

Затем существование группы Ecdysozoa было подкреплено во многих статьях (De Rosa P., Grenier J.R., Anderson T.H., 1999; Halanych K.M., 2004; Philippe H., Lartillon N., Nrikmann H., 2005; Dunn C.W., Hejnol A., Mathus O., et al., 2008, и др.). Из этих публикаций более интересна статья Халанича (Halanych, 2004), в которой вся филогения животных рассматривается с позиций молекулярной генетики. При этом были использованы сведения, касающиеся более широкого круга молекулярных признаков. Тем не менее, в ней отсутствуют молекулярно-генетические характеристики даже самых крупных таксонов, не говоря уже о морфогенетическом значении генов, положенных в основу новых филогенетических представлений. А между тем, не исключено, что большинство молекулярно-генетических признаков, на которых основано отделение Членистоногих от Кольчатых червей, прямо или косвенно связано только с линьками и отсутствием ресничных структур. Однако автору вникать в такие мелочи показалось излишним, и он часто ограничивается констатацией того, совпадают ли в каждом конкретном случае новые филогенетические представления со старыми. На рис. 1 изображена часть приведенной у Халанича кладограммы; в ней повторяется только то, что и в статьях других молекулярных генетиков. В связи с проблемой происхождения Членистоногих он пишет, что сегментация могла возникнуть у Кольчатых червей и Членистоногих независимо и не является для филогении более важным признаком, чем линька. По мнению этого автора, для реконструкции филогении сведения о связанных с индивидуальным развитием генах, важнее, чем само индивидуальное развитие и морфологическая характеристика разных таксонов.

Но с этим согласиться уже нельзя. В основе органической эволюции лежат адаптации к различному образу жизни и борьба за существование, которые контролируются естественным отбором и

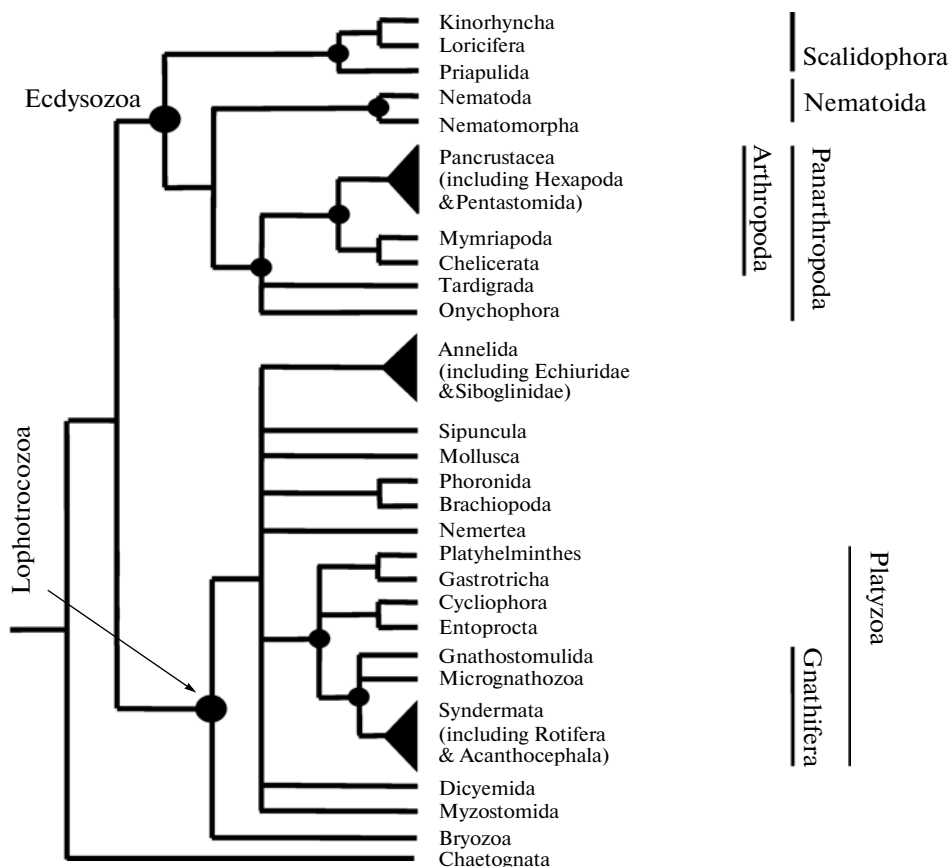


Рис. 1. Часть кладограммы, относящаяся к Protostomia (из: Hanalych, 2004).

находят свое отражение в морфологии. Поэтому морфология более полно характеризует эволюционные преобразования, и решать проблемы филогении без учета морфологических данных нельзя.

Тем не менее, экдизозойная концепция приобрела широкое признание, как последнее слово науки; она не только цитируется в специальных статьях и сводках, но вошла и в учебные руководства. А молекулярные биологи даже не пытаются согласовать свои представления с таковыми морфологов, они морфологию просто игнорируют. А такой односторонний подход к изучению явления природы считать строго научным нельзя, так как в Природе все взаимосвязано.

\* \* \*

Приступая к обсуждению проблемы происхождения Членистоногих с морфологической точки зрения, следует напомнить, что все стадии индивидуального развития (от зиготы до взрослого животного) взаимосвязаны, и эволюция совершается путем изменения всего жизненного цикла (Беклемишев, 1964; Шмальгаузен, 1969). И при решении филогенетических вопросов нельзя базироваться только на произвольно выбранных

стадиях или показателях, а нужно учитывать весь комплекс анатомических и онтогенетических признаков (включая, конечно, и данные молекулярной биологии).

Попробуем начать рассмотрение “устаревшей” точки зрения морфологов с хотя бы поверхностного сравнения организации и индивидуального развития Нематод, Полихет и Членистоногих. Эти сведения удобнее всего представить в форме таблицы 1. Из этой таблицы видно, что общими признаками для Нематод и Членистоногих являются только отсутствие ресничной личинки и существование линек, которые, как будет показано ниже коррелятивно связаны друг с другом.

По большинству других признаков Полихеты и Членистоногие очень близки, а происхождение существующих между ними различий легко может быть понято и убедительно объяснено.

Конечно, было бы очень интересно, если бы такая же таблица была составлена и для генов, по которым сходны или различаются сравниваемые типы животных, причем в нее были бы включены не только те гены, которые имеют отношения к ресничкам и линьке. Но такой таблицы, к сожалению, нет.

Сходства и различия организации и развития Nematoda, Polychaeta и Arthropoda

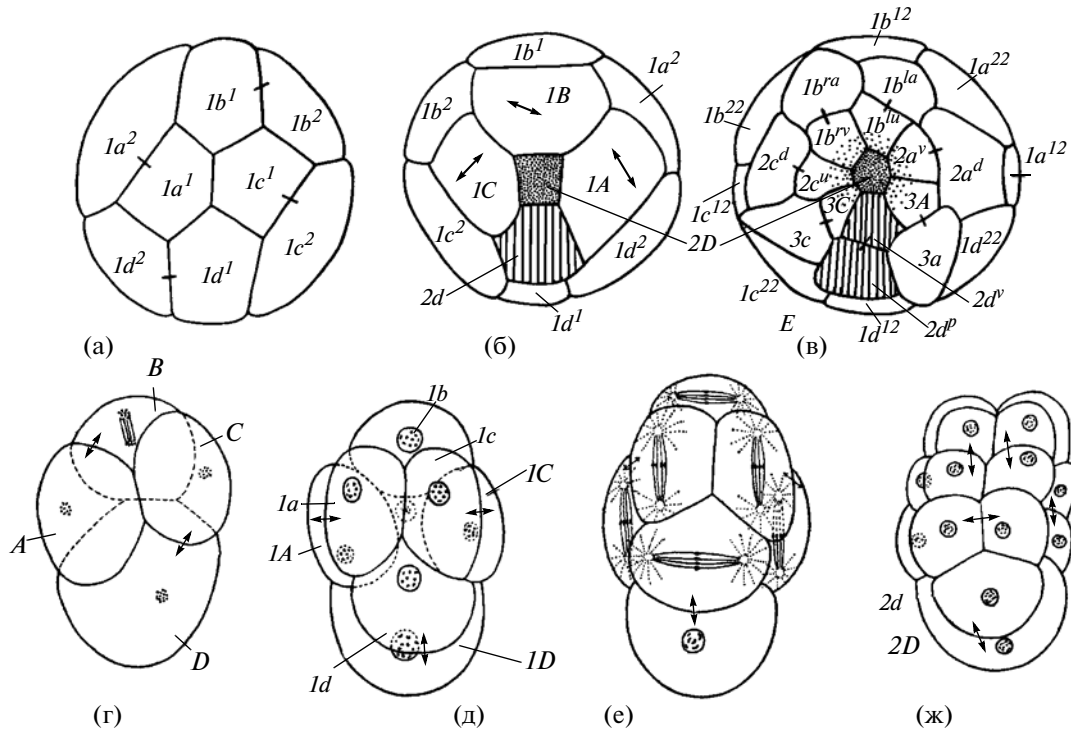
	Nematoda	Polychaeta	Arthropoda
Метамерия	Отсутствует	Есть	Есть
Конечности	Нет	Параподии	Сложные, расчлененные
Мускулатура	Кожно-мышечный мешок	Кожно-мышечный мешок и отдельные мышечные пучки	Сложная система мышечных пучков
Целом	Отсутствует	Есть	Миксоцель, но сохранились следы целома
Нервная система	Головного ганглия нет. Есть окологлоточное кольцо и непарный брюшной ствол	Надглоточный ганглий и брюшная нервная цепочка, состоящая из 2-х стволов, соединенных поперечными комиссурами	Надглоточный ганглий и брюшная нервная цепочка, состоящая из 2-х стволов, соединенных поперечными комиссурами
Дробление яйца	Полное, билатеральное	Полное, спиральное	Неполное, со следами спирального
Гастрюляция и органогенез	У всех разные		
Личинка	Нет (утрачена?)	Трохофора и метатрохофора	Личинка, соответствующая метатрохофоре
Линька	Есть	Нет	Есть

\* \* \*

Возникновение новых типов животных бывает, разумеется, связано не только с изменением морфофизиологической организации, но и с глубокими изменениями в работе генетического аппарата, о которой мы пока мало знаем. И это совершается не путем одновременного появления всего комплекса новых морфологических признаков. Сначала появляются 1–2 новых, и на первый взгляд незначительных признаков, а затем в результате морфофизиологических корреляций происходят новые изменения организации. Так протекало и формирование типа Членистоногих. Все началось с усиления мускулатуры и с утраты трохофоры. Дело в том, что одним из важнейших шагов прогрессивной эволюции животных был переход от плавания и ползания с помощью ресничек к более эффективному способу передвижения с помощью сокращения мышц, делающих возможным изгибание всего тела и его придатков. Такой переход фактически происходит и в индивидуальном развитии Полихет во время метаморфоза, когда расселительная ресничная личинка (трохофора) превращается в метатрохофору, а затем и в червя. А после того, как в эволюции взрослых животных мышечная система достигла более высокого уровня, стадия трохофоры стала ненужной и была исключена из развития.

Дальнейшее усложнение мышечной системы вызвало коррелятивные изменения, затрагивающие всю организацию животных, вследствие чего и возник новый тип животных — Arthropoda. А главное эволюционное значение утраты ресничной личинки, для существования которой нужна вода, состояло в том, что она сделала возможным переход к наземному образу жизни, что повлекло за собой еще более значительные изменения в организации наземных Членистоногих.

С зачаточными конечностями (параподиями) Полихет уже связаны специальные мышечные пучки. У Членистоногих параподии превратились в расчлененные конечности, что способствовало дальнейшему усложнению мускулатуры. На смену кожно-мускульному мешку пришла сложная система мышц, пересекающих полость тела в разных направлениях. А для прикрепления этих мышц потребовались достаточно прочные точки в разных местах гиподермы. Поэтому последняя стала выделять более жесткую кутикулу, обычно содержащую хитин, а иногда и углекислый кальций. А чтобы сделать возможными увеличение размеров и изменения формы тела в процессе постэмбрионального развития, пришлось эту кутикулу периодически сбрасывать. Так возникли линьки, которым Агвинальдо с соавторами придают такое большое значение.



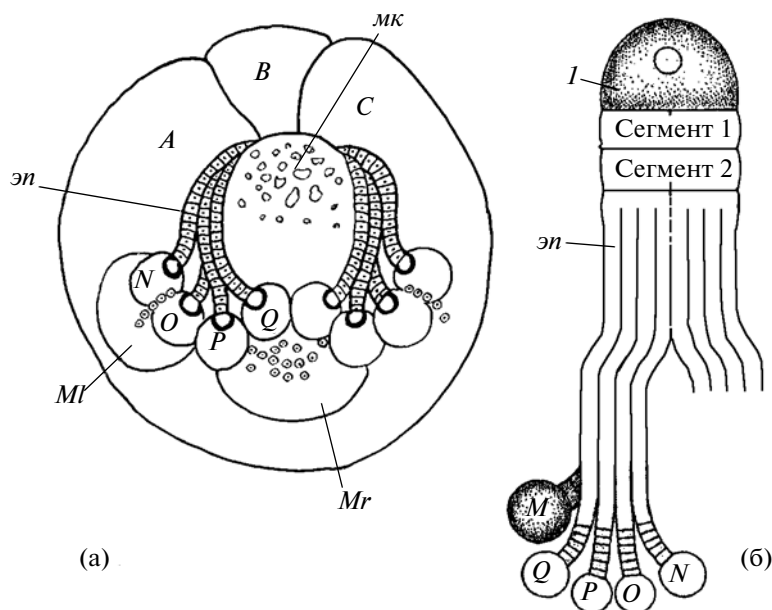
**Рис. 2.** Дробление яиц Ракообразных. *Holopedium*: (а) и (б) – стадии 16 бластомеров, вид с животного и вегетативного полюса; (в) – стадия 31 бластомера с вегетативного полюса. Обозначения бластомеров отличаются от общепринятых. Макромер 2D стал половым зачатком, микромеры 2d<sup>v</sup> и 2d<sup>p</sup> – представляют собой зачаток энтодермы, мезодерма происходит от шести клеток, примыкающих к половому зачатку спереди; *Lepas*: (г) и (д) – стадии 4 и 8 бластомеров, (е) – 4-е деление дробления, (ж) – стадия 16 бластомеров. (Из: Anderson, 1973, и Bigelow, 1902.)

Короче говоря, кутикула превратилась у Членистоногих в наружный скелет, а у Полихет роль внутреннего гидроскелета играет сегментированный целом, способствующий сохранению узкой и длинной формы тела этих червей (у Эхиурид и Сипункулид, тело которых имеет короткую мешкообразную форму, целом остается несегментированным). А после возникновения у Членистоногих прочного наружного скелета целом утратил свою опорную функцию и его стенки стали разрушаться, что привело к возникновению смешанной полости тела (миксоцеля). Тем не менее, у многих Членистоногих во время эмбрионального развития целом все-таки формируется, но позднее редуцируется. Сразу же следует отметить, что следы унаследованных от Полихет особенностей индивидуального развития лучше всего сохранились у Ракообразных. Поэтому рассмотрение онтогенеза Членистоногих мы будем начинать с них.

У большинства Ракообразных представлены различные переходы от бедных желтком изолецитальных яиц к централецитальным, а дробление представлено у них очень многими вариантами. В тех случаях, когда яйца содержат не очень много желтка, дробление остается полным. В большинстве случаев оно начинается как спиральное,

но правильность в расположении бластомеров раньше или позже исчезает. Спиральное дробление Полихет характеризуется также ранней детерминацией бластомеров, выработавшейся в результате установки развития на трохофору (о которой писал П.П. Иванов, 1937); у Олигохет и Пиявок стадия трохофоры исчезла, поэтому перспективное значение многих бластомеров изменилось. Еще более значительные изменения в этом отношении произошли у Ракообразных, у которых выработалась установка на новую личиночную стадию – на науплиуса.

Это ясно видно при рассмотрении дробящихся яиц *Holopedium* (отряд Cladocera) с вегетативного полюса (рис. 2а–2в). У этого рака макромер 2D, от которого у Полихет происходит почти вся дорсальная эктодерма и целомическая мезодерма, превратился в половой зачаток, а мезодерма образуется за счет микромеров квадрантов А, В и С. Не слишком перегруженные желтком яйца *Lepas* (отряд Cirripedia) относятся к телолецитальному типу и имеют хорошо выраженную анимально-вегетативную полярность, а в расположении бластомеров при дроблении уже проявляется билатеральная симметрия (рис. 2д–2ж). В то же время дробление яиц у *Holopedium* и *Lepas* так сильно



**Рис. 3.** Зародышевые полосы Пиявок: (а) — *Theromyzon rude* (вид с животного полюса); (б) — *Helobdella triseriata* (схема). *A, B, C* — макромеры, *Ml* и *Mr* — левый и правый мезодермальные телобласты, *N, O, P, Q* — эктодермальные телобласты, *I* — предротная лопасть, *mk* — микромеры, *эн* — эктодермальные полосы (а мезодермальные полосы лежат под ними). (Из: Fernandes, Stent, 1980; Дондуа, 2005.)

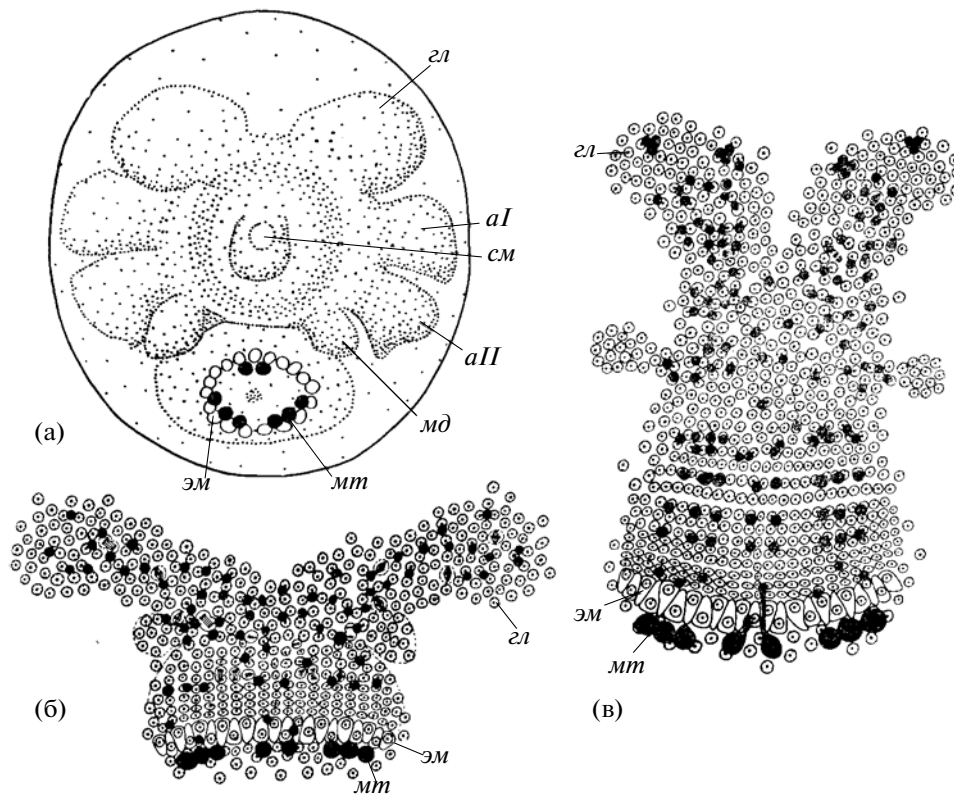
различается, словно оно, утратив свои старые навыки, ищет новых путей. Альтернативная точка зрения состоит в том, что Ракообразные произошли от каких-то Аннелид, дробление яиц которых относилось к довольно примитивной форме спирального типа, еще не имеющей такой строгой установки на трохофору.

Характерным признаком развития Кольчатых червей является также телобластический способ образования целомической мезодермы. Две клетки, происходящие от бластомера *4d*, становятся мезодермальными телобластами — от них отделяются направленные вперед ряды клеток — мезодермальные полосы (сам термин “телобласт” означает — концевая клетка). Затем эти полосы сегментируются и в них схизоцельным способом образуются целомические полости. У других Трохочоа (Эхиурид, Сипункулид и Моллюсков) целомическая мезодерма тоже образуется за счет двух клеток, происходящих от *4d*, но настоящими телобластами эти клетки не становятся. Заслуживает упоминания и тот факт, что у Олигохет и Пиявок (которые уже утратили трохофорную личинку) телобластическим способом развивается не только мезодерма, но и большая часть эктодермы. У них от бластомера *2d* происходят 3 или 4 пары эктодермальных телобластов, которые продуцируют две растущие вперед эктодермальные полосы (рис. 3). Все это интересно в связи с тем, что телобласты встречаются также и у некоторых Ракообразных.

А у Высших Раков яйца очень богаты желтком и прорывают неполное дробление, в результате которого на поверхности яйца образуется слой клеток — бластодерма или бластодиск. В одном месте из скопления клеток бластодермы возникает зародышевое пятно (или полоска), в котором сосредоточены все морфогенетические процессы. Соответственно сильно изменились гастрюляция и начальные стадии органогенеза. У большинства Высших Раков бластопоральная область находится на заднем конце зародышевой полоски, где позднее образуется проктодеум. И в этой области иногда появляются мезодермальные и эктодермальные телобласты, которые продуцируют материал эктодермы и мезодермы постларвальных сегментов (рис. 4).

Хотя телобластический процесс здесь модифицирован — количество телобластов увеличилось, что объясняется тем, что и сам зародыш на стадии их образования состоит уже из очень большого количества клеток. Но телобластический способ образования эктодермы и мезодермы у Ракообразных можно объяснить только их близким родством с Аннелидами, так как телобласты нигде больше в Животном царстве не встречаются.

Как уже отмечалось, у взрослых Членистоногих целома нет, но у некоторых представителей этого типа после разделения мезодермы на сомиты в последних возникают целомические полости. Целом очень хорошо выражен во время эмбрионального развития у некоторых Ракообраз-



**Рис. 4.** Телобласты в развитии Высших Раков. (а) — зародышевая полоска *Heptacarpus*; (б) и (в) — ранняя и средняя зародышевые полосы *Asellus aquaticus*. *aI* и *aII* — зачатки двух пар антенн, *гл* — головные лопасти, *мд* — зачатки мандибул, *мт* — мезотелобласты, *см* — стомодеум, *эм* — эктотелобласты. (Из: Oishi, 1959; Weygoldt, 1960.)

ных (*Lernaea* — рис. 5а), Мечехвостов (*Limulus*), Онихофор, (*Peripatopsis* — рис. 5в), Скорпионов (рис. 5б), Пауков, Многожек (*Scolopendra*), Поденок, Прямокрылых, Тараканов, Уховерток и др. (см. Иванова-Казас, 1979, 1981). Но на более поздних стадиях эмбриогенеза стенки целомических мешков распадаются на отдельные клетки, дифференцирующиеся в разных направлениях. В развитии более высокоорганизованных Насекомых (в отрядах Нуменоптера и Diptera) целом уже не формируется или выражен неясно.

Подобно тому, как присутствие зачаточных жаберных щелей у зародышей наземных Позвоночных доказывает их происхождение от водных животных, так и временное наличие целомических полостей у Членистоногих доказывает, что у их предков был хорошо развитый целом. А предположить, что целом возник у самих Членистоногих, очень трудно, так как единственная функция, которую его зачатки, возможно, выполняют, это участие в сложившихся ранее морфогенетических корреляциях.

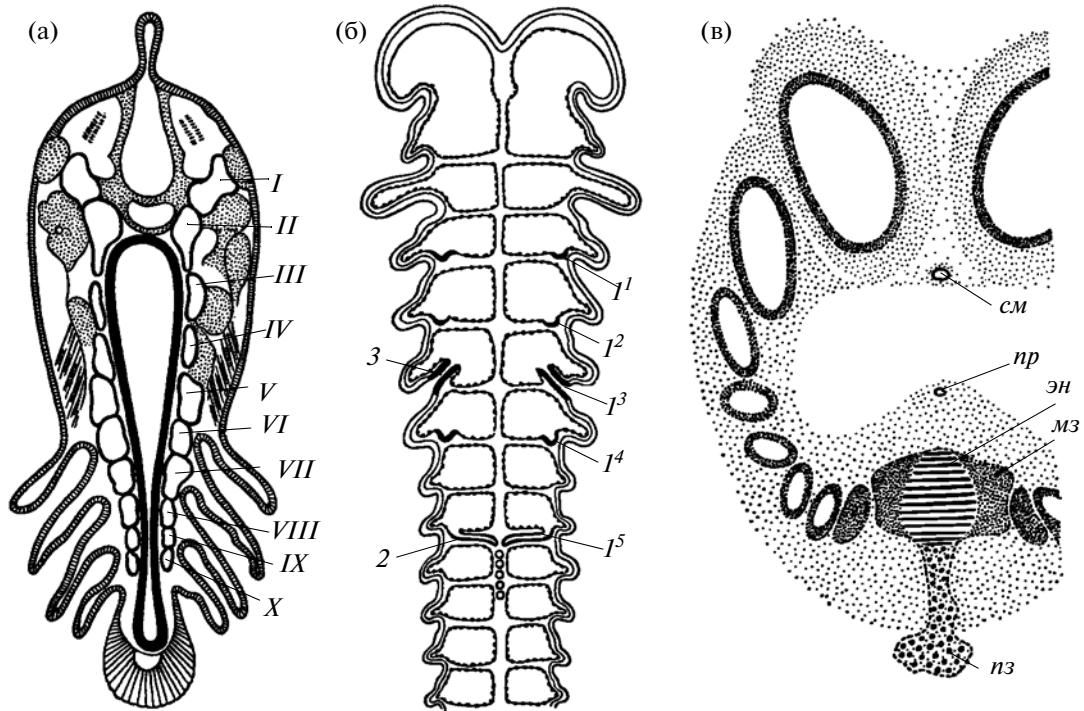
Кроме того, у большинства Членистоногих сохраняется унаследованная от Кольчатых червей первичная (онтогенетическая) гетерономность

сегментов. Эта гетерономность состоит в том, что сначала тело одновременно расчленяется на несколько ларвальных сегментов, а потом на заднем конце возникает зона роста, которая начинает продуцировать один за другим неопределенно большое количество постларвальных сегментов. Это хорошо выражено у низших Ракообразных: из яичевых оболочек выходит науплиус, тело которого состоит из предротовой лопасти и трех ларвальных сегментов, несущих 3 пары конечностей: антенны *aI*, антенны *aII* и мандибулы (рис. 6а). Эта личинка по уровню своего морфологического развития соответствует стадии метатрохофоры у Полихет. Науплиус активно плавает, питается и растет, затем на его заднем конце образуется зона роста, продуцирующая новые сегменты.

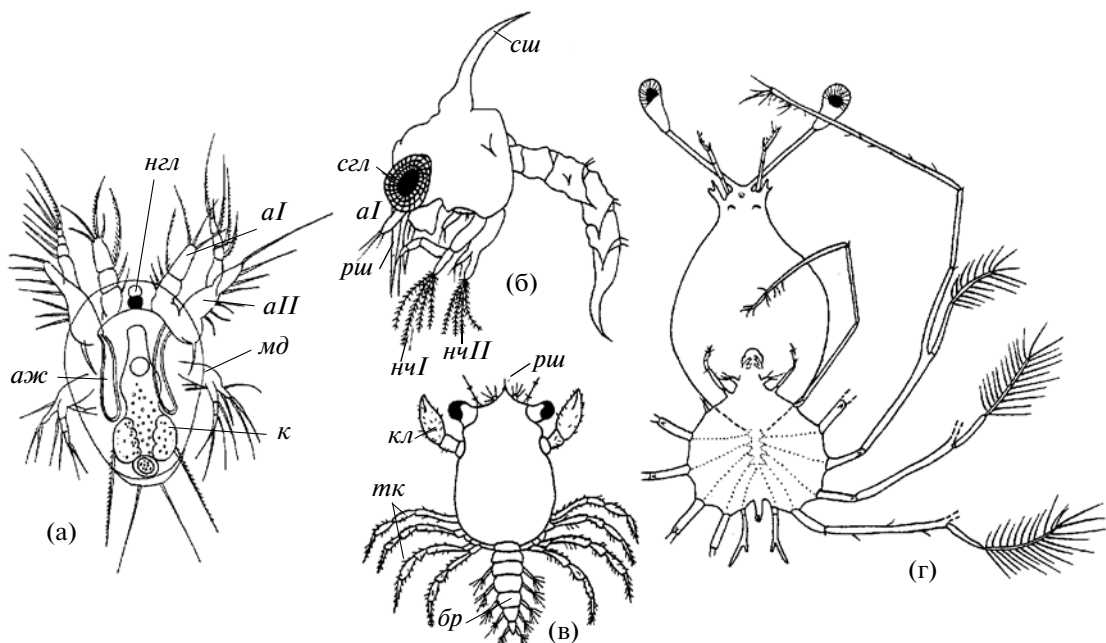
На последующих стадиях развития происходят также изменения в строении сегментов, образовавшихся раньше, и конечности специализируются для выполнения различных функций. Из этого образуется целый ряд морфологически различных личиночных стадий, получивших специальные названия (рис. 6б–6г).

Иногда первые личиночные стадии бывают эмбрионизированы (протекают под покровом яйце-





**Рис. 5.** Целомические полости у зародышей Членистоногих: (а) — фронтальный разрез через зародыш *Lernaea* (Copepoda); (б) — то же через зародыш Скорпиона (из: Беклемишев, 1964, т. 2); (в) — зародышевая полоска Онихифоры *Peripatopsis* на стадии 8 сомитов (из: Manton, 1949), мз — мезодерма, пз — половой зачаток, пр — проктодеум, см — стомодеум, эн — энтодерма. Римскими цифрами перенумерованы целомические мешки;  $I^1$ – $I^5$  — зачатки целопродуктов.



**Рис. 6.** Личинки Ракообразных: (а) — науплиус; (б) и (в) — зоэа и мегалопа. Краба: (г) — филосома Лангуста. аI и аII — две пары антенн, аж — антеннальные железы, к — кишечник, кл — клешня, мд — мандибула, нчI и нчII — две пары ногочелюстей, нгл — науплиальный глаз, сгл — сложный глаз, сш — спинной шип, тк — торакальные конечности. (Из разных авторов.)

вых оболочек), почему зона роста начинает функционировать еще во время эмбрионального развития. Тем не менее, онтогенетический дуализм сегментов хорошо выражен у многих Членистоногих. При этом наблюдается тенденция к увеличению числа сегментов, формирующихся по ларвальному типу. У Дрозофилы и некоторых других высших Насекомых все сегменты развиваются как ларвальные. К слову сказать, у Дрозофилы отсутствуют и эмбриональные оболочки (амнион и сероза), формирующиеся при развитии других Насекомых, так что она отнюдь не является типичным представителем типа Членистоногих.

\* \* \*

Как можно видеть, возникновение типа Членистоногих было связано с кардинальными изменениями в программе их индивидуального развития. Такая перестройка онтогенеза, разумеется, не могла произойти внезапно и совершалась постепенно под контролем естественного отбора. При этом у разных представителей типа Членистоногих она зашла не одинаково далеко и в разной степени затронула разные морфогенетические процессы. Об этом свидетельствует разнообразие индивидуального развития у Ракообразных, которое производит такое впечатление, словно Природа ищет его наиболее рациональный вариант. Интересно было бы выяснить, с какими молекулярно-генетическими вариациями связаны эти поиски...

\* \* \*

На первый взгляд может показаться, что именно утрата ресничной личинки и ресничек вообще (вызванные какой-то мутацией) были причиной возникновения типа Членистоногих. Но естественный отбор не сохраняет те мутации, которые уничтожают что-то полезное и нужное, поэтому у большинства Полихет трохофора сохранилась, и только те, которые уже могут обходиться без нее, стали эволюционировать в новом направлении. К слову сказать, ресничные личинки, выполняющие функцию расселения, присущи почти всем низшим Metazoa (Губкам, Книдариям, Немертинам и даже некоторым паразитическим Плоским червям — это мирацидии и корацидии, которые служат также и для заражения новых хозяев). По всей вероятности, Нематоды и Приапулиды тоже имели в эволюционном прошлом личинок типа планулы или паренхимулы, которые исчезли после того, как они научились ползать с помощью мышц. Личинки трохофорного типа исчезли у Олигохет и Пиявок, а также у многих Брюхоногих моллюсков.

Утрата ресничной личинки, сделавшая возможным освоение суши, сама она по себе еще не обеспечивает дальнейший эволюционный прогресс. Нематоды и Приапулиды так и остались низко организованными животными. Даже Олигохеты и Пиявки, тоже не имеющие трохофоры, остаются Кольчатым червями. Только среди Полихет нашлись такие, которые дали начало новому типу животных. По-видимому, это объясняется тем, что в их морфологической (и генетической) организации уже намечались признаки эволюции в этом направлении. К числу таких признаков можно отнести наличие у Полихет зачаточных конечностей — двуветвистых параподий, с которыми уже связаны специальные мышечные пучки. Двуветвистое строение конечностей хорошо выражено также у Ракообразных.

При обсуждении проблем эволюции онтогенеза еще, в середине прошлого столетия возникло представление, что некоторые стадии имеют особенно важное значение. По мнению Зайделя (Seidel, 1960), это стадии, на которых уже различаются все основные признаки окончательного плана строения: для Губок, Книдарий и Гребневикулов — это гастрюла, для Насекомых — зародышевая полоска и т.д. Эта идея была поддержана Зандером (Sander, 1983), который назвал эту стадию филотипической, так как через нее проходят все представители каждого типа (или нескольких близкородственных типов). На первый взгляд кажется, что филотипической стадией у Полихет, Эхиурид, Сипункулид и Моллюсков является трохофора, из-за чего их и объединяют под названием Трохофорных. Существование у них этой личинки действительно указывает на их родство, но сама трохофора — это преходящая стадия, от которой не зависит дефинитивное строение названных животных. О ней уже достаточно сказано выше, и повторяться уже не стоит.

Затем к этой проблеме обратились и специалисты из области молекулярной генетики (Slack, et al., 1993). Обсуждаемую стадию они характеризуют тем, что зачатки всех главных частей тела уже находятся на своих окончательных местах, соответственно определенным пространственным планам экспрессии генов. Они называют эту стадию зоотипом, (имея в виду ее генетическую характеристику). Гены зоотипа на ранних стадиях не активны, пик их экспрессии приходится на определенную стадию. Эта стадия очень консервативна, наличие у двух групп сходных зоотипов свидетельствует об их происхождении от общего предка. Иначе говоря, филотип — это основная генетически устойчивая характеристика различных групп животных.

Слэк с соавторами приводят также названия филотипических стадий для некоторых групп животных: у Позвоночных это стадия хвостовой почки, у Насекомых — стадия полностью сегментированной зародышевой полоски, у Clitellata — стадия, наступающая сразу после смыкания правых и левых зародышевых полосок, а у Нематод эта стадия приходится на завершение периода детерминированного дробления. О Полихетах эти авторы ничего не сообщают, а по моему мнению, их филотипической стадией следует считать метатрохофору.

По этому поводу следует отметить следующее. Объединения парных зародышевых полосок у Олигохет и Пиявок соответствует смыканию боковых краев шелевидного бластопора у Полихет, после чего начинается сегментация и наступает стадия, соответствующая метатрохофоре Полихет и ранней зародышевой полоске Членистоногих. Таким образом, зоотип Членистоногих мало отличается от такового Кольчатых червей. А между тем сторонники “эkdизозойной теории” придают большое значение тому, что у Членистоногих и Нематод есть какой-то один общий признак, и не замечают того, что между зоотипами этих животных нет ничего общего.

\* \* \*

Попробуем теперь взглянуть на рассматриваемый вопрос с другой точки зрения. Могли ли Членистоногие произойти от низших Ecdysozoa? Первое, что бросается в глаза — это разрыв в высоте организации и в типе индивидуального развития Членистоногих с одной стороны и таких животных, как Нематоды и Приапулиды, с другой. Но может быть, Членистоногие, начав со стадии, близкой по высоте организации к Нематодам, проделали эволюцию, сходную с таковой Кольчатых червей? Может быть, у них тоже выработалось детерминированное дробление спирального типа и телобластический способ образования мезодермы; возникли целом и метамерия, что они догнали и даже перегнали Полихет, и при этом нет никаких следов, никаких промежуточных форм не сохранилось? Может быть, но мало вероятно. Так же мало вероятно и происхождение низших Эkdизозоев от Членистоногих. Поэтому объединения Нематод и Членистоногих в кладе Ecdysozoa, вопреки различиям в их фило- и зоотипах, противоречит элементарной логике.

А говоря о “переходных” формах следует вспомнить о самых примитивных из ныне живущих Членистоногих — об Онихофорах, в организации которых сохранилось еще много черт, сближающих их с Кольчатыми червями. Как отмечает Федотов (1966), внешне они похожи на Многоно-

жек, голова у них слабо отграничена от гомономно сегментированного туловища и несет только одну пару усиков; конечности просто устроены; органы выделения сходны с целомодуктами, а в средней кишке еще сохраняется ресничный эпителий. По мнению Андерсона (Anderson, 1973), тщательно изучившего развитие Аннелид и Членистоногих, по этому признаку Онихофоры стоят ближе всего к Олигохетам и Пиявкам. Короче говоря, Онихофоры занимают положение связующего звена между Аннелидами и типичными Артроподами. Сходную стадию могли пройти в своей эволюции и другие Членистоногие.

Но чем все-таки объяснить, что у Членистоногих и Нематод оказался одинаковый признак (и соответствующий ген) — линька? Конечно, линьки сами по себе не являются особенно важным признаком, они возникли как одно из многих последствий перехода от ресничного движения к мышечному, который представляет собой закономерный шаг прогрессивной эволюции, и произошел параллельно и независимо в разных группах животных, в том числе и у Приапулид с Нематодами, но из-за простоты их организации она оказалась у них самым заметным из новоприобретенных признаков.

Между прочим, аналогичный переход произошел и в эволюции Вторичноротых, хотя его последствия были менее радикальными. Хордовые тоже утратили личинку (диплевуру), реснички которой выполняют локомоторную функцию, но сохранили в своей организации реснички, выполняющие гидрокинетическую функцию (например, обеспечивающие ток воды через жаберную полость у Ланцетника и Асцидий). А для прикрепления мышц у низших Хордовых стала служить хорда и формирующийся на ее основе позвоночник. Эти различия объясняются тем, что ко времени перехода к мышечному движению в организации (и в зоотипе) Первичноротых и Вторичноротых тоже уже существовали значительные различия.

К слову сказать, проблема происхождения типа Хордовых тоже породила немало гипотез, подчас совершенно фантастических. Хордовых выводили даже из Членистоногих, причем предполагалось, что предки Хордовых стали плавать брюшной стороной кверху и у них произошла инверсия дорсо-вентральной оси. Но такие гипотезы давно ушли в область истории. Однако недавно на основании данных молекулярной биологии некоторые авторы стали вспоминать эти забытые гипотезы добрым словом (см. Воронов, 2000). Но к счастью эта “Upside-down theory” не получила широкого признания.

\* \* \*

Отсутствие консенсуса между филогенетическими представлениями морфологов и молекулярных биологов приводит к парадоксальному впечатлению, что морфологическая и молекулярно-биологическая эволюция животных протекают по разным законам. Для дальнейшего успешного развития биологии совершенно необходимо установить взаимопонимание и перейти к дружественному сотрудничеству представителей упомянутых выше научных направлений.

В работах Рэффа и Кофмена (1986) и Гилберта с соавторами (1997), еще не было такого расхождения этих направлений, но большинство современных молекулярных генетиков, не считают нужным прислушиваться к мнениям морфологов. А морфологи плохо разбираются в молекулярной генетике и не в состоянии достаточно компетентно оспаривать “молекулярную” аргументацию.

Новую (и, на мой взгляд, совершенно беспомощную) попытку согласовать представления морфологов и молекулярных биологов о происхождении Членистоногих совершил К. Нильсен (Nielsen, 2003), который сделал ничем не оправданное допущение, что Членистоногие и остальные Ecdysozoa (т.е. Киноринхи, Приапулиды и Нематоды) являются “сестринскими группами”, происшедшими от Кольчатых червей. Он даже включает всех этих животных в группу Articulata. Но ни один грамотный морфолог с этим не согласится. Чтобы устроить “дружеское рукопожатие” между молекулярной генетикой и морфологией, Нильсен, образно выражаясь, вывихнул у морфологии руку. Так же неудачно поддерживал Нильсен (Nielsen, 1999) и “Upside-down Theory” (см. Иванова-Казас, 2008).

\* \* \*

Содержащиеся в настоящей статье обстоятельное изложение материалов, на которых базируется позиция эволюционной морфологии по проблеме происхождения типа Arthropoda, конечно, не устраняют существующие разногласия, а только подчеркивают их глубину. Может быть, кому-то покажется, что эта статья похожа на ворчание старухи, которая не может понять и принять новые идеи. Но это не совсем так. Я с должным уважением отношусь к молекулярной генетике и признаю, что она является последним достижением биологии (хотя и не застрахована от ошибок). Особенно важными (и справедливыми) я считаю два тезиса: 1) в оплодотворенном яйце уже содержится наследственно закрепленная программа всего индивидуального развития; и 2) все морфологические изменения в строении и

развитии животных обусловлены соответствующими изменениями в процессах, протекающих на молекулярном уровне.

Первый из этих тезисов превосходно гармонирует с суждениями крупных морфологов середины XX века. Так, В.Н. Беклемишев (1964, т. 1, с. 11) справедливо отметил: “Организм есть нечто непрерывно меняющееся, он есть морфопроект, и все стадии, и весь ход его жизненного цикла представляют объект морфологии”. Поэтому при суждении об эволюции животных “единицей сравнения является жизненный цикл вида” (там же, с. 9). И.И. Шмальгаузен (1969) тоже пишет, что онтогенез есть интегральный процесс, изменения, затрагивающие одну стадию развития, прямо или косвенно оказывают влияние и на другие стадии. Таким образом, эволюция совершается путем отбора целых онтогенезов, и при решении филогенетических проблем нельзя базироваться на одном-двух произвольно выбранных признаках.

А если между молекулярно-генетическими и морфологическими признаками существует причинно-следственная связь, как следует из 2-го тезиса, то они и эволюционировать должны, как единое целое, по одним и тем же законам. На молекулярном уровне тоже должны происходить процессы, имеющие отношение к возникновению новых органов и функций (например, к линьке) и их редукции, к дивергенции и конвергенции, к олигомеризации и полимеризации и т.д.

Поэтому, подвергая ревизии традиционные представления о происхождении Членистоногих с позиций молекулярной генетики, нужно выяснить, почему бесспорное сходство в организации Полихет и Членистоногих и не менее очевидные различия между Нематодами и Членистоногими (см. таблицу) не находят своего отражения на молекулярном уровне. Однако молекулярные биологи не считают нужным (или не могут?) на этот вопрос ответить. Для этого нужно было бы знать, от каких генов зависит у этих животных развитие метамерии, конечностей, целома, нервной системы и т.д. И можно предвидеть, что, когда будут известны молекулярные предпосылки развития этих морфологических признаков, экдизозойная теория будет аннулирована.

Не следует также забывать, что эволюционные различия между кладами не возникают сразу в полном объеме, а начинаются именно с отдельных органов. Некоторые таксоны (например, Онихофоры) имеют черты сходства с двумя или несколькими разными таксонами, а чтобы оценить степень их родства недостаточно учесть только количество сходных признаков обоого ро-

да (как это делают Philippe et al.). Для этого нужно также учесть и качественные различия между этими признаками, их эволюционное значение, а сделать правильно такую оценку морфологам легче, чем молекулярным генетикам, так как естественный отбор “работает” непосредственно с морфологическими признаками.

Кроме того, молекулярные генетики недооценивают возможность конвергенции на молекулярном уровне, т.е. возможность того, что гены, различающиеся по происхождению (не гомологичные) в случае необходимости могут функционировать сходным образом. А при решении филогенетических проблем это становится источником ошибок. Такой ошибкой стало и изобретение клада Ecdysozoa. Для установления родства недостаточно констатировать существование у сравниваемых животных генов, выполняющих сходные морфогенетические функции, нужно выяснить и их происхождение. В статье Гилберта и др. (1997) приведено несколько примеров, показывающих, что сходные гены могут содержаться в геномном наборе далеко не родственных животных. Поэтому стало наущной необходимостью изучение эволюции самих молекулярно-генетических процессов, лежащих в основе онтогенеза. И я уверена, что со временем между молекулярными генетиками и морфологами будет установлено взаимопонимание и плодотворное сотрудничество.

### БЛАГОДАРНОСТЬ

Я выражаю свою глубокую благодарность профессору СПбГУ А.К. Дондуа, благожелательная критика которого показала мне необходимость более тщательно и детально аргументировать свою точку зрения.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беклемишев В.Н.* Основы сравнительной анатомии беспозвоночных. М., 1964. т. 1, 432 с.; т. 2, 446 с.
- Воронов Д.А.* Старая гипотеза “перевернутости” хордовых подтверждается // *Природа*. 2000. № 11. С. 18–22.
- Гилберт С.Ф., Опиц Д.М., Рэф Р.А.* Новый синтез эволюционной биологии и биологии развития // *Онтогенез*. 1997. Т. 28. № 5. С. 325–343.
- Дондуа А.К.* Биология развития. Т. 2. Клеточные и молекулярные аспекты индивидуального развития. СПбГУ, 2005. 238 с.
- Иванов А.В.* Наблюдения над эмбриональным развитием Pogonophora // *Зоол. журн.* 1975. Т. 59. В. 7. С. 573–593.
- Иванов П.П.* Общая и сравнительная эмбриология. М.-Л., 1937. 809 с.
- Иванова-Казас О.М.* Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Членистоногие. М.: Наука. 1979. 223 с.
- Иванова-Казас О.М.* Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Неполноусые. М.: Наука. 1981. 206 с.
- Иванова-Казас О.М.* Происхождение Хордовых и “Uprside-down teory” // *Биология моря*. 2008. Т. 34. № 6. С. 436–444.
- Пономаренко А.Г.* Ранние этапы эволюции членистоногих // *Труды Санкт-Петерб. О-ва Естествоисп.* 2008. Т. 97. Сер. 1. С. 43–57.
- Рэфф Р., Кофмен Т.* Эмбрионы, гены и эволюция. М., 1986. 402 с.
- Федотов Д.М.* Эволюция и филогения беспозвоночных животных. М.: Наука, 1966. 404 с.
- Шмальгаузен И.И.* Проблемы дарвинизма. Л., 1969. 493 с.
- Aguinaldo A.M., Turbeville J.M., Linford L.S., Rivera M.C., Garey J.R., Raff R.A., Lake J.A.* Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals // *Nature*. 1997. V. 387. P. 482–493.
- Anderson D.T.* Embryology and phylogeny in Annelids and Arthropods. Oxford. Pergamon Press, 1973. 495 p.
- De Rosa R., Grenier J.R., Andreeva T., Cook Ch.E., Adoute A., Acam M., Carroll S.B., Balavoine G.* Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution // *Nature*. 1999. V. 399. № 6738. P. 772–776.
- Dunn C.W., Hejnal A., Matus O., Pang K., Browne W.E., Smith A., Seaver E., Rouse G.W., Obst M., Edgecombe D., Serensen M.V., Haddock S.H.D., Schmidt-Raesa A., Okusu A., Kristensen R.M., Wheeler W.C., Martindale M.O., Ciribet G.* Broad phylogenetic sampling improves resolution of the animal trees of life // *Nature*. 2008. V. 452. P. 745–749.
- Halanych K.M.* The new View of animal phylogeny // *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2004. V. 35. P. 229–256.
- Nielsen C.* Origin of the chordate central nervous system – and the origin of chordates // *Dev. Genes Evol.* 1999. V. 209. P. 198–205.
- Nielsen C.* Proposing a solution of the Articulata – Ecdysozoa controversy // *Zoologica Scripta*. 2003. V. 32. Pt. 5. P. 475–482.
- Philippe H., Lartillot N., Brinkman H.* Multigene analyses of Bilaterian animals corroborate the monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia // *Molec. Biol. and Evolution*. 2005. V. 22. Is. 5. P. 1245–1253.
- Sander K.* The evolution of patterning mechanisms gleaned from insect embryogenesis and spermatogenesis // *Development and evolution*. Cambridge Univ. Press., 1983. P. 137–159.
- Seidel F.* Körpergrundgestalt und Keimstruktur // *Zool. Anz.* 1960. Bd. 164. S. 245–365.
- Slack J.M.W., Holland P.W.H., Graham C.F.* The zootype and the phylotypic stage // *Nature*. 1993. V. 361. P. 490–492.

## Origin of Arthropods and of the Clades of Ecdysozoa

**O. M. Ivanova-Kazas**

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

*e-mail: i-kazas@yandex.ru*

Received August 28, 2012

**Abstract**—The problem of the origin of the phylum Arthropoda was long considered solved based on evolutionary morphology data. But molecular biological studies of recent years have put forward a new solution that contradicts the old one. Hence, the need arises to review the argumentation of both sides and search for ways to reach a consensus. These two subjects constitute the scope of this paper.

*Keywords:* Arthropoda, Annelida, molecular biology, evolutionary morphology, shift from ciliary to muscular movement

УДК 591.465.12

## ФОЛЛИКУЛЯРНЫЕ КЛЕТКИ ЯИЧНИКА АМФИБИЙ: ПРОИСХОЖДЕНИЕ, СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ

© 2013 г. В. В. Кондукторова<sup>1,2</sup>, Н. Н. Лучинская<sup>1</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
119991 Москва, Ленинские горы<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН  
119991 Москва, Вавилова, 32

E-mail: venir5@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.12 г.

Окончательный вариант получен 07.12.12 г.

Образование фолликулярных оболочек вокруг ооцитов в формирующемся яичнике и последующая их морфологическая дифференцировка идет “рука об руку” со сменой фаз стероидогенеза, блоком мейоза и его поддержанием, созданием условий для вителлогенеза, роста и созревания ооцитов. Обмен метаболитами осуществляется через щелевые контакты и путем рецептор-опосредованного транспорта через периооцитное пространство. Транспорт ионов в фолликулярных клетках (ФК) регулирует потенциал плазматической мембраны, создавая условия для эффективного направленного транспорта через щелевые контакты. Акцепция разнообразных биологически активных веществ фолликулярными клетками является дополнительным рычагом регуляции состояния системы фолликула. В нашем обзоре мы попытались сделать акцент на ФК амфибий, как на ключевых участниках системы фолликула, тем более, что обзоров, собирающих воедино данные о происхождении ФК у амфибий, их морфологии, регуляции роста и развития ооцита, обнаружить не удалось. Современные работы в этой области, как правило, посвящены исследованию молекулярных механизмов регуляции отдельных этапов в ходе развития ооцита. В обзоре описано происхождение и изменение морфологии фолликулярных оболочек в процессе развития ооцита у *Xenopus laevis*, приводятся данные о их регуляторных функциях во время вителлогенеза, об участии в стероидогенезе, процессе поддержания блока мейоза и последующем созревании.

**Ключевые слова:** амфибии, фолликулярные клетки, оогенез, щелевые контакты, вителлогенез, стероидогенез.

DOI: 10.7868/S0475145013040034

### ВОЗНИКНОВЕНИЕ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК В РАННЕМ РАЗВИТИИ ООЦИТОВ АМФИБИЙ

Яичники амфибий, так называемые половые валики, удается идентифицировать у шпорцевой лягушки на стадиях метаморфоза (50–54). Это парные органы около 2 мм длиной и 0.7 мм шириной, возникающие как выросты мезентерия на вентральной стороне почки (Ogielska, Kotusz, 2004). В мезентерии могут быть выделены две зоны – медулярный (мезенхимальный) и кортикальный эпителиальный слой, разделенные базальной мембраной (Iwasawa, Yamaguchi, 1984; Tanimura, Iwasawa, 1988; Falconi et al., 2001). Размножение кортикальных клеток приводит к формированию половых валиков, которые заселяются первичными половыми клетками (ППК). У бесхвостых амфибий ППК являются потомками клеток, унаследовавших в процессе дробления уча-

сток цитоплазмы на вегетативном полюсе зиготы, содержащий факторы, определяющие их дальнейшее развитие. Во время гастрюляции в составе энтодермы ППК погружаются внутрь зародыша. На стадии хвостовой почки ППК активно мигрируют на дорсальную сторону зародыша к закладке гонады. Там ППК начинают интенсивно делиться митотически, давая начало многочисленным первичным оогониям. Клетки медулярного слоя, размножаясь, врастают в центральную часть полового валика между эпителиальными клетками. Оогонии, вступившие на путь дифференцировки, претерпевают четыре последовательных митотических деления, в результате которых образуется кластер из 16 цистоцитов, связанных между собой межклеточными мостиками, который называется цистой или гнездом. Каждый цистоцит имеет грушевидную форму, направлен узким концом к центру цисты и уже имеет первые признаки будущей

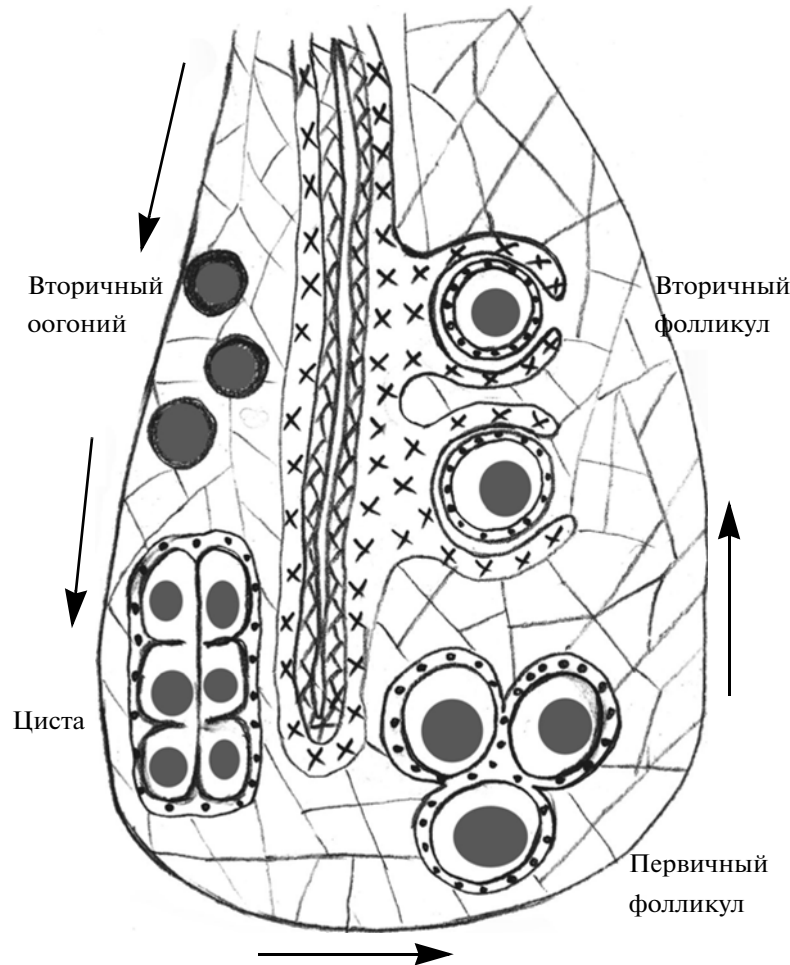


Рис. 1. Последовательные этапы формирования оболочек ооцита в яичнике шпорцевой лягушки на ст. 62–66.

анимально-вегетативной полярности ооцита (Kloc et al., 2004). У шпорцевой лягушки 16-клеточная циста входит в профазу первого мейотического деления. Стадии первой мейотической профазы цистоциты в яичнике лягушонка проходят синхронно (Kloc et al., 2004). Эпителиальные клетки кортекса окружают гнезда и отдельные цистоциты, образуя префолликулярные оболочки (Ogielska, Kotusz, 2004) (рис. 1). К поздней пахитене ооциты отделяются друг от друга префолликулярными клетками и теряют связь через цитоплазматические мостики. Дальнейшее развитие первичных фолликулов происходит асинхронно (Coggins, 1973).

У *Xenopus* каждый из 16 цистоцитов дает начало ооциту, в отличие от млекопитающих, где на мыши было показано, что лишь 33% всех ооцитов выживают и формируют первичные фолликулы (Pepling, Spradling, 2001), а прочие претерпевают апоптоз. Апоптотические клетки были обнаружены в кортикальной зоне яичника шпорцевой ля-

гушки, и они располагались вне цист (Kloc et al., 2004). Предположительно, апоптозу подвержены префолликулярные клетки.

Мезенхимальные клетки яичника формируют теку – соединительно-тканый слой вокруг первичных фолликулов. Так называемый вторичный фолликул содержит ооцит, покрытый оболочками соматического происхождения: где ФК являются производными эпителиального компартмента яичника, а клетки теки – мезенхимального (Wallace, Selman, 1990; Ogielska, Kotusz, 2004). После формирования оболочек ооцита наступает блок мейоза на стадии диплотены. Гормональная регуляция этого этапа у амфибий не изучена. При исследовании процесса формирования фолликулов во фрагментах яичника теленка *in vitro* было отмечено, что блок мейоза не наступал, пока не были сформированы оболочки (Fortune et al., 2011).

Факторы, определяющие переход ооцитов к дальнейшему росту, также известны только для млекопитающих (см. обзоры: Buratini, Price, 2011;



Jagarlamudi, Rajkovic, 2012; Kim, 2012; Matsuda et al., 2012). Рост ооцита определяется взаимодействием сигнальных путей ряда факторов, таких как FGFs, Kit-лиганд, NGF, BMPs, PDGF, TGFs и других, синтезируемых клетками гранулезы (ФК) и самим ооцитом. Связывание с лигандами рецепторных тирозиновых протеинкиназ (RPTK), ключевой из которых является Kit, вызывает активацию сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K)–Akt. Фосфорилирование Akt приводит к подавлению активности ингибиторных молекул ооцита (FOXO, PTEN, AMN и др.), препятствующих началу роста фолликула. Таким образом, ФК в яичнике млекопитающих и, по-видимому, низших позвоночных принадлежит важнейшая роль в регуляции перехода к стадии роста.

### МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССЕ РОСТА ФОЛЛИКУЛОВ

Морфологическая структура клеток в фолликуле является отражением идущих здесь молекулярных процессов и метаболической кооперации между ооцитом и окружающими клетками. Развитие ооцитов шпорцевой лягушки условно разделяют на 6 стадий (Dumont, 1972).

На стадии I в начале цитоплазматического роста (диаметр 0.05–0.3 мм), уплощенные ФК тесно соприкасаются с плазматической мембраной ооцита. Между собой ФК соединяются адгезионными контактами и десмосомами (Dumont, Brummett, 1978; Wallace, Selman, 1990). К концу I стадии ооцит и ФК формируют навстречу друг другу цитоплазматические выросты, и ФК приподнимаются над поверхностью ооцита, формируется периооцитное пространство. Между ооцитом и ФК формируются неспециализированные контактные зоны с расстоянием между мембранами 20 нм и более (Browne, Werner, 1984). Наличие щелевых контактов (ЩК) на этой стадии достоверно не установлено.

На стадии II (0.3–0.45 мм) в теке увеличивается количество коллагена, а слой ФК утолщается. Количество и длина микровилли на поверхности ооцита растет, при этом плазматическая мембрана образует эндоцитозные инвагинации между выростами. Микровилли и инвагинации значительно увеличивают площадь поверхности ооцита. ФК утолщаются, и на их поверхности, обращенной к ооциту, формируются макровилли, в количестве 50–70 штук на клетку (наши неопубликованные данные). В результате слой ФК приобретает арочный вид. Морфологически между ооцитом и ФК впервые удается идентифицировать ЩК (Browne, Werner, 1984), создается основа для прямой метабо-

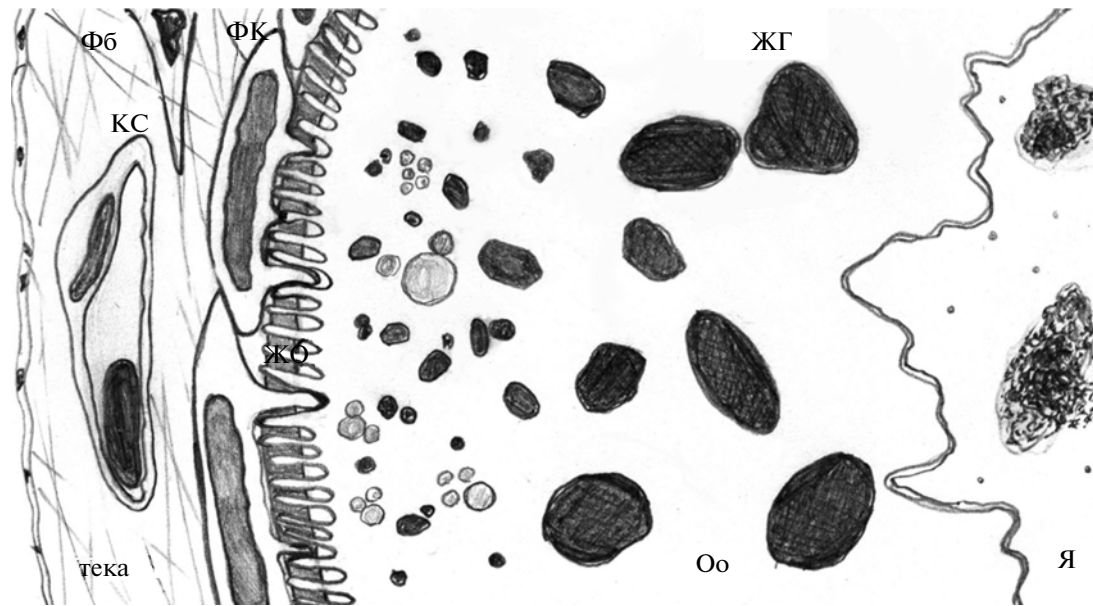
лической кооперации. В периооцитном пространстве островками начинает формироваться желточная (вителлиновая) оболочка (Dumont, 1972). По современным данным, в состав желточной оболочки амфибий входят 6 (возможно, 7) различающихся по молекулярной массе гликопротеинов со сходной доменной структурой входящих в них белков (Harris et al., 1994; Hedric, 2008). Различными методами было показано, что компоненты оболочки у амфибий синтезируются ооцитом (Yamaguchi et al., 1989; Yang, Hedrick, 1997; Kubo et al., 2000), тогда как у костистых рыб в состав желточной оболочки входит белок, синтез которого индуцирован эстрогеном в печени (Hamazaki et al., 1987). Синтез компонентов желточной оболочки в ФК до сего времени не показан.

У некоторых амфибий на превителлогенных стадиях была обнаружена гетерогенность ФК. У рогатки Кранвелла (*Ceratophrys cranwelli*) различают светлые и более крупные темные ФК, ультраструктура которых указывает на высокую синтетическую активность. Цитоплазма включает большое количество свободных рибосом и шероховатого эндоплазматического ретикулума, скопления гликогена и везикулы с электронно-плотными частицами (Villicco et al., 2007).

При исследовании фолликулов у червяк *Ichthyophis tricolor* и *Gegeneophis ramaswamii* (Beyo et al., 2007) авторы разделили ФК на темные и светлые, основываясь, прежде всего, на структуре хроматина. В ядрах темных клеток хроматин находится преимущественно в неактивном конденсированном состоянии, в отличие от светлых клеток с деконденсированным эухроматином. С развитием ооцита все ФК становятся темными. Эта гетерогенность ФК у некоторых амфибий, по-видимому, связана с различиями в их синтетической активности.

На стадии III (0.45–0.6 мм) тека прорастает кровеносными сосудами, и ооцит активно акцептирует и аккумулирует желток. ФК увеличиваются в объеме. Желточная оболочка к этой стадии образует непрерывный слой в периооцитном пространстве. Микро- и макровилли пронизывают ее, сохраняя прямые контакты ооцита и ФК.

К стадии IV (0.6–1 мм) (рис. 2) скорость вителлогенеза достигает своего максимума. Ооциты этой стадии покрыты хорошо развитой сетью сосудов. Объем ФК продолжает расти, увеличивается объем ядра и ядрышка, что указывает на рост синтетической активности в них. С ростом ооцита на стадиях IV–V (1–1.2 мм) между ФК возникают промежутки, адгезионные контакты сохраняются на выростах ФК (рис. 3). Трансэпителиальные каналы позволяют свободно проходить вителлогенину (ВГ) и другим макромолекулам из капиллярной



**Рис. 2.** Схема строения фолликула на ст. IV. Оо – ооцит; ФК – фолликулярные клетки; КС – кровеносный сосуд; Фб – фибробласт; Я – ядро; ЖГ – желточные гранулы; ЖО – желточная оболочка.

сети к ооциту. Желточная оболочка достигает к этой стадии своей максимальной толщины, при этом многочисленные ЩК между отростками ооцита и ФК сохраняются.

К стадии VI (1–1.3 мм) вителлогенез завершается. Микро- и макровиллы заметно деградируют. Слой ФК становится тоньше. На этой стадии количество ФК достигает 10–14 тысяч на ооцит, а плотность составляет примерно 32 на 10000  $\mu\text{m}^2$  поверхности ооцита шпорцевой лягушки (Miledi, Woodward, 1989).

Ультраструктура ФК зрелых ооцитов амфибий была исследована в ряде работ (Dumont, Brummett, 1978; Browne, Werner, 1984; Hsü et al., 1985, Vilecco et al., 2007 и др.). Митохондрии в ФК имеют трубчатую форму. Комплекс Гольджи хорошо развит и часто расположен группами вблизи ядра. Шероховатый эндоплазматический ретикулум с рибосомами обычно выглядит как несколько коротких сегментов. В клетках много гладкого эндоплазматического ретикулума. В цитоплазме есть жировые капли, которые могут содержать электронноплотные включения. Имеются многочисленные везикулы как в цитоплазме, так и открывающиеся наружу, а также мультивезикулярные тельца. Все перечисленное характерно для клеток, синтезирующих стероидные гормоны.

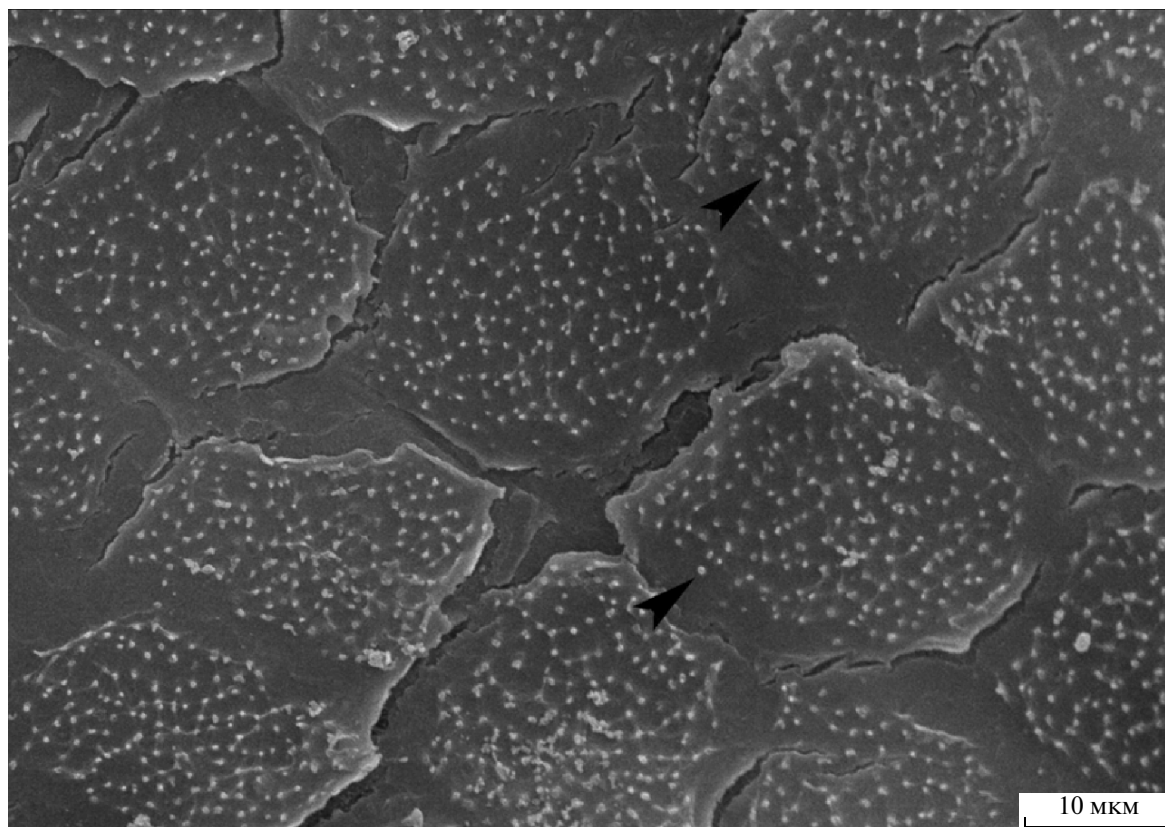
Изменения в морфологической структуре фолликулов на превителлогенных, вителлогенных стадиях и в процессе созревания коррелирует с моле-

кулярными процессами, идущими в ооците, ФК и теке и отражают их взаимное влияние.

#### ЩЕЛЕВЫЕ КОНТАКТЫ ООЦИТА И ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК

Через ЩК на микровиллах ооцита и макровиллах ФК осуществляется прямая метаболическая кооперация и селективный направленный транспорт веществ. ЩК между ооцитом и ФК играют важнейшую роль в процессе роста ооцита, поддержании блока мейоза и последующем созревании.

Функциональной единицей ЩК является коннексон – кластер, состоящий из 6 белков коннексинов. У шпорцевой лягушки исследовано пока лишь 9 коннексинов (против 20 у млекопитающих). Их названия соответствуют предсказанной молекулярной массе: Сх28.6, Сх29, Сх30, Сх31, Сх38, Сх40.4, Сх41, Сх43 и Сх43.4 (Gimlich et al., 1990; Yoshizaki, Patiño, 1995; Landesman et al., 2003; De Boer et al., 2005a; De Boer et al., 2006). Основываясь на их нуклеотидной последовательности, коннексины можно разделить на  $\alpha$ -группу (Сх38, Сх40.4, Сх41, Сх43),  $\beta$ -группу (Сх28.6; Сх29; Сх30, Сх31) и неспецифическую (Сх43.4). Коннексины Сх31, Сх41, Сх43 и Сх43.4 *Xenopus* являются ортологами хорошо изученных коннексинов Сх31, Сх37, Сх43 и Сх45 млекопитающих соответственно (Landesman et al., 2003; de Boer et al., 2005a). Сх38 является уникальным коннексином *Xenopus*, не имея сходства больше 38% ни с одним из коннексинов мыши и *Danio*. Идентифицированы, но



**Рис. 3.** Слой фолликулярных клеток. Стрелками указаны макровиллы на поверхности клеток, обращенной к ооциту.

неохарактеризованы Сх25, Сх26, а также часть последовательности Сх50 (De Boer, Van der Heyden, 2005b).

В ооцитах методом ПЦР обнаружена мРНК четырех коннексинов — Сх31, Сх38, Сх43 и Сх43.4 (Gimlich et al., 1990; Yoshizaki, Patiño, 1995; Landesman et al., 2003). мРНК Сх38 обнаружена в значительных количествах в ооцитах. В зрелых яйцах ее количество в анимальном и вегетативном полушариях равны. Интересно, что Сх38 для формирования каналов чаще образует гетеротипические пары с Сх43, чем гомотипические (Swenson et al., 1989). После оплодотворения яйца содержание мРНК Сх38 в нем резко падает, а подавление трансляции гена не нарушает развития зародышей. Это дает основание полагать, что свою функцию Сх38 осуществляет во время оогенеза.

Большое исследование экспрессии коннексинов методом иммуногистохимии было выполнено на яичнике мыши. Было показано, что коннексины контактов ооцита с клетками гранулезы и коннексины теки принадлежат подсемейству  $\beta$  (Сх32 и Сх26), тогда как контакты между клетками гранулезы образованы коннексинами подсемейства  $\alpha$  (Сх43, Сх37 и Сх45) (Wright et al., 2001). В ооцитах

Сх37 в данной работе обнаружен не был. Позже было показано, что Сх37 в ооцитах присутствует и образует гомотипические контакты ооцит-гранулеза (Veitch et al., 2004). Какие коннексины в клетках гранулезы являются гетеротипическими партнерами коннексинов ооцита Сх26 и Сх32, или они образуют гемиконнексоны, и какова их физиологическая роль остается невыясненным.

У *Xenopus* ортологом Сх37 млекопитающих, формирующего ЩК ооцит-гранулеза, является Сх41, экспрессия которого в ооцитах отсутствует (Landesman et al., 2003). Сх41 в настоящее время единственный известный коннексин ФК амфибий, формирующий ЩК между ними. Сх41, возможно, участвует в формировании гетеротипических контактов с участием коннексинов Сх31, Сх38, Сх43 и Сх43.4 ооцита. Наиболее вероятным кандидатом является Сх38, экспрессия которого в ооцитах выше других.

Долго считалось, что проницаемость канала определяется размером поры, образуемой коннексином, и через нее могут проходить вещества с молекулярным весом до 2 кДа. Позже обнаружилось, что ЩК обладают высокой селективностью по отношению к биологически значимым нуклеотидам,

аминокислотам, сахарам и различным ионам (см. обзор Harris, 2007). В 2005 г. Вальюнас с коллегами на клетках млекопитающих показали возможность прохождения siRNA массой около 2–4 кДа через ЩК, причем siRNA проходила только через контакты, образованные Cx43, но не Cx32 или Cx26 (Valiunas et al., 2005). Недавно было показано, что небольшие пептиды с массой 1.8 кДа могут проходить через ЩК, если позволяет их 3D структура (Neijssen et al., 2005). В этом же году была опубликована статья, ломающая представления о размере молекул, способных проходить через ЩК. Была доказана способность кальмодулина размером 17 кДа проходить через ЩК из ооцита в ФК шпорцевой лягушки (Curran, Woodruff, 2007). Позже такая возможность была показана для тропонина размером 18 кДа (Cieniewicz, Woodruff, 2010). Авторы высказывают предположение, что этому способствует фибриллярная трехмерная структура этих белков. Возможно список белков, способных проникать через ЩК, будет расширен. Транспорт в противоположном направлении из ФК в ооцит до настоящего времени не показан ввиду методических трудностей.

У *Xenopus* также обнаружены паннексины PANX1 и PANX2. Паннексины сходны с иннексинами, формирующими ЩК у беспозвоночных и имеют топологию подобную коннексинам (Panchin, 2005). PANX1 был найден среди EST клонов, полученных из ооцитов (de Boer, van der Neuden, 2005b). Многочисленные исследования паннексинов последнего времени у позвоночных позволяют считать, что ЩК они не формируют, а образуют поры на плазматической мембране для пара- и аутокринной регуляции (Sosinsky et al., 2011). Роль паннексинов в оогенезе не изучена.

#### УЧАСТИЕ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК В ВИТЕЛЛОГЕНЕЗЕ

Большинство амфибий продуцирует большое количество яиц, богатых желтком. Размер развивающихся ооцитов коррелирует с количеством запасаемого желтка. Процесс аккумуляции желтка, т.н. вителлогенез, является важным этапом развития ооцита амфибий. Желток является главным источником питательных веществ для развивающегося эмбриона вплоть до начала активного питания личинки.

Предшественники желтка можно разделить на несколько типов на основании места их синтеза и пути аккумуляции в гранулы. Основным предшественником желтка у амфибий являются вителлогенины, которые представляют собой мультидоменные липопротеины, которые у *Xenopus* кодируются четырьмя генами (A1, A2, B1, B2) с высокой гомологией. (Willey, Wallace, 1981; Wahli et al., 1982;

Gerber-Huber et al., 1987; Wallace et al., 1990; Yoshitome et al., 2003).

В ответ на выделяемые гипофизом гонадотропины фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны (ФСГ и ЛГ) фолликулы начинают продуцировать эстрадиол-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) (Redshaw, 1972; Polzonetti-Magni et al., 1998). E<sub>2</sub> стимулирует синтез ВГ клетками печени. Максимальной способностью к синтезу E<sub>2</sub> обладают вителлогенные фолликулы (Fortune, 1983). При развитии фолликула от стадии IV к стадии VI продукция E<sub>2</sub> снижается в 10–30 раз. Синтез гормона в изолированных фолликулярных оболочках ооцитов этих же стадий снижается только в 4 раза. Таким образом, ведущая роль в синтезе эстрадиола-17 $\beta$  и стимуляции выработки ВГ принадлежит самому ооциту (Stretarugsa, Wallace, 1997).

ВГ транспортируется с кровотоком в яичник и интернализуется растущими ооцитами (Wallace, Dumont, 1968; Wallace et al., 1973; Varriale, 1988). Ранее считалось, что накопление ВГ в ооцитах начинается в конце стадии II–начале стадии III (диаметр 0.45 мм), когда становятся видны первые желточные гранулы. Однако накопление желточных белков начинается раньше, на стадиях, которые считались превителлогенными (O'Brien et al., 2010).

Чтобы попасть в ооцит, ВГ должен последовательно преодолеть несколько барьеров: эндотелий сосудов, соединительнотканную теку, базальную мембрану, ФК и, наконец, желточную оболочку. Полагают, что путь ВГ через перечисленные преграды к поверхности ооцита осуществляется по межклеточным пространствам, порам и каналам, а затем посредством рецептор-опосредованного пиноцитоза и эндоцитоза ВГ поглощается ооцитом (Opresko, Wiley, 1987; Wallace, Selman, 1990; Stifani et al., 1990). Внутри ооцита ВГ протеолитически расщепляются в эндосомах на липовителлины с высокой и низкой молекулярной массой (LvH и LvL), фосвитины (Pv) и фактор Виллебранда типа Д (vWFD), формируя первичные желточные гранулы (Opresko et al., 1980; Buschiazzi et al., 2003; Finn, 2007).

Во время оогенеза сам ооцит также синтезирует белки, жиры и углеводы. Полагают, что липиды начинают синтезироваться ооцитом еще на превителлогенной стадии. Уже на II стадии наблюдается скопление мелких липидных везикул вокруг ядра. Полисахариды запасаются ооцитом в виде гликогена и нейтральных мукополисахаридов в поверхностном слое желточных гранул (Albanese-Carmignani, Zaccone, 1977). Синтез гликогена в ооцитах может осуществляться прямым (через UDP-глюкозу) и непрямым (через молочную кислоту) путем (Kessi et al., 1996; Preller et al., 2007).

По оценке Опреско и Вили, 80–90% тотального белка зрелых ооцитов происходит из ВГ, получаемого с кровотоком, а прочие 10–20% белка синтезируются ооцитом (Oprea, Wiley, 1987). В состав липидной фракции желтка существенный вклад вносят ФК (Uribe, 2003). У закончивших рост ооцитов *Bufo arenarum* липидная фракция содержит, главным образом, фосфолипиды (фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин), ненасыщенные фосфолипиды, триацилглицеролы, полярные и нейтральные липиды (Buschiazzo et al., 2003; Buschiazzo, Alonso, 2005). Суммарное количество липидов увеличивается вдвое к стадии IV по сравнению со стадией III (Bruzzone et al., 2003).

Молекулярные каскады, задействованные в регуляции вителлогенеза, до конца не ясны. Поскольку яичник амфибий одновременно содержит ооциты разных стадий развития, т.е. в одном и том же гормональном окружении захват и накопление желтка осуществляется только ограниченной популяцией ооцитов, то можно предположить, что сигнал, регулирующий вителлогенез, должен иметь локальный характер. Монако с соавторами показал, что разобщение ЩК с помощью октанола у *Xenopus* приводит к торможению процесса вителлогенеза (Monaco, 2007). Исследование динамики экспрессии овариальных коннексинов с помощью ОТ-ПЦР показало, что Сх43 начинает экспрессироваться со стадии II и его экспрессия нарастает по мере роста ооцита, однако его функция однозначно не установлена. На *X. laevis* было показано, что для индукции и поддержания вителлогенеза необходим перенос цАМФ из ФК в ооцит через ЩК. Нарушение связности клеток октанола или ингибитором кальмодулина, регулирующим проницаемость ЩК, приводит к остановке вителлогенеза (Luque et al., 2011). Добавление в среду дбцАМФ полностью восстанавливает процесс интернализации ВГ. Таким образом, ФК играют ключевую роль в вителлогенезе.

#### РОЛЬ Фолликулярных клеток в стероидогенезе и созревании

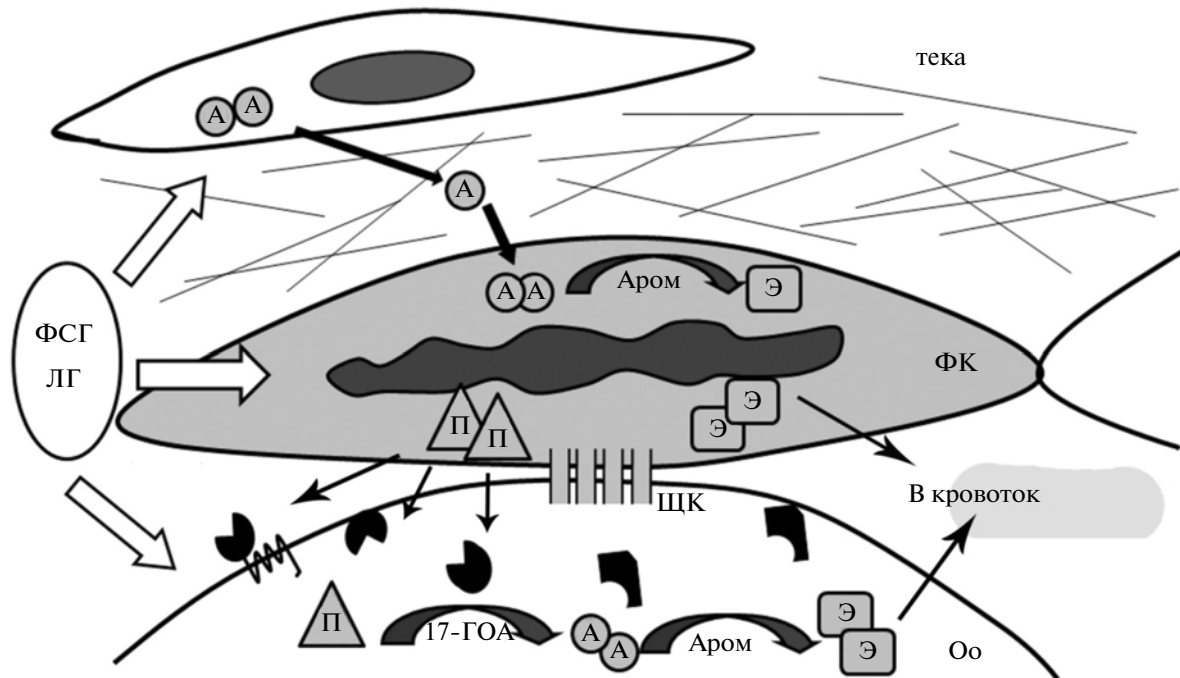
Участие в стероидогенезе — это важнейшая функция фолликулярного эпителия в процессе роста и созревания ооцита. С наступлением периода размножения повышается уровень гонадотропных гормонов гипофиза. Уровень ФСГ значителен в период роста ооцитов, тогда как уровень ЛГ повышается в период их созревания. Рецепторы к ФСГ и ЛГ (ФСГР и ЛГР) у амфибий пока не клонированы, однако, клонированы у рыб различных таксонов в связи с их большой практической значимостью для рыбоводства. Было показано, что ФСГР и ЛГР рыб являются рецепторами, сопряженными с гетеротримерными ГТФ-связывающими белками

(GPCR) (Ascoli et al., 2002; Smits et al., 2003). ФСГР обнаружены на клетках гранулезы (фолликулярных клетках) и теки, тогда как рецепторы к ЛГ обнаружены только на ФК. Рецепторы к гонадотропным гормонам в ооцитах не обнаружены (Miwa et al., 1994). По-видимому, это верно и для амфибий, поскольку исследования показывают, что ЛГ стимулирует созревание фолликулов, но не ооцитов без оболочек. ФСГР с одинаковой эффективностью связывает как ФСГ, так и ЛГ, тогда как ЛГР связывается только с ЛГ и обладает высокой видоспецифичностью (Oba et al., 1999 a, b).

Под действием ФСГ и ЛГ ФК продуцируют прогестерон (Pg) (рис. 4), а клетки теки — андрогены (Kwon, Ahn, 1994; Sretarugsa, Wallace, 1997; Ahn et al., 1999). Проникая в ооцит, Pg может преобразовываться в андрогены с участием 17-гидроксилазы (Сур 17), которая экспрессируется исключительно в ооцитах (Thiber-Fouchet et al., 1976; Mulner et al., 1978; Yang et al., 2003). Андрогены андростендион и тестостерон далее могут преобразовываться в эстрон и эстрадиол-17β (E<sub>2</sub>) в результате реакции с участием изоформы цитохрома P-450 ароматазы (Gohin et al., 2011). E<sub>2</sub> является ключевым гормоном в индукции вителлогенеза и модуляции процесса созревания ооцитов. Ароматаза экспрессируется вителлогенными ооцитами и ФК на этих стадиях. При этом суммарная активность фермента в ФК выше, чем в ооците более чем в 2 раза. Экспрессия ароматазы и ее активность резко падают в позднем оогенезе (стадия VI). Таким образом, как ооциты средних размеров, так и их ФК способны продуцировать E<sub>2</sub> из андрогенов. Наличие в ооцитах Сур 17 и ароматазы позволяет синтезировать E<sub>2</sub> из Pg (Gohin et al., 2011). Просуществовавшая почти 20 лет двухкомпонентная модель регуляции синтеза E<sub>2</sub> в яичнике (тека и ФК) была дополнена третьим участником — ооцитом. Возможно, существует взаимодействие между ооцитом и его соматическими компартментами, направленное на регуляцию продукции E<sub>2</sub>.

Рецепторы к E<sub>2</sub> обнаружены в фолликулах и ооцитах на вителлогенной и поствителлогенной стадиях (IV и VI стадии), и уровень их мРНК остается стабильным в период позднего вителлогенеза и созревания. Ингибиторный эффект E<sub>2</sub> на созревание опосредован ФК. Показано, что эстрадиол препятствует в ФК превращению прегненолона в Pg под действием гонадотропных гормонов (Lin et al., 1988; Gohin et al., 2011).

В исследованиях процессов созревания *in vitro* в качестве индуктора часто используется Pg. Однако радиоиммунологический метод не выявил повышения уровня стероидных гормонов ни в яичнике, ни в сыворотке самок *X. laevis in vivo*, ни во фрагментах яичников *in vitro* после индукции хориони-



**Рис. 4.** Схема синтеза стероидов в яичнике амфибий. В процессе вителлогенеза в ответ на гонадотропные гормоны ФГС и ЛГ клетки теки продуцируют андрогены, ФК – прогестерон. Андрогены теки проникают в фолликулярные клетки, где с участием ароматазы превращаются в эстрадиол-17β. Прогестерон ФК, поступив в ооцит, превращается в андрогены, а затем в эстрадиол-17β, который вызывает синтез вителлогенина в печени. Перед созреванием ЛГ и ФГС вызывают продукцию прогестерона в ФК и андрогенов в клетках теки. Прогестерон в ооците частично превращается в андрогены. Прогестерон и андрогены связываются со своими рецепторами в ооците, запуская процесс созревания. А – андрогены, Э – эстрадиол-17β, П – прогестерон, Аром – ароматаза, 17-ГОА – 17-гидроксилаза, – мембранный и цитоплазматический рецепторы к прогестерону; – мембранный и цитоплазматический рецептор к андрогенам; Оо – ооцит, ФК- фолликулярная клетка, ЩК – щелевой контакт.

ческим гонадотропином человека (ХГЧ). Уровень Пг сохранялся на границе детекции метода, тогда как уровни андрогенов – андростендиона и тестостерона повышались более, чем в 10 раз (Fortune, 1983; el-Zein et al., 1988; Lutz et al., 2001). Кроме того, ингибирование синтеза андрогенов приводит к задержке овуляции (White et al., 2005), тогда как модуляция количества классического рецептора к Пг и его активности влияет на созревание ооцитов, индуцированное Пг, незначительно (Вауаа et al., 2000; Tian et al., 2000). Совокупность этих данных позволили ряду авторов заключить, что андрогенам, а не Пг, принадлежит ведущая роль при созревании *in vivo* (Evaul et al., 2007). Однако в работе Хаккарда с коллегами методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией рост количества Пг в ооцитах в 30–40 раз после стимуляции лютеинизирующим гормоном был достоверно показан (Naccard et al., 2012). Хотя эффективная концентрация тестостерона для созревания *in vitro* ооцитов без оболочек ниже в 10 раз эффективной кон-

центрации прогестерона, после стимуляции ЛГ уровень Пг достигал своего максимального значения (100 нМ) уже через час, тогда как концентрация андрогенов нарастала медленно. Таким образом, Пг является первым, а потому, по-видимому, главным стероидом, который продуцируется ФК в ответ на ЛГ.

Наличие фолликулярных оболочек снижает эффективность действия внешнего тестостерона и Пг на два порядка (Naccard et al., 2012). Таким образом, фолликулярный слой может служить барьером для проникновения гормонов к ооциту и ингибировать индукцию созревания внешними свободными стероидами (Mulner, Ozon 1981; Patino, Purkiss, 1993; Naccard et al., 2012). При воздействии низких концентраций Пг (0.25–1 мкг/мл) на фолликул гормон, по-видимому, связывается ФК и не достигает поверхности ооцита. Однако, созревание ооцитов происходит с участием фактора нестероидной природы, синтезируемого ФК и про-

никающего в ооцит через ЩК (Скоблина, 2003; Скоблина, 2004).

Методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией также обнаружены сульфатированные водорастворимые формы прегненолона и дегидроэпиандростерона (ДГЭА-С) в зрелых и стимулированных к созреванию ооцитах, причем количество ДГЭА-С значительно превосходило содержание всех прочих стероидов в фолликуле и ооците (Nascard et al., 2012). Авторам не удалось обнаружить сульфотрансферазной активности в ооцитах, а потому, по-видимому, фермент локализован в ФК. Сульфатированные водорастворимые формы могут проникать в ооцит через ЩК. Существенной сульфатазной активности в ооцитах обнаружено не было. При инъекции в ооцит сульфатированная форма ДГЭА-С не вызывала созревания и не влияла на созревание под действием Пг и тестостерона. Полагают, что превращение гормонов в ФК в неактивные сульфатированные формы может являться защитной системой от гормональных флюктуаций и преждевременного созревания ооцитов.

В ооцитах был идентифицирован классический рецептор к андрогенам (АР) регулирующий тестостерон-опосредованное созревание (Lutz et al., 2001). Снижение экспрессии рецептора, а также инкубация с антагонистом подавляет созревание ооцитов и активацию киназ. Выяснилось, что 5% рецептора локализуется у поверхности ооцита, и, возможно, отвечают за негеномные эффекты андрогенов (Lutz et al., 2001; Lutz et al., 2003). Пг связывается с АР с той же аффинностью, что и со своим рецептором (Evaul et al., 2007).

У *Xenopus* также идентифицированы 2 формы классического рецептора к прогестерону ПгР1 и ПгР2, транскрибируемые с одного гена (Вауаа et al., 2000; Tian et al., 2000; Liu et al., 2005). В ооците экспрессируются обе формы рецептора, хотя уровень мРНК и белка ПгР1 в ооците низкий (Martinez et al., 2006). Часть ПгР1 локализуется на мембране с участием лиганд-связывающего домена (Martinez et al., 2007). В ФК обнаружен только ПгР1 (Liu et al., 2005). Физиологическая роль ПгР в ФК не ясна. Оверэкспрессия ПгР1 в ооцитах значительно ускоряет созревание, индуцированное прогестероном, а инъекция антисмыслового олигонуклеотида против ПгР1 практически полностью блокирует (Tian et al., 2000). При индукции созревания прогестероном ПгР1 в ФК деградирует по убиквитинному пути, тогда как ПгР2 в ооците фосфорилируется (Liu et al., 2005).

В последние годы у позвоночных обнаружено большое семейство рецепторов к Пг (13 или более), относящихся к суперсемейству GPCR (рецепторов, связанных с гетеротримерными ГТФ-

связывающими белками) (Zhu et al., 2003). У шпорцевой лягушки обнаружен только один белок mPR $\beta$  из этого семейства с мембранной локализацией (Zhu et al., 2003). Инъекция антител против mPR $\beta$  в ооциты ингибирует созревание как под действием Пг, так и тестостерона (Josefsberg et al., 2007).

Общепринято, что в поддержании блока мейоза у позвоночных ведущая роль принадлежит цАМФ (Racowsky, 1984; Dekel et al., 1988). Снижение внутриклеточного уровня цАМФ является необходимым условием созревания (Dekel, Beers, 1978; Villecco et al., 2000; Conti et al., 2002). Однако, является ли это единственным условием для начала созревания по-прежнему обсуждается. Долгое время оставалось неизвестным, как достигается и поддерживается высокая концентрация цАМФ в ооците. Выяснилось, у *Xenopus* в активации аденилатциклазы участвуют обе субъединицы G $\alpha_s$  и G $\beta\gamma$  гетеротримерного G-белка, которые постоянно активны в растущем ооците. Ингибирование какой-либо из субъединиц усиливает стероид-индуцированное созревание (Gallo et al., 1995; Sheng et al., 2001; Sheng et al., 2005). Своей активностью субъединицы обязаны мембранному рецептору GPR3 семейства GPCR, конститутивно активному без лиганда (Deng et al., 2008; Rios-Cardona et al., 2008; Mehlmann et al., 2004; Mehlmann, 2005). При индукции созревания ХГЧ рецептор GPR3 протеолитически расщепляется металлопротеиназой (Deng et al., 2008), и активность аденилатциклазы резко падает. Однако, этого недостаточно для созревания ооцитов, что указывает на существование альтернативного пути поддержания мейотической блокады, а главным пусковым механизмом созревания у шпорцевой лягушки *in vivo* все же являются стероиды.

ФК также участвуют в поддержании блока мейоза. У некоторых представителей хвостатых и бесхвостых амфибий, в том числе у шпорцевой лягушки, удаление слоя ФК вызывает спонтанное созревание у закончивших рост ооцитов, собранных в репродуктивный период (Vilain et al., 1980; Kwon et al., 1989; Zelarayán et al., 1995). Высокий уровень фосфолипидов (фосфатидилхолина и фосфатидилинозитола) и вторичных посредников (диацилглицерола и инозитолтрифосфата) в цитоплазме таких ооцитов позволяет им созревать просто в отсутствие ингибиторов из ФК (например, цАМФ) при разобщении ЩК. У *Bufo arenarum* при этом активируется G $\alpha_i$ , подавляющая аденилатциклазу и протеинкиназу А (Zelarayán et al., 2012).

ПРОЧИЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ  
НА ПРОЦЕСС СОЗРЕВАНИЯ

Созревание ооцитов *in vitro* возможно с помощью инсулина (El-Etr et al., 1979), а также инсулин подобного фактора роста 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) (Maller et al., 1981). На *Xenopus* с помощью биохимических и иммунофлюоресцентных методов рецептор xIGF-1R к IGF-1 и инсулину был обнаружен как в ооцитах, так и в ФК (Sadler et al., 2010). Связывание лигандов с рецептором к IGF-1 приводит к активации каскада фосфоинозитол-3-киназа – протеинкиназа Akt – фосфодиэстераза 3, что приводит к снижению уровня цАМФ (Andersen et al., 2003). При удалении фолликулярных оболочек созревание ооцитов, стимулированное действием IGF-1, снижается на 26%, что говорит о вспомогательной роли фолликулярных оболочек. На клетках млекопитающих *in vitro* было показано, что IGF-1 стимулирует стероидогенез в клетках гранулезы (Adashi et al., 1985). У шпорцевой лягушки в присутствии ингибиторов стероидогенеза цианокетона и аминоглутетимида индукция созревания ооцитов инсулином не нарушалась. (El-Etr et al., 1980; Sadler et al., 2010). Механизм действия IGF-1 до конца не ясен, однако, показано, что требуется тесный контакт между ФК и поверхностью ооцита для обеспечения оптимального ответа на инсулин. Полагают, что стероидные и пептидные пути действуют синергично, снижая уровень цАМФ, и запускают созревание.

На ФК обнаружены рецепторы к ацетилхолину, эндотелину, ангиотензину II и АТФ (Arellano et al., 1999; Kumar et al, 1993 King et al., 1996; Montiel-Herrera et al., 2011). Связывание с лигандами на поверхности ФК вызывает два типа ответов в ооците: входящие потоки Cl<sup>-</sup>, не зависимые и зависимые от концентрации Са в цитоплазме ооцита. Сигнальный каскад, приводящий к повышению концентрации Са в ооците включает в себя: активацию фосфолипазы С в ФК, синтез диацилглицерола и инозитол-3-фосфата, который проникает в ооцит через ЩК. Последующее повышение концентрации Са в ооците вызывает открытие Са-зависимых Cl<sup>-</sup> каналов (Arellano et al., 2012). На основании электро-физиологических данных авторы предполагают существование двух типов ФК, контакты которых проницаемы и не проницаемы для инозитол-3-фосфата. Эндотелин и ацетилхолин *in vitro* усиливают созревание ооцитов, индуцированное Пг (Dascal et al., 1984; Sandberg et al., 1990), по-видимому, через механизм активации фосфолипазы С.

На целый ряд воздействий (гонадотропины, аденозин и др.) фолликулы отвечают усилением исходящих токов К<sup>+</sup> через К<sub>АТФ</sub>-зависимые каналы, активация которых происходит с участием

цАМФ (Miledi, Woodward, 1989). К<sub>АТФ</sub> каналы находятся на мембранах ФК. Активация потоков К<sup>+</sup> повышает скорость и эффективность созревания ооцитов под действием Пг. В регуляции К<sup>+</sup> каналов участвуют паракринные механизмы системы фолликула с участием АТФ (Saldaña et al., 2005). Баланс ионных потоков на поверхности фолликула и ооцита определяет потенциал на мембране ооцита и является важной составляющей в процессе оогенеза и созревания. Входящие потоки ионов Cl<sup>-</sup> и выходящие потоки К<sup>+</sup> на мембране ооцита и ФК соответственно вызывают гиперполяризацию их плазматических мембран и, способствуют возобновлению мейотического деления ооцита.

Авторы выражают благодарность д.б.н. А.В. Белявскому за помощь в работе над статьей, а также д.б.н. М.Н. Скоблиной и д.б.н. С.Г. Васецкому за полезные критические замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Скоблина М.Н. Созревание окруженных фолликулярными оболочками ооцитов травяной лягушки (*Rana temporaria*), стимулированное низкими концентрациями прогестерона, зависит от транскрипции // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 2. С. 137–141.

Скоблина М.Н. Участие щелевых контактов в стимуляции созревания ооцитов травяной лягушки *in vitro* низкими концентрациями прогестерона // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 5. С. 350–355.

Adashi E.Y., Resnick C.E., D’Ercole A.J. et al. Insulinlike growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function // Endocr. Rev. 1985. V. 6. P. 400–420.

Ahn R.S., Yoo M.S., Kwon H.B. Evidence for two-cell model of steroidogenesis in four species of amphibian // J. Exp. Zool. 1999. V. 284. P. 91–99.

Albanese-Carmignani M.P., Zaccone G.A. Comparative cytochemical study of the yolk platelets in the growing oocytes of *Triturus cristatus* and *Rana esculenta* // Acta Histochem. 1977. V. 59. P. 273–284.

Andersen C.B., Sakaue H., Nedachi T. et al. Protein kinase B/Akt is essential for the insulin- but not progesterone-stimulated resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes // Biochem. J. 2003. V. 369. № 2. P. 227–238.

Arellano R.O., Garay E., Miledi R. Muscarinic receptor heterogeneity in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes // J. Physiol. 1999. V. 521. № 2. P. 409–419.

Arellano R.O., Robles-Martínez L., Serrano-Flores B. et al. Agonist-activated Ca<sup>2+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> channels in *Xenopus* ovarian follicular cells: functional heterogeneity within the cell monolayer // J. Cell Physiol. 2012. V. 227. № 10. P. 3457–3470.

Ascoli M., Fanelli F., Segaloff D.L. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective // Endocrin. Rev. 2002. V. 23. P. 141–174.



- Bayaa M., Booth R.A., Sheng Y. et al. The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 23. P. 12607–12612.
- Beyo R.S., Sreejith P., Divya L. et al. Ultrastructural observations of previtellogenic ovarian follicles of the caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii* // J. Morphol. 2007. V. 268. № 4. P. 329–342.
- Browne C.L., Werner W. Intercellular junctions between the follicle cells and oocytes of *Xenopus laevis* // J. Exp. Zool. 1984. V. 230. P. 105–113.
- Bruzzzone A., Buschiazzo J., Alonso T.S. Lipids during *Bufo arenarum* oogenesis // Zygote. 2003. V. 11. P. 95–100.
- Buratini J., Price C.A. Follicular somatic cell factors and follicle development // Reprod. Fertil. Dev. 2011. V. 23(1). P. 32–39.
- Buschiazzo J., Alonso T.S. Effect of meiotic maturation on yolk platelet lipids from *Bufo arenarum* oocytes // J. Exp. Zool. 2005. V. 303. P. 813–822.
- Buschiazzo J., Bruzzzone A., Alonso T.S. Detailed lipid analysis of yolk platelets of amphibian (*Bufo arenarum*) oocytes // J. Exp. Zool. 2003. V. 297. P. 189–195.
- Cieniewicz A.M., Woodruff R.I. Passage through vertebrate gap junctions of 17/18 kDa molecules is primarily dependent upon molecular configuration // Tissue Cell 2010. V. 42. P. 47–52.
- Coggins L.W. An ultrastructural and radioautographic study of early oogenesis in the toad *Xenopus laevis* // J. Cell Sci. 1973. V. 12. P. 71–93.
- Conti M., Andersen C.B., Richard F. et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation // Mol. Cell Endocrinol. 2002. V. 187. P. 153–159.
- Curran J.E., Woodruff R.I. Passage of 17 kDa calmodulin through gap junctions of three vertebrate species // Tissue Cell. 2007. V. 39. P. 303–309.
- Dascal N., Yekuel R., Oron Y. Acetylcholine promotes progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes // J. Exp. Zool. 1984. V. 230. P. 131–135.
- De Boer T.P., Kok B., Roël G. et al. Cloning, embryonic expression, and functional characterization of two novel connexins from *Xenopus laevis* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V. 349(2). P. 855–862.
- De Boer T.P., Kok K., Neuteboom K.I.E. et al. Cloning and functional characterization of a novel connexin expressed in somites of *Xenopus laevis* // Dev. Dyn. 2005a. V. 233. P. 864–971.
- De Boer T.P., van der Heyden M.A.G. *Xenopus* connexins: how frogs bridge the gap // Differentiation. 2005b. V. 73. P. 330–340.
- Dekel N., Beers W.H. Rat oocyte maturation *in vitro*: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75(9). P. 4369–4373.
- Dekel N., Galiani D., Sherizly I. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes // Mol. Cell Endocrinol. 1988. V. 56. P. 115–121.
- Deng J., Lang S., Wylie C. et al. The *Xenopus laevis* isoform of G protein-coupled receptor 3 (GPR3) is a constitutively active cell surface receptor that participates in maintaining meiotic arrest in *X. laevis* oocytes // Mol. Endocrinol. 2008. V. 22(8). P. 1853–1865.
- Dumont J.N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals // J. Morphol. 1972. V. 136. P. 153–79.
- Dumont J.N., Brummett A.R. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues // J. Morphol. 1978. V. 155. № 1. P. 73–97.
- El-Etr M., Schorderet-Slatkine S., Baulieu E.E. Meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes initiated by insulin // Science. 1979. V. 205. P. 1397–399.
- El-Etr M., Schorderet-Slatkine S., Baulieu E.E. The role of zinc and follicle cells in insulin-initiated meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes // Science. 1980. V. 210. P. 929–930.
- El-Zein G., Boujard D., Garnier D.H. et al. The dynamics of the steroidogenic response of perfused *Xenopus* ovarian explants to gonadotropins // Gen. Comp. Endocrinol. 1988. V. 71(1). P. 132–140.
- Evaul K., Jamnongjit M., Bhagavath B. et al. Testosterone and progesterone rapidly attenuate plasma membrane Gbetagamma-mediated signaling in *Xenopus laevis* oocytes by signaling through classical steroid receptors // Mol. Endocrinol. 2007. V. 21. № 1. P. 186–196.
- Falconi R., Petrini S., Quaglia A. et al. Fine structure of undifferentiated gonads in *Rana dalmatina* tadpoles // Ital. J. Zool. 2001. V. 68. P. 15–21.
- Finn R.N. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins // Biol. Reprod. 2007. V. 76. P. 926–935.
- Fortune J.E. Steroid production by *Xenopus* ovarian follicles at different developmental stages // Dev. Biol. 1983. V. 99. P. 502–509.
- Fortune J.E., Ming Y.Y., Wanzirai M. *In vitro* and *in vivo* regulation of follicular formation and activation in cattle // Reprod. Fertil. Dev. 2011. V. 23. P. 15–22.
- Gallo C.J., Hand A.R., Jones T.L. et al. Stimulation of *Xenopus* oocyte maturation by inhibition of the G-protein alpha S subunit, a component of the plasma membrane and yolk platelet membranes // J. Cell Biol. 1995. V. 130. № 2. P. 275–284.
- Gerber-Huber S., Nardelli D., Haefliger J.A. et al. Precursor-product relationship between vitellogenin and the yolk proteins as derived from the complete sequence of a *Xenopus* vitellogenin gene // Nucleic Acids Res. 1987. V. 15. P. 4737–4760.
- Gimlich R.L., Kumar N.M., Gilula N.B. Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos // J. Cell Biol. 1990. V. 110. P. 597–605.

- Gohin M., Bodinier P., Fostier A. et al. Aromatase expression in *Xenopus* oocytes: a three cell-type model for the ovarian estradiol synthesis // J. Mol. Endocrinol. 2011. V. 47. P. 241–250.
- Haccard O., Dupré A., Liere P. et al. Naturally occurring steroids in *Xenopus* oocyte during meiotic maturation. Unexpected presence and role of steroid sulfates // Mol. Cell Endocrinol. 2012. V. 362. P. 110–119.
- Hamazaki T.S., Iuchi I., Yamagami K. Purification and identification of vitellogenin and its immunohistochemical detection in growing oocytes of the teleost, *Oryzias latipes* // J. Exp. Zool. 1987. V. 242. P. 333–341.
- Harris A.L. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2007. V. 94. № 2. P. 120–143.
- Harris J.D., Hibler D.W., Fontenot G.K. et al. Cloning and characterization of zona-pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian – species-the ZPA, ZPB and ZPC gene families // DNA Seq. 1994. V. 4. № 6. P. 361–393.
- Hedrick J.L. Anuran and pig egg zona pellucida glycoproteins in fertilization and early development // Int. J. Dev. Biol. 2008. V. 52. P. 683–701.
- Hsü C.Y., Lü M.H., Huang H.T. et al. The correlation of fine structure with endocrine function of ovarian follicle cells in tadpoles // Gen. Comp. Endocrinol. 1985. V. 57. № 1. P. 77–87.
- Iwasawa H., Yamaguchi K. Ultrastructural study of gonadal development in *Xenopus laevis* // Zool. Sci. (Japan) 1984. V. 1. P. 591–600.
- Jagarlamudi K., Rajkovic A. Oogenesis: transcriptional regulators and mouse models // Mol. Cell Endocrinol. 2012. V. 356. № 1–2. P. 31–39.
- Josefsberg B.-Y.L., Lewellyn A.L., Thomas P. et al. The role of *Xenopus* membrane progesterone receptor beta in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation // Mol. Endocrinol. 2007. V. 21. № 3. P. 664–673.
- Kessi E., Guixé V., Preller A. et al. Glycogen synthesis in amphibian oocytes: Evidence for an indirect pathway // J. Biochem. 1996. V. 315. P. 455–460.
- Kim J.Y. Control of ovarian primordial follicle activation // Clin. Ex. Reprod. Med. 2012. V. 39. № 1. P. 10–14.
- King B.F., Pintor J., Wang S. et al. A novel P1 purinoreceptor activates an outward K<sup>+</sup> current in follicular oocytes of *Xenopus laevis* // The J. Pharmacol. Exp. Ther. 1996. V. 276. P. 93–100.
- Kloc M., Bilinski S., Dougherty M.T. et al. Formation, architecture and polarity of female germline cyst in *Xenopus* // Dev. Biol. 2004. V. 266. P. 43–61.
- Kubo H., Kawano T., Tsubuki S. et al. Egg envelope glycoprotein gp37 as a *Xenopus* homolog of mammalian ZP1, based on cDNA cloning // Dev. Growth Diff. 2000. V. 42. P. 419–427.
- Kumar C.S., Nuthulaganti P., Pullen M. et al. Novel endothelin receptors in the follicular membranes of *Xenopus laevis* oocytes mediate calcium responses by signal transduction through gap junctions // Mol. Pharmacol. 1993. V. 44. № 1. P. 153–157.
- Kwon H.B., Ahn R.S. Relative roles of theca and granulosa cells in ovarian follicular steroidogenesis in the amphibian, *Rana nigromaculata* // Gen. Comp. Endocrinol. 1994. V. 94. № 2. P. 207–214.
- Kwon H.B., Lim Y.K., Choi M.J. et al. Spontaneous maturation of follicular oocytes in *Rana dybowskii* in vitro: seasonal influences, progesterone production and involvement of camp // J. Exp. Zool. 1989. V. 252. P. 190–199.
- Laird D.W. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1711. P. 172–182.
- Landesman Y., Postma F.R., Goodenough D.A. et al. Multiple connexins contribute to intercellular communication in the *Xenopus* embryo // J. Cell Sci. 2003. V. 116. P. 29–38.
- Lin Y.W., Kwon H.B., Petrino T.R. et al. Studies on the mechanism of action of estradiol in regulating follicular progesterone levels: effects on cAMP mediated events and 3-hydroxysteroid dehydrogenase // Dev. Growth Diff. 1988. V. 30. P. 611–618.
- Liu X.S., Ma C., Hamam Al-W. et al. Transcription-dependent and transcription-independent functions of the classical progesterone receptor in *Xenopus* ovaries // Dev. Biol. 2005. V. 283. P. 180–190.
- Luque M.E., Serrano M.D., Mónaco M.E. et al. Involvement of cAMP and calmodulin in endocytic yolk uptake during *Xenopus laevis* oogenesis // Zygote. 2011. V. 4. P. 1–9.
- Lutz L.B., Cole L.M., Gupta M.K. et al. Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. V. 98. № 24. P. 13728–13733.
- Lutz L.B., Jamnongjit M., Yang W.H. et al. Selective modulation of genomic and nongenomic androgen responses by androgen receptor ligands // Mol. Endocrinol. 2003. V. 17. № 6. P. 1106–1116.
- Maller J.L., Koontz J.W. A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin // Dev. Biol. 1981. V. 85. P. 309–316.
- Martinez S., Grandy R., Pasten P. et al. Plasma membrane destination of the classical *Xenopus laevis* progesterone receptor accelerates progesterone-induced oocyte maturation // J. Cell Biochem. 2006. V. 99. № 3. P. 853–859.
- Martinez S., Pastén P., Suarez K. et al. Classical *Xenopus laevis* progesterone receptor associates to the plasma membrane through its ligand-binding domain // J. Cell Physiol. 2007. V. 211. № 2. P. 560–567.
- Matsuda F., Inoue N., Manabe N. et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells // J. Reprod. Dev. 2012. V. 58. № 1. P. 44–50.

- Mehlmann L.M. Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocyte // *Dev. Biol.* 2005. V. 288. № 2. P. 397–404.
- Mehlmann L.M., Saeki Y., Tanaka S. et al. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes // *Science*. 2004. V. 306. № 5703. P. 1947–1950.
- Miledi R., Woodward R.M. Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes // *J. Physiol. Lond.* 1989. V. 416. P. 601–621.
- Miwa S., Ya L., Swanson P. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by *in vitro* ligand autoradiography // *Biol. Reprod.* 1994. V. 50. P. 629–642.
- Monaco M.E., Villecco E.I., Sánchez S.S. Implication of gap junction coupling in amphibian vitellogenin uptake // *Zygote*. 2007. V. 15. № 2. P. 149–157.
- Montiel-Herrera M., Zaske A.M., Garcia-Colunga J. et al. Ion currents induced by ATP and angiotensin II in cultured follicular cells of *Xenopus laevis* // *Mol. Cells*. 2011. V. 32. P. 397–404.
- Mulner O., Ozon R. The roles of follicular envelopes in the initiation of *Xenopus* oocyte maturation // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1981. V. 44. № 3. P. 335–43.
- Mulner O., Thibier C., Ozon R. Steroid biosynthesis by ovarian follicles of *Xenopus laevis* *in vitro* during Oogenesis // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1978. V. 34. P. 287–295.
- Neijssen J., Herberts C., Drijfhout J.W. et al. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions // *Nature*. 2005. V. 434. P. 83–88.
- Oba Y., Hirai T., Yohiura Y. et al. Cloning and functional characterization of a gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1999a. V. 263. P. 584–590.
- Oba Y., Hirai T., Yohiura Y. et al. The duality of fish gonadotropin receptors: cloning and characterization of a second gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1999b. V. 265. P. 366–371.
- O'Brien E.D., Salicioni A.M., Cabada M.O. et al. Vitellogenesis in *Bufo arenarum*: identification, characterization and immunolocalization of high molecular mass lipovitellin during oogenesis // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 155. № 3. P. 256–265.
- Ogielska M., Kotusz A. Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in Anuran amphibians // *J. Morphol.* 2004. V. 259. P. 41–54.
- Opresko L.K., Wiley H.S. Receptor-mediated endocytosis in *Xenopus* oocytes I. Characterization of the vitellogenin receptor system // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 4109–4115.
- Opresko L., Wiley H.S., Wallace R.A. Differential postendocytotic compartmentation in *Xenopus* oocytes is mediated by a specifically bound ligand // *Cell*. 1980. V. 22. P. 47–57.
- Panchin Y. Evolution of gap junction proteins – the pannexin alternative // *J. Exp. Biol.* 2005. V. 208. P. 1415–1419.
- Patiño R., Purkiss R.T. Inhibitory effects of n-alkanols on the hormonal induction of maturation in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes: implications for gap junctional transport of maturation-inducing steroid // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1993. V. 91. № 2. P. 189–198.
- Pepling M.E., Spradling A.C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles // *Dev. Biol.* 2001. V. 234. P. 339–351.
- Polzonetti-Magni A.M., Mosconi G., Carnevali O. et al. Gonadotropins and reproductive function in the anuran amphibian, *Rana esculenta* // *Biol. Reprod.* 1998. V. 58. № 1. P. 88–93.
- Preller A., Kessi E., Ureta T. Glycogen synthesis by the direct or indirect pathways depends on glucose availability: *in vivo* studies in frog oocytes // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. P. 663–666.
- Redshaw M.R. The hormonal control of the amphibian ovary // *Amer. Zoologist*. 1972. V. 12. P. 289–306.
- Ríos-Cardona D., Ricardo-González R.R., Chawla A. et al. A role for GPRx, a novel GPR3/6/12-related G-protein coupled receptor, in the maintenance of meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes // *Dev. Biol.* 2008. V. 317. № 1. P. 380–388.
- Sadler S.E., Angleson J.K., Dsouza M. IGF-1 Receptors in *Xenopus laevis* ovarian follicle cells support the oocyte maturation response // *Biol. Reprod.* 2010. V. 82. P. 591–598.
- Saldaña C., Vázquez-Cuevas F., Garay E. et al. Epithelium and/or theca are required for ATP-elicited K<sup>+</sup> current in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes // *J. Cell Physiol.* 2005. V. 202. № 3. P. 814–821.
- Sandberg K., Bor M., Markwick A. et al. Angiotensin II-induced calcium mobilization in oocytes by signal transfer through gap junctions // *Science*. 1990. V. 249. P. 298–301.
- Sheng Y., Montplaisir V., Liu X.J. Co-operation of G $\alpha$  and G $\beta\gamma$  in maintaining G2 arrest in *Xenopus* oocytes // *J. Cell Physiol.* 2005. V. 202. № 1. P. 32–40.
- Sheng Y., Tiberi M., Booth R.A. et al. Regulation of *Xenopus* oocyte meiosis arrest by G protein  $\beta\gamma$  subunits // *Curr. Biol.* 2001. V. 11. № 6. P. 405–416.
- Smits G., Campillo M., Govaerts C. et al. Glycoprotein hormone receptors: Determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand specificity // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 2692–2703.
- Sosinsky G.E., Boassa D., Dermietzel R. et al. Pannexin channels are not gap junction hemichannels // *Channels (Austin)*. 2011. V. 5. № 3. P. 193–197.
- Sretarugsa P., Wallace R.A. The developing *Xenopus* oocyte specifies the type of gonadotropin-stimulated steroidogenesis performed by its associated follicle cells // *Dev. Growth. Differ.* 1997. V. 39. № 1. P. 87–97.

- Stifani S., Nimpf J., Schneider W.J.* Vitellogenesis in *Xenopus laevis* and chicken: cognate ligands and oocyte receptors // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 2. P. 882–888.
- Swenson K.I., Jordan J.R., Beyer E.C. et al.* Formation of gap junctions by expression of connexins in *Xenopus* oocyte pairs // *Cell*. 1989. V. 57. P. 145–155.
- Tanimura A., Iwasawa H.* Ultrastructural observations on the origin and differentiation of somatic cells during gonadal development in the frog *Rana nigromaculata* // *Dev. Growth. Differ.* 1988. V. 30. P. 681–691.
- Thibier-Fouchet C., Mulner O., Ozon R.* Progesterone biosynthesis and metabolism by ovarian follicles and isolated oocytes *Xenopus laevis* // *Biol. Reprod.* 1976. V. 14. P. 317–326.
- Tian J., Kim S., Heilig E. et al.* Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 26. P. 14358–14363.
- Uribe M.C.A.* The ovary and oogenesis // *Sever D.M. Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela.* V. 1. Science Publishers. 2003. P. 135–150.
- Valiunas V., Polosina Y.Y., Miller H. et al.* Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions // *J. Physiol.* 2005. V. 568. № 2. P. 459–468.
- Varriale B., Pierantoni R., Di Matteo et al.* Relationship between estradiol-17 beta seasonal profile and annual vitellogenin content of liver, fat body, plasma, and ovary in the frog (*Rana esculenta*) // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1988. V. 69. P. 328–34.
- Veenstra R.D., Wang H.Z., Beblo D.A. et al.* Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance // *Circ. Res.* 1995. V. 77. P. 1156–1165.
- Veitch G.I., Gittens J.E., Shao Q. et al.* Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. P. 2699–2707.
- Vilain J.P., Moreau M., Guerrier P.* Uncoupling of oocytes follicle cells triggers reinitiation of meiosis in amphibian oocytes // *Dev. Growth Differ.* 1980. V. 22. P. 687–691.
- Villecco E.I., Aybar M.J., Genta S.B. et al.* Effect of gap junction uncoupling in full-grown *Bufo arenarum* ovarian follicles: participation of cAMP in meiotic arrest // *Zygote.* 2000. V. 8. P. 171–179.
- Villecco E.I., Mónaco M.E., Sánchez S.S.* Ultrastructural changes in the follicular epithelium of *Ceratophrys cranwelli* previtellogenic oocytes // *Zygote.* 2007. V. 15. № 3. P. 273–83.
- Wahli W., Germond J.E., ten Heggeler B. et al.* Vitellogenin genes A1 and B1 are linked in the *Xenopus laevis* genome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. № 22. P. 6832–6836.
- Wallace R.A., Hoch K.L., Carnevali O.* Placement of small lipovitellin subunits within the vitellogenin precursor in *Xenopus laevis* // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 213. P. 407–409.
- Wallace R.A., Jared D.W., Dumont J.N. et al.* Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. 3. Optimum incubation conditions // *J. Exp. Zool.* 1973. V. 184. P. 321–333.
- Wallace R.A., Selman K.* Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians // *J. Electron. Microsc. Tech.* 1990. V. 16. № 3. P. 175–201.
- Wallace R., Dumont J.N.* The induced synthesis and transport of yolk proteins and their accumulation by the oocyte in *Xenopus laevis* // *J. Cell Physiol.* 1968. V. 72. P. 73–89.
- White S.N., Jamnongjit M., Gill A. et al.* Specific modulation of nongenomic androgen signaling in the ovary // *Steroids.* 2005. V. 70. № 5–7. P. 352–360.
- Wiley H.S., Wallace R.A.* The structure of vitellogenin. Multiple vitellogenins in *Xenopus laevis* give rise to multiple forms of the yolk proteins // *J. Biochem.* 1981. V. 256. P. 8626–8634.
- Wright C.S., Becker D.L., Lin J.S. et al.* Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation // *Reproduction.* 2001. V. 121. № 1. P. 77–88.
- Yamaguchi S., Hedrick J.L., Katagiri C.* The synthesis and localization of envelope glycoproteins in oocytes of *Xenopus laevis* using immunocytochemical methods // *Dev. Growth Differ.* 1989. V. 31. P. 85–94.
- Yang J.C., Hedrick J.L.* cDNA cloning and sequence analysis of the *Xenopus laevis* egg envelope glycoprotein gp43 // *Dev. Growth Differ.* 1997. V. 39. P. 457–467.
- Yang W.H., Lutz L.B., Hammes S.R.* *Xenopus laevis* ovarian CYP17 is a highly potent enzyme expressed exclusively in oocytes. Evidence that oocytes play a critical role in *Xenopus* ovarian androgen production // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 9552–9559.
- Yoshitome S., Nakamura H., Nakajo N. et al.* Mr 25 000 protein, a substrate for protein serine/threonine kinases, is identified as a part of *Xenopus laevis* vitellogenin B1 // *Dev. Growth Differ.* 2003. V. 45. P. 283–294.
- Yoshizaki G., Patiño R.* Molecular cloning, tissue distribution, hormonal control in the ovary of Cx41 mRNA, a novel *Xenopus* connexin gene transcript // *Mol. Reprod. Dev.* 1995. V. 42. P. 7–18.
- Zelarayán L.I., Ajmat M.T., Bonilla F. et al.* Involvement of G protein and purines in *Rhinella arenarum* oocyte maturation // *Zygote.* 2012. V. 2. P. 1–10.
- Zelarayán L., Oterino J., Bühler M.I.* Spontaneous maturation in *Bufo arenarum* oocytes: follicle wall involvement, respiratory activity and seasonal influences // *J. Exp. Zool.* 1995. V. 272. P. 356–62.
- Zhu Y., Bond J., Thomas P.* Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 5. P. 2237–2242.

## Follicular Cells of the Amphibian Ovary: Origin, Structure, and Functions

V. V. Konduktorova<sup>a, b</sup> and N. N. Luchinskaya<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia  
e-mail: [venir5@mail.ru](mailto:venir5@mail.ru)

Received October 16, 2012; in final form, December 7, 2012

**Abstract**—Formation of the follicular envelopes surrounding oocytes in the developing ovary and their subsequent morphological differentiation go hand-in-hand with succession of the steroidogenesis stages, arrest of meiosis and its maintenance, establishment of the conditions necessary for vitellogenesis, oocyte growth, and maturation. Metabolites are exchanged via gap junctions and receptor-mediated transport through the perioocytic space. The ion transport in follicular cells (FCs) regulates the plasma membrane potential, creating the conditions for efficient directed transport through gap junctions. Manifold biologically active substances accepted by follicular cells are an additional adjusting lever for regulating the state of follicle system. In this review, we have attempted to emphasize the amphibian FCs as key players in the follicle system; the more so as we have failed to find any review that would bring together the data on the origin of amphibian FCs, their morphology, as well as regulation of oocyte growth and development. As a rule, recent works in this field focus on the molecular mechanisms providing for regulation of individual stages in oocyte development. This review describes the origin and changes in the morphology of follicular cells during the development of *Xenopus laevis* oocyte as well as the data on their regulatory functions in vitellogenesis and their involvement in steroidogenesis, maintenance of meiotic arrest, and subsequent maturation.

**Keywords:** amphibian, follicular cells, oogenesis, gap junctions, vitellogenesis, steroidogenesis

УДК 577.2150

## УНИВЕРСАЛЬНЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЬ RAS И ЕГО РОЛЬ В РАЗВИТИИ ДРОЗОФИЛЫ

© 2013 г. В. Г. Митрофанов, А. И. Чекунова, П. А. Прошаков, М. И. Барсуков\*

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,

119334 Москва, ул. Вавилова, 26

\*Московский Государственный Педагогический Университет, Биолого-химический факультет

129164 Москва, ул. Кибальчича, 6

E-mail: vgmitro1936@mail.ru

Поступила в редакцию 23.03.12 г.

Окончательный вариант получен 05.02.13 г.

Гены семейства *Ras* впервые были идентифицированы в 1960-х годах как трансформирующие онкогены, которые вызывали опухоли у крыс при заражении вирусами саркомы Harvey и Kirsten (онкогены-*Ha-ras* и *Ki-ras* соответственно). Позже трансформирующие гены *ras* были открыты в раковых клетках человека. Последующие исследования клеток нейробластомы привели к открытию третьего гена *ras* у человека, названного *N-ras*. Продукты генов *Ras*-семейства играют важную роль в процессах клеточной пролиферации и дифференцировки и находятся под контролем рецепторных тирозинкиназ. Использование дрозофилы как модели позволило с успехом применять генетический анализ в исследованиях функций генов *ras*. У *D. melanogaster* с помощью пробы *v-Ha ras* выявлено 3 полосы на препаратах политенных хромосом. Все три полосы (*Dras1*, *Dras2*, *Dras3*) расположены в дисках 85D, 64B, 62B хромосомы 3 по карте Бриджеса. Из них только ген *Dras1* имеет общее происхождение с генами *ras* млекопитающих. Несмотря на многочисленные работы по изучению роли генов *ras* в развитии насекомых, данный вопрос изучен недостаточно. Не так много внимания в литературе уделяется роли изменчивости генов *ras* в эволюции. В настоящее время активно идентифицируются мишени Ras-белков, изучаются сигнальные пути с их участием, а также последствия воздействий на эти пути в тканях дрозофилы, в клетках дрожжей и млекопитающих. Обсуждаются функции белка Ras в сигнальных путях, контролирующими проявление мутаций в морфогенезе дрозофилы и связь гена *ras* с фенотипическими признаками опухоли.

**Ключевые слова:** семейство Ras-белков, гены *ras*, онтогенез, *Drosophila*.

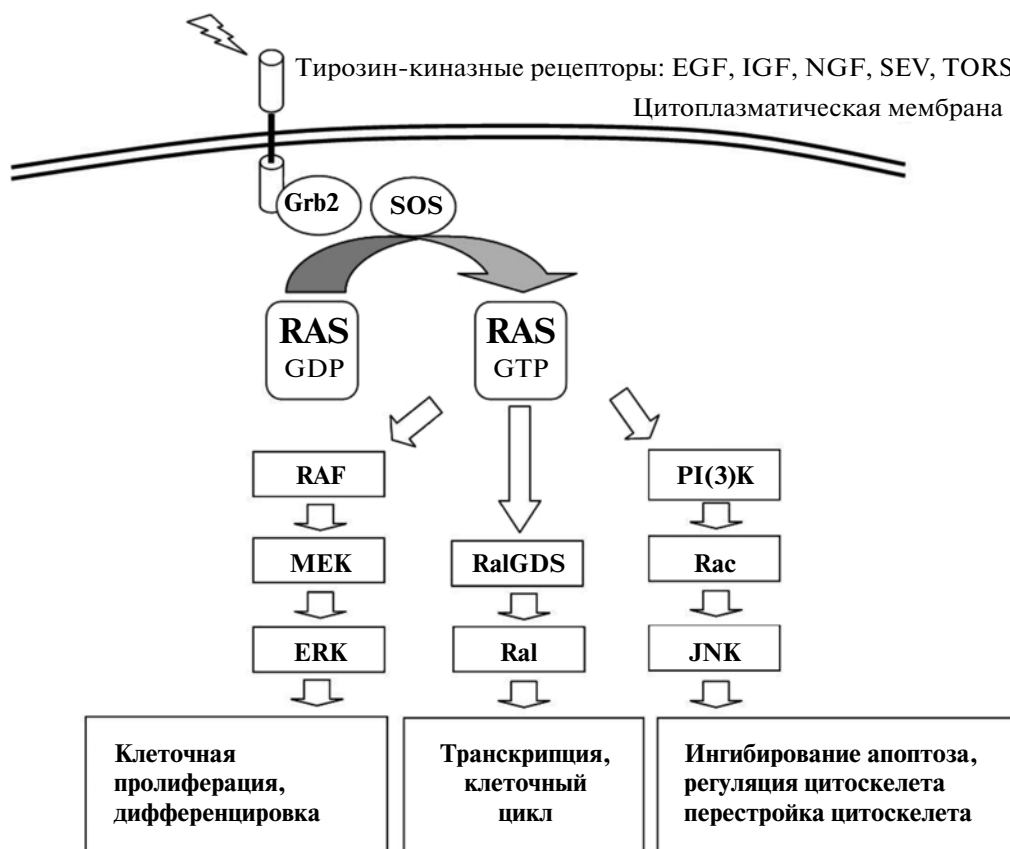
DOI: 10.7868/S0475145013040083

### ВВЕДЕНИЕ

Белки Ras являются членами высоко консервативного семейства ГТФазных белков, которые функционируют в путях сигнальной трансдукции у широкого ряда организмов и в процессах развития (Bogulski, 1998). Среди различных ГТФ/ГДФ связывающих белков особое место занимают продукты семейства генов *ras*. Белки семейства Ras относятся к малым G-белкам или малым ГТФамам, которые играют роль “молекулярных переключателей” (Valencia et al., 1991; Rommel et al., 1998; Rojas et al., 2012). Белки семейства Ras участвуют в передаче сигнала от мембранных рецепторов и регулируют процессы клеточного деления, прикрепления их к внеклеточному матриксу, а также влияют на состояние актинового цитоскелета и на злокачественную трансформацию. Белки Ras являются компонентами различных каскадов передачи сигнала (рис. 1). Наиболее изученным явля-

ется MAP-киназный каскад (с участием протеинкиназ, активируемых митогенами). Активация и инактивация Ras обеспечиваются двумя специфическими белками. Фактор GEF (guanine-nucleotide exchange factor) осуществляет обмен ГДФ на ГТФ в активном центре белка Ras, в результате чего Ras-белок переходит из неактивного состояния в активное. GAP (GTPase-accelerating protein) взаимодействует с Ras и повышает его ГТФазную активность. После дефосфорилирования ГТФ Ras инактивируется.

Структурно-функциональное исследование показало, что N-конец, консервативный у всех белков Ras, ответственен за активацию мишеней Ras. Очевидно различные белки Ras стимулируются разными сигналами, но последовательно активируют одни и те же мишени внутри клетки. В клетках млекопитающих трансформирующая функция Ras тесно связана с их способностью



**Рис. 1.** Схема регуляции клеточных процессов с участием Ras-белка. Упрощенная модель передачи сигнала от активированного тирозин-киназного рецептора через промежуточный белок Grb2, активирующий SOS, который, в свою очередь, активирует Ras, заменяя ГДФ на ГТФ. Активированный Ras запускает ряд каскадов, включающих белки PI(3)K, RAF, RalGDS и другие, что приводит к активации широкого спектра клеточных процессов.

прикрепляться к плазматической мембране. Представители семейства Ras имеют на С-конце сигнальную последовательность *cys-A-A-X* (где А – любая алифатическая аминокислота, X – терминальная аминокислота), потеря которой, как показал Виллумсен с соавторами на примере *v-Ha-ras* (Willumsen et al., 1984, 1985), предотвращает прикрепление белка к мембране и снижает его трансформирующий потенциал. Функция Ras-обусловленных путей сигнальной трансдукции (Ras-сигналинг) заключается в контроле клеточной пролиферации и дифференцировки (Lowy et al., 1993, Moodie et al., 1994). ГТФазная активность Ras контролируется РТК рецепторными тирозинкиназами (Schlessinger, 1993; van der Geer et al., 1994).

Для того чтобы ген *ras* функционировал как онкоген, в локусе должны произойти определенные мутации, в результате которых ген активируется. Мутационно активированные гены *ras* обнаружены примерно у 30% всех случаев рака у человека (Reuveni et al., 2003). Разные точечные мутации в одном и том же кодоне могут активировать этот ген (Caron et al., 1983).

Анализ организации и последовательностей двух локусов (*c-Ki-ras 1* и *c-Ki-ras 2*) у человека, родственных трансформирующему гену вируса мышиной саркомы Кирстена показал, что один из них является функциональным геном, а другой – псевдогеном. Два финальных кодирующих экзона функционального гена, вероятно, возникли с помощью дупликации. Очевидно, функциональный ген может специфицировать любой из двух родственных полипептидов в процессе РНК-сплайсинга (McGrath et al., 1983). ГТФазная активность может избирательно нарушаться мутацией, что приводит к активации онкогенного потенциала (McGrath et al., 1983, 1983a).

Исследования на дрозофиле дали возможность применять генетический анализ в исследованиях функций гена *ras*. Сначала три члена семейства онкогенов *ras* были идентифицированы только у позвоночных. У *D. melanogaster* с помощью пробы *v-Ha ras* выявлено три полосы на препаратах полигенных хромосом. Все три полосы, соответствующие генам (*Dras1*, *Dras2*, *Dras3*) расположены в дисках 85D, 64B, 62B хромосомы 3 по карте Бри-

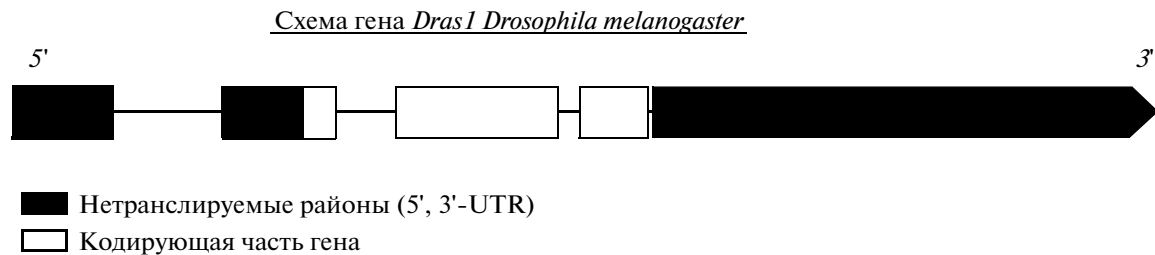


Рис. 2. Схема гена *Dras1 Drosophila melanogaster*.

джеца (Shilo, Weinberg, 1981; Neuman-Silberberg et al., 1984).

Три гена *ras Drosophila* имеют низкий уровень гомологии между собой. Ген *Dras1* кодирует белок p21, который состоит из двух доменов. N-концевой домен белка Ras дрозофилы является функциональным и сохраняет гомологию с другими белками семейства Ras (Neuman-Silberberg et al., 1984). *Dras1* кодирует один основной транскрипт длиной 2.0 т.п.о., в то время как *Dras2* имеет три сплайс-варианта (1.6, 2.1, 2.6 т.п.о.). *Dras1* утратил последовательность ТАТА-бокса, но содержит элементы транскрипционного регулятора DRE (DNA replication-related element), представленного палиндромной последовательностью TATCGATA и необходимого для связывания фактора DREF (Hirose et al., 1993).

*Dras1* кодирует белок, гомологичный белку Haras млекопитающих на 75% (Neuman-Silberberg et al., 1984). Степень гомологии трех Ras-белков млекопитающих составляет между собой 80% (Fasano et al., 1984). При этом в пределах данной группы наибольшее сходство наблюдается в отношении фрагмента, соответствующего первым 120 аминокислотным остаткам, где степень гомологии составляет 97% (Fasano et al., 1984; Ogura et al., 2009; Rojas et al., 2012). *Dras1 D. melanogaster* является структурным и функциональным аналогом генов *ras* млекопитающих (рис. 2). Транскрипт гена составляет 1958 п.о. Его трансляция приводит к образованию полипептида длиной 189 аминокислотных остатков. (Neuman-Silberberg et al., 1984; Schejter et al., 1985).

Степень гомологии гена *Dras2* и с *Ha-ras* млекопитающих меньше и составляет 50%. На N-конце белок *Dras2* содержит один дополнительный аминокислотный остаток по сравнению с *Dras1* и 4 дополнительных аминокислотных остатка по сравнению с *Ras1* дрожжей (Mozer et al., 1985). В отличие от них промотор *Dras2* имеет два вырожденных GC-боксов и ТАТА-подобные последовательности. Промотор *Dras2* у *D. melanogaster* двунаправленный и регулирует еще один ген, ориентированный в противоположном направлении (Cohen et al., 1988). Эти два совместно транскрибируемых гена разделены только 93 основаниями. Делеционный анализ показал, что для транскрипционной актив-

ности обоих генов требуется общий цис-действующий элемент в пределах данного промотора (Salzberg et al., 1993).

Ген *Dras3* дрозофилы не имеет интронов (Karim et al., 1996) и кодирует белок, гомологичный *c-Ha-ras* млекопитающих на 48% и *c-Ki-ras* на 56% (Schejter et al., 1985). Наибольшая гомология так же, как и у двух других *ras*-генов дрозофилы, наблюдается в области, соответствующей N-концу белка. Согласно гипотезе Пауэрса с соавторами (Powers et al., 1984), эти эволюционно консервативные участки обеспечивают функциональную активность белков данного семейства.

*Dras*-гены у дрозофилы имеют длинные нетранслируемые 5'- или 3'-районы (Brook, 1987). Анализ последовательностей 27 аллелей каждого из 3 генов, родственных *ras*, показал, что все они имеют низкий уровень полиморфизма. Отсутствие аминокислотных замещений в последовательностях гена *Dras1* у *D. melanogaster* и у видов-двойников *D. simulans* и *D. mauritiana* свидетельствует о высокой функциональной значимости. Ген *Dras1* имеет наименьшую внутривидовую изменчивость относительно величины дивергенции от видов-двойников в сравнении с *Dras2* (Gasperini, Gibson, 1999).

Изменения дозы генов *Dras* у дрозофилы не имеют фенотипического эффекта, но потеря функции аллелей *Dras1* и *Dras3* модифицирует мутантные фенотипы других генов, с которыми они взаимодействуют (сигналы, которые они передают). Поскольку все *ras*-гены функционируют в одних и тех же тканях, их транскрипты имеют сходное пространственное распределение (Segal et al., 1986).

Сравнение аминокислотных последовательностей у разных членов семейства Ras у позвоночных показало, что 120 N-концевых остатков высоко консервативны, тогда как C-конец изменчив. При исследовании сконструированных химерных белков, содержащих 111 N-концевых аминокислотот человеческого онкогена *Ha-ras EJ*, и C-конец от двух дрозофилиных генов *ras* (*Dras1* или *Dras3*) выяснилось, что одна из этих конструкций, которая имела только 20 консервативных остатков между положениями 121 и 189, могла трансформировать крысиные клетки rat-1. Трансформированные



клетки способны индуцировать летальные опухоли у крыс. Вторая конструкция, содержащая С-конец от другого гена *ras* дрозофилы, также способна к трансформации, но только после сцепления с вирусным транскрипционным промотором. Иными словами, большинство остатков на С-конце можно заместить без ослабления трансформирующих способностей белка Ras (Schejter et al., 1985). Онкогены *ras* и *src* являются компонентами каскада, активируемого фактором роста нервов, поэтому нарушение их функции приводит к тем же последствиям, что и нарушение функции ростового фактора при дифференцировке клеток феохромоцитомы PC12 (Bar-Sagi et al., 1985).

Сравнительный анализ последовательностей генов семейства *ras* разных видов организмов (включая млекопитающих и дрозофил) показал, что все три гена *ras* млекопитающих: *Ha-ras* (Harvey et al., 1964), *Ki-ras* (Kirsten et al., 1967) и *N-ras* (Marshall et al., 1982; Hall et al., 1983) гомологичны гену *Dras1* дрозофилы. Два других гена *Dras* беспозвоночных филогенетически близки другим генам семейства *ras*: *Rap1B*, *Rras2* и могут выполнять другую функцию (Ogura et al., 2009; Rojas et al., 2012).

#### РОЛЬ В РАЗВИТИИ ДРОЗОФИЛЫ

При исследовании характера транскрипции трех *Dras*-онкогенов в развитии у *D. melanogaster* показало, что все три гена экспрессируются на одинаковом уровне, судя по характеру транскрипции в эмбрионах, личинках, куколках и имаго. Высокие уровни *Dras* найдены у дрозофилы в неоплодотворенных яйцах (Lev et al., 1985). Конкретная роль генов *ras* у дрозофилы фактически изучена мозаично и требует более детального анализа. Однако некоторые функции уже установлены и коротко они изложены ниже.

1) В течение эмбриогенеза транскрипты *Dras1* ограничены главным образом центральной нервной системой эмбриона, что свидетельствует о его возможной роли в детерминации нервных клеток (Ezer et al., 1994).

2) Активированный Ras вызывает нарушения развития у трансгенных *D. melanogaster* (Bishop et al., 1988).

3) Активация Ras в пределах проторакальной железы индуцирует преждевременное выделение экдизона, тогда как экспрессия dn-P13K или dn-Raf в проторакальной железе сильно задерживает увеличение выпуска экдизона, что приводит к прекращению роста и началу окукливания (Caldwell et al., 2005).

4) Ras1 контролирует миграцию пограничных клеток в течение оогенеза (Lee et al., 1996).

5) Ras1 обуславливает сигнальную трансдукцию в развитии концевых участков эмбриона. Вероятно, большинство нарушений фенотипов головы и брюшка появились в результате неудачной специ-

фикации терминальных сегментов у эмбрионов посредством пути Torso, который, как известно, требует участия Ras1. Инъекция активированного Ras1 возвращает к норме фенотипы с материнским эффектом 0-мутаций генов *csw* и *tor* (Lu et al., 1993).

6) Ras-сигналинг участвует в формировании мускулатуры. Мускулатура у дрозофилы происходит от двух типов миобластов: клетки-основатели (КО) и компетентные для слияния миобласты (КСМ). Анализ экспрессии позволил идентифицировать гены, которые дифференциально экспрессируются в КО и КСМ. В первичной мезодерме, формирующей мускулатуру эмбрионов, полученных от мутантов *Toll10b*, экспрессия активированных форм Notch или Ras приводила к индукции детерминации миобластов по КСМ или КО пути соответственно. Представленные в эмбрионах транскрипты каждого генотипа сравнивались с помощью гибридизации с кДНК на микрочипах. Среди 83 генов, которые экспрессировались дифференциально, обнаружены гены, продукты которых экспрессируются специфично для КО или КСМ. Наиболее четкие результаты получены для генов *heartless* и *hibris*. Такие гены как *phyllopod* играют решающую роль в процессе спецификации отдельных мускулов. Также показано, что ген *tartan* необходим для нормального морфогенеза мускулатуры (Altero et al., 2003).

7) Ras1-белок – необходимый компонент ключевых сигнальных путей развития дрозофилы. Нарушение экспрессии конститутивно активных форм Ras1 (Ras1V12) и тирозин-киназного рецептора *sevenless* (*sev*) в течение эмбриогенеза приводит к гибели благодаря несвоевременной активации сигнальных путей RTK/Ras1. Изоляция мутаций в гене *trithorax* и аллелизм с геном *breathless* RTK свидетельствует об участии *ras* в регуляции гомеозисных генов (Maixner et al., 1998).

8) Как показало сравнение последовательностей 25 аллелей гена *Dras1* *D. melanogaster* с аллелем того же гена *D. simulans*, давление отбора, действующее на компоненты Ras-сигналинга (от мембраны в клетку), является разнонаправленным. Поскольку Ksg (киназный супрессор Ras) является почти мономорфным у *D. melanogaster*, модификаторы Ras-сигналинга являются более вероятным источником количественной изменчивости, связанной с этим коровым регуляторным путем (Riley et al., 2003).

9) Ген *argos* негативно регулирует трансдукцию сигнала в каскаде Ras/MAPK. Мутации с потерей функции в компонентах сигнального каскада Ras/MAPK действуют как доминантные супрессоры фенотипа, вызванного 0-мутациями гена *star* (Sawamoto et al., 1996).

10) Ген *sprouty* кодирует внутриклеточный белок, связанный с внутренней поверхностью плазматической мембраны. Мутанты *sprouty*(–) имеют избыточное число фоторецепторов, конусных и

пигментных клеток. Продукт гена *sprouty* связан с двумя внутриклеточными компонентами Ras-сигналинга (Drk и Gap1) и является ингибитором Ras-пути (Casici et al., 1999).

11) Локус *Ras1* участвует в формировании оболочек яйца у *Drosophila*. Гетерозиготность по мутации *ras1(5703)* влияет не только на жизнеспособность и морфогенез глаз, но и на формирование оболочек яйца в оогенезе. Мутантные самки умеренно фертильны и откладывают яйца с нарушениями структуры оболочек яйца, из которых вылупляются нормальные личинки. *Ras1*-сигналинг в течение оогенеза включает новые компоненты, которые, возможно, тесно связаны с дополнительными процессами передачи сигнала и с реорганизацией цитоскелета (Schnorr et al., 1996; Schnorr et al., 2001).

12) Поиск мутаций, которые снижают эффективность передачи сигнала тирозинкиназным рецептором, продуктом гена *sevenless D. melanogaster*, выявил 7 генов, продукты которых в норме необходимы для сигналинга с помощью *Sevenless*. Четыре из семи генов существенны для сигналинга с помощью второй тирозинкиназы, продукта гена *ellipse*. Один из этих семи генов кодирует белок *Ras*. Еще один ген кодирует белок гомологичный белку *CDC25* у *S. cerevisiae*, активатору обмена гуанина. Стимуляция активности *Ras*-белка является важным элементом в передаче сигнала с помощью *Sevenless* и *Ellipse* (Simon et al., 1991).

13) Во время расхождения мышечных предшественников пути Notch- и Ras-сигналинга взаимодействуют. Чтобы вызвать специфический ответ, межклеточные сигналы должны быть точно интегрированы. В процессе спецификации предшественников мускулатуры и сердца из кластера эквивалентных клеток в эмбриональной мезодерме дрозофилы, путь Ras/MAPK, активируемый рецепторами ростовых факторов, функционирует как индуктивный сигнал клеточной детерминации, тогда как Notch противодействует этой активности. Ras индуцирует Notch (его лиганд Delta) и антагонист рецептора эпидермального ростового фактора *Argos*. Delta и *Argos* затем неавтономно блокируют позитивную регуляцию обратной связи, которая амплифицирует Ras-сигнал. Эта обратная связь характеризуется активацией обусловленных Ras проксимальных компонентов путей рецепторов эпидермального ростового фактора (DER) и фактора роста фибробластов дрозофилы (Htl). В свою очередь активация Notch приводит к снижению уровня экспрессии Delta и *Argos*, тем самым усиливая односторонний ингибирующий ответ (Carmena et al., 2002).

14) Локусам *wingless (Wg)* и *decapentaplegic (Dpp)* присуща компетенция для обусловленной рецепторной тирозинкиназой индукции субпопуляции мускульных и сердечных предшественников у дрозофилы с помощью действия как выше по каскаду,

так и параллельно с Ras. В дополнение к регуляции экспрессии проксимальных компонентов Ras-пути, *wg* и *dpp* координируют прямые эффекты трех сигнал-активируемых транскрипционных факторов (dTCF, Mad и Pointed, функционирующих в путях Wg, Dpp и Ras/MAPK соответственно) и двух транскрипционных факторов, ограниченных тканями (Twist и Tinman), на энхансер гена *eve* (Even skipped). Интеграция Pointed с комбинаторными эффектами dTCF, Mad, Twist и Tinman определяет специфичность индуктивного Ras-сигналинга в развитии мускулов и сердца (Halfon et al., 2000).

15) Повышенная концентрация транскриптов *ras* в пролиферирующих клетках в течение личиночного развития свидетельствует, что Ras-белки являются необходимым компонентом в делении эпителиальных клеток, однако их функция, очевидно, не ограничивается пролиферирующими клетками. Единообразное распределение *ras*-транскриптов в кортексе мозга показывает, что эти белки связаны также с развитием кортексных клеток (Segal et al., 1986).

16) У *Drosophila* активация пути *Ras1* подавляет апоптотную активность, индуцированную генами *head involution defective (hid)* и *reaper (rpr)*. Антиапоптотная активность Ras в развитии глаза регулируется EGF-рецептором дрозофилы и действует через Raf/MAPK-путь. С помощью трансгенных мух и культуры клеток показано, что сайты фосфорилирования белка Hid киназой MAPK являются критическими для этой реакции. Эктопическая активация Raf/MAPK-пути в развивающемся эмбрионе и развивающемся глазе подавляет естественно происходящий апоптоз и регулирует транскрипцию проапоптотного гена *hid* (Kurada et al., 1996; Bergmann et al., 1998).

17) Активированная форма *Ras1 (RasV12)* способствует росту клеток в развитии крыла у дрозофилы. Клетки, утратившие Ras имели малые размеры и сниженную скорость роста, скапливались в G1-фазе, и подвергались апоптозу благодаря конкуренции между клетками. Активация Ras увеличивает размеры клеток, и скорость роста способствует переходу из фазы G1 к S-фазе. Ras и dMyc посттрансляционно увеличивают уровни циклина E. Регуляция роста с помощью Ras не нарушает переход от G2 к M. Ras-ГТФаза связана с внутриклеточными механизмами, которые контролируют клеточный цикл, клеточный рост и идентичность клеток (Prober et al., 2000, 2002).

18) В условиях потери гена эпителиальной полярности *scribble* в клонах клеток имагинальных дисков дрозофилы, активация Ras может приводить к индукции злокачественных опухолей. Сверхпролиферация мутантной ткани устойчива к апоптозу. Клетки оставляют свое место происхождения и вторгаются в другие органы, приводя к летальному эффекту. Усиление сигналинга Jun-N-концевой киназы (JNK), вызванное потерей гена

*scribble*, способствует движению трансформированных клеток во вторичные сайты. Этот эффект требует Fos-зависимой активации транскрипции гена металлопротеазы (*mmp1*), которая находится ниже по каскаду от JNK. Подавление экспрессии *mmp1* с помощью интерферирующей РНК снижает способность клеток к инвазии. Проинвазивная функция JNK проявляется только в условиях опухоли, когда активированный Ras предотвращает апоптотный ответ на активацию JNK-пути, который включается в нетрансформированных клетках (Uhlirova et al., 2006).

19) Как известно, между клетками опухоли и ее микроокружением формируются сложные взаимоотношения, которые во многом определяют дальнейшее развитие опухоли и образование метастаз. Использование *D. melanogaster* как модели позволило исследовать эффекты кооперации различных клонов клеток в системе имагинальных дисков дрозофилы. Так, стимулом к метастазированию опухоли, вызванной активацией RasV12, послужил контакт с клоном клеток, несущих мутантный супрессор опухоли Scribbled (Wu et al., 2010). К прогрессированию опухолей, вызванных активацией RasV12, приводит также повреждение тканей и стрессовые условия, которые активируют JNK-путь. Эпителиальные клетки имагинальных дисков, в которых функция митохондрий нарушена и происходит чрезмерная продукция активных форм кислорода (ROS), потенциально индуцируют развитие опухоли в прилегающих тканях в сочетании с активацией онкогена *ras*. Эффект такой кооперации распространяется на соседние клетки с нормальной митохондриальной функцией и приводят к разрастанию опухоли и формированию метастаз (Ohsawa et al., 2012).

20) Потеря функции регулятора полярности клеток и опухолевого супрессора Scribbled (Scrib) у дрозофилы приводит к нарушениям Hippo-пути в эпителиальных клетках глазных и крыловых имагинальных дисков. Следствием этого является разрастание мутантной ткани, которое может быть предотвращено подавлением функции транскрипционного фактора Scalloped в глазных дисках или снижением уровня Yorkie в крыловых дисках. В сочетании с активацией Ras данный механизм может способствовать быстрому прогрессированию опухоли (Doggett et al., 2011).

21) Брумби с соавторами (Brumby et al., 2011) провели поиск генов-корегуляторов Ras-пути по влиянию гиперэкспрессии некоторых факторов на Ras-зависимую гиперплазию глаза дрозофилы. Были идентифицированы следующие гены: *Rac1*, *Rho1(Act)*, *Rho1*, *RhoGEF2*, *pbl*, *rib* и *east*. Все они кодируют белки-регуляторы клеточной морфологии.

Развитие глаза заслуживает особого внимания, в связи с анализом функции гена *Dras1*, поскольку мутации в этом гене дают фенотип “грубые глаза”.

Глаз взрослой мухи состоит примерно из 800 омматидиев. Каждый омматидий состоит из 8 фоторецепторных клеток (R1–R6 и R8 внешние, R7 – внутренние клетки), 4 конусных, секретирующих линзы, и 8 других аксессуарных клеток. В предшественниках конусных клеток экспрессируется ген *sevenless* (*sev*). Если конститутивно активная форма Ras1 (Ras1V12) экспрессируется в группе клеток, эквивалентных R7, используя промотор *sev* (*sev-Ras1V12*), то в омматидиях формируются дополнительные конусные клетки. Экспрессия Ras1 N17 (доминантная негативная форма Ras1) приводит к формированию меньшего числа конусных клеток, чем обычно в омматидии. Влияние вариантов Ras1 на формирование конусных клеток модулируется изменением дозы гена в локусе *canoe* (*cno*), который кодирует цитоплазматический белок с Ras-связывающей активностью. Усиление или ослабление дозы гена влияет на потенциальное действие *sev-Ras1V12*, приводящее к заметной индукции конусных клеток. Снижение *cno+* активности также усиливает действие *sev-Ras1N17*, что приводит к дальнейшему снижению числа конусных клеток содержащихся в омматидиях. При отсутствии экспрессии *sev-Ras1V12* или *sev-Ras1N17* сверхдоза гена *cno+* способствует формированию конусных клеток, тогда как существенное снижение активности *cno+* приводит к формированию на 1–3 конусные клетки меньше, чем в норме. Дополнительные конусные клетки, возникающие в результате взаимодействия *cno* и Ras1V12, генерируются из пула недифференцированных клеток, которые в норме развиваются в пигментные клетки или подвергаются апоптозу (Matsuo et al., 1997).

Развитие фенотипа “грубые глаза” связано с киназным супрессором Ras (KSR), точная функция которого неясна. Сверхэкспрессия KSR-киназного домена в развитии глаза дрозофилы блокирует дифференцировку фоторецепторных клеток и приводит к грубой структуре глазных фасеток (Therrien et al., 2000). Клеточная детерминация фоторецепторов R7 контролируется рецепторной тирозинкиназой Sevenless (SevRTK) и Ras1. Активация белка Sevenless требуется для спецификации фоторецепторов R7 в глазу дрозофилы. Активация белка Ras1 является решающим ранним событием пути сигналинга и его конститутивная активация необходима для индукции всех эффектов действия Sevenless. Еще один ген: *e(sev)2B*, кодирующий белковую структуру SH3-SH2-SH3, требуется для сигналинга. Этот белок связывается *in vitro* с Sevenless и с Son of sevenless (Sos) и участвует в активации Ras1 (Simon et al., 1993; Karim et al., 1996).

Ras активирует каскад протеин-киназ RAF/MAPKK/MAPK, что приводит к фосфорилированию и модификации активности транскрипционных факторов Yan и Pointed. KSR ре-

гулирует передачу сигнала через каскад RAF/MAPKK/MARK, индуцирует транскрипцию Phyl, который, действуя совместно с Sina, стимулирует деградацию репрессора транскрипции Ttk88 при детеминации фоторецепторов R1, R6 и R7 (Wassarman, 1995; Wassarman et al., 1997).

Ключевая роль белка Ras1 в передаче сигнала от рецепторной тирозинкиназы Sevenless (sev) была подтверждена в экспериментах с трансформацией дрозофил конструкцией, содержащей ген *ras1(V12)*, находящимся под контролем *sev*-энхансера/промотора. В норме активация рецептора Sevenless лигандом Bride-of-sevenless (Boss) в предшественниках фоторецепторов R7 приводит к их полноценной дифференциации. Снижение дозы гена *Ras1* нарушает этот процесс и из предшественников фоторецепторов R7 формируются нейтральные конусные клетки. Гиперэкспрессия *Ras1(V12)* в клетках с неактивной формой *sevenless* приводит к восстановлению фенотипа R7 (Fortini et al., 1992).

Детерминация внешних фоторецепторных клеток в развитии глаза определяется геном *seven-up (svp)*, который и кодирует орфанный ядерный рецептор с 2 изоформами. Ras необходим для функции обеих изоформ *svp*. (Begemann et al., 1995). Фоторецепторы R8, R2 и R5 первыми начинают нейтральную дифференцировку в глазном имажинальном диске дрозофилы. Все три клетки требуют функции гена *star* для правильной сборки омматидиев. Презумптивные клетки R8, R2 и R5 при утрате функции *Star* неспособны к нейтральной дифференцировке и гибнут через несколько часов (Heberlein et al., 1993).

Белок 14-3-3ε функционирует во множестве путей от рецепторных тирозинкиназ. Его функция заключается в усилении эффективности каскада Ras1. У *Drosophila* в двух районах гена, кодирующего белок 14-3-3ε, выявлены мутации-супрессоры фенотипа “грубые глаза”, вызванного эктопической экспрессией RAS1(V12).

Среди членов семейства 14-3-3 только два белка, 14-3-3ε и 14-3-3ξ, играют важную роль в Ras1-сигналинге при формировании фоторецепторов глаза дрозофилы (Chang et al., 1997; Dickson, et al., 1996).

Детерминация и дифференцировка в развитии сложного глаза дрозофилы начинается в морфогенетической борозде, в которой клетки организованы в предкластеры. Здесь происходит синхронизированная остановка клеточного цикла на стадии G1. Продукт гена *spitz* является стимулирующим фактором предкластеров, транскрипция которого резко увеличивается в морфогенетической борозде. Члены группы Spitz: (Spitz (Spi), Rhomboid (Rho) и Star (S)) взаимодействуют с компонентами каскада Ras-сигналинга в развитии глаза и жилок крыла (Tio et al., 1994).

Развитие всех фоторецепторов блокируется экспрессией Ttk88 и этот ген является репрессором развития нейронов. Ttk88 не блокирует формирование клеток ненейронального типа, однако в противоположность транскрипционному фактору Yan, действует как общий репрессор дифференцировки в развивающемся глазу. Таким образом, можно предполагать, что Yan контролирует общее решение к дифференцировке, а Ttk88, очевидно, действует в более поздней фазе при блокировке дифференцировки нейронов. Репрессирующие эффекты Ttk88 и Yan смягчаются с помощью подавления уровней экспрессии этих белков в ответ на сигналинг RAS/MARK (Rubin et al., 1997).

Ген *Dras2* не может замещать *Dras1* в развитии глаза (Fortini et al., 1992).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уже известные данные свидетельствуют о сложном генетическом контроле формирования глаза у *Drosophila*, а также о значении *Dras1* в путях передачи сигналов. О важной роли генов *ras* для развития свидетельствует и степень их участия в процессах детерминации и дифференцировки. По существу, функциональный анализ гена *Dras1* у дрозофил начался только в последние 10–15 лет.

*Dras1*, несмотря на свою консервативность, обладает некоторой видоспецифичной изменчивостью у видов-двойников группы *D. virilis* (Чекунова и др., 2008). Предстоит провести большую экспериментальную работу по анализу причин изменчивости у видов-двойников и причин ее видоспецифичности. Первоочередной задачей, конечно, будет выяснение всех взаимодействий *Dras1* с другими генами, участвующими в процессах детерминации и дифференцировки органов и тканей дрозофилы. Такая работа уже фактически началась (Brumby et al., 2011). Очевидно, ген *Dras1* является одним из древнейших регуляторов, который участвует во всех процессах детерминации и дифференцировки. В настоящее время решен еще один важный вопрос относительно значения исследований на *Drosophila*. Можно ли использовать исследования туморогенеза у дрозофил для выявления механизмов онкогенеза у человека? Как показано во многих сравнительных исследованиях, процессы опухолеобразования у человека и дрозофилы вполне сопоставимы, поскольку многие элементы каскадов передачи сигналов у *Drosophila* и млекопитающих высоко консервативны (Brymly et al., 2003). Даже неполный список функций *Dras1*, приведенный в разделе “Роль в развитии дрозофилы”, свидетельствует о многообразии процессов, в которых участвует данный ген, и разнообразии связей, которые он образует с другими участниками каскадов, контролирующими развитие.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Чекунова А.И., Куликов А.М., Михайловский С.С. и др. Родственные отношения дрозофил группы *virilis*, реконструированные на основе последовательностей гена *Dras1* // Генетика, 2008. Т. 44. № 3. С. 336–345.
- Artero R., Furlong E.E., Beckett K. et al. Notch and Ras signaling pathway effector genes expressed in fusion competent and founder cell during *Drosophila* myogenesis // Development. 2003. V. 130. № 25. P. 6257–6272.
- Bar-Sagi D., Feramisco J.R. Microinjection of *ras* oncogene into Pc12 cells induces morphological differentiation // Cell. 1985. V. 42. № 3. P. 841–848.
- Begemann G., Michon A.M., vd Voorn L. et al. The *Drosophila* orphan nuclear receptor seven-up requires the Ras pathway for its function in photoreceptor determination // Development. 1995. V. 121. № 1. P. 225–235.
- Bergmann A., Agapite J., McCall K. et al. The *Drosophila* gene *hid* is a direct molecular target of Ras1-dependent survival signaling // Cell. 1998. V. 95. № 10. P. 331–341.
- Bishop J.G., Corces V. Expression of an activated *ras* gene causes developmental abnormalities in transgenic *Drosophila melanogaster* // Genes Dev. 1988. V. 2. P. 567–577.
- Boguski M.S., McCormick F. Protein regulating Ras and its relatives // Nature. 1993. V. 366. № 6456. P. 643–654.
- Brock H.W. Sequence and genomic structure of *ras* homologues *Dmras85D* и *Dmras64B* of *Drosophila melanogaster* // Gene. 1987. V. 51. № 2. P. 129–137.
- Brumby A.M., Goulding K.R., Schlosser T. et al. Identification of novel Ras-cooperating oncogenes in *Drosophila melanogaster*. A RhoGEF/Rho-family JNK pathway is a central driver of tumorigenesis // Genetics. 2011. V. 188. № 1. P. 105–125.
- Brumby A.M., Richardson H.E. Scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila* // EMBO J. 2003. V. 22. № 21. P. 5769–5779.
- Caldwell P.E., Walkiewicz M., Stern M. Ras activity in the *Drosophila* prothorax regulates body size and developmental rate via ecdysone release // Curr. Biol. 2005. V. 15. № 23. P. 1785–1795.
- Capon D.J., Seeburg P.H., McGrath J.P. et al. Activation of *Ki-ras2* gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations // Nature. 1983. V. 304. № 5926. P. 507–513.
- Carmena A., Buff E., Halfo Dickson B.J. et al. Modulating Raf signaling in *Drosophila* eye development // Genetics. 1996. V. 142. № 1. P. 163–171.
- Casci T., Vinos J., Freeman M. Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling // Cell. 1999. V. 96. № 5. P. 655–665.
- Cohen N., Saltzberg A., Lev Z. A bidirectional promoter is regulating the *Drosophila ras2* gene // Devel. Biol. 1988. V. 3. № 2. P. 137–142.
- Chang H.C., Rubin G.M. 14-3-3 epsilon positively regulates Ras-mediated signaling in *Drosophila* // Genes & Development. 1997. V. 11. № 9. P. 1.
- Dickson B.J., van der Straten A., Dominguez M. et al. Modulating Raf signaling in *Drosophila* eye development // Genetics. 1996. V. 142. № 1. P. 163–171.
- Doggett K., Grusche F.A., Richardson H.E. et al. Loss of the *Drosophila* cell polarity regulator Scribbled promotes epithelial tissue overgrowth and cooperation with oncogenic Ras-Raf through impaired Hippo pathway signaling // BMC Dev. Biol. 2011. V. 10.1186/1471-213X-11-57.
- Ezer S.T., Sahar D., Salzberg A. et al. Differential expression during embryogenesis of three genes clustered in the Ras1 region of *Drosophila melanogaster* // Devel. Dynamics. 1994. V. 201. № 7. P. 179–190.
- Fasano O., Eldrich T., Tamanoi F. et al. Analysis of the transforming potential of the human Ha-*ras* gene by random mutagenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 4008–4012.
- Fortini M.E., Simon M.A., Rubin G.M. Signaling by the sevenless protein tyrosine kinase is mimicked by Ras1 activation // Nature. 1992. V. 355. № 6360. P. 559–561.
- Gasperini R., Gibson G. Absence of protein polymorphism in the *ras* genes of *Drosophila melanogaster* // J. Mol. Evol. 1999. V. 49. № 5. P. 583–590.
- Halfon V.S., Carmena A., Gisselbrecht S. et al. Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-activated transcription factors // Cell. 2000. V. 29. № 1. P. 63–74.
- Hall A., Marshall C., Spurr N. et al. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the *ras* gene family located on chromosome 1 // Nature. 1983. V. 303. № 5916. P. 396–400.
- Harvey J.J. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice // Nature. 1964. V. 204. P. 1104–1105.
- Heberlein U., Hariharan I.K., Rubin G.M. Star required for neuronal differentiation in the *Drosophila* retina and displays dosage-sensitive interactions with Ras1 // Dev. Biol. 1993. V. 160. № 1. P. 51–63.
- Hirose F., Yamaguchi H., Handa H. et al. Novel 8-base hair sequence (*Drosophila* DNA replication-related element) and specific binding factor involved in the expression of *Drosophila* genes for DNA polymerase  $\alpha$  and proliferating cell nuclear antigen // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 3. P. 2092–2099.
- Karim F.D., Chang H.C., Therrien M. et al. A screen for genes that function downstream of Ras1 during *Drosophila* eye development // Genetics. 1996. V. 143. № 1. P. 315–329.
- Kirsten W.H., Mayer L.A. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus // J. Natl. Cancer Inst. 1967. V. 39. P. 311–335.
- Kurada P., White K. Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating *hid* expression // Cell. 1998. V. 95. № 3. P. 319–329.
- Lee T., Fieg L., Montell D.G. Two distinct roles for Ras in a developmentally regulated cell migration // Development. 1996. V. 122. P. 40–45.
- Lev Z., Kimchie Z., Hessel R. et al. Expression *ras* cellular oncogenes during development of *Drosophila melanogaster* // Mol. Cell Biol. 1985. V. 5. № 6. P. 1540–1542.
- Lowy D.R., Willumsen B.M. Function and regulation of Ras // Ann. Rev. Biochem. 1993. V. 63. P. 851–891.
- Lu X., Chou T.B., Williams N.G. et al. Control of cell fate determination by p21ras Ras1, and essential component of Torso signaling in *Drosophila* // Genes Dev. 1993. V. 7. № 4. P. 621–632.
- Maixner A., Hecker T.P., Phan Q.N. et al. A screen for mutations that prevent lethality caused by expression of activated Sevenless and Ras1 in the *Drosophila* embryo // Developmental Genetics. 1998. V. 23. № 4. P. 347–352.

- Marshall C.J., Hall A.M., Weiss R.A. A transforming gene present in human sarcoma cell lines // *Nature*. 1982. V. 299. № 5879. P. 171–173.
- Matsuo T., Takahashi K., Kaibuchi K. et al. Regulation of cone cell formation by Canoe and Ras in the developing *Drosophila* eye // *Development*. 1997. V. 124. № 14. P. 2671–2680.
- McGrath J.P., Capon D.J., Smith D.H. et al. Structure and organization of the human *Ki-ras* proto-oncogene and a related processed pseudogene // *Nature*. 1983a. V. 304. № 5926. P. 501–506.
- McGrath J.P., Capon D.J., Goeddel D.V. et al. Comparative biochemical properties of normal and activated human *ras21* protein // *Nature*. 1983b. V. 310. № 5979. P. 6.
- Moodie S.A., Wolfman A. 3Rs of life: Ras, Raf and Growth regulation // *Trends Genet.* 1994. V. 10. № 2. P. 44–48.
- Mozer B., Marler R., Parkhurst S. et al. Characterization and developmental expression of a *Drosophila ras* oncogene // *Mol. Cell Biol.* 1985. V. 5. P. 885–889.
- Neuman-Silberberg F.S., Schejter E., Hoffmann F.M. et al. The *Drosophila ras* oncogenes: structure and nucleotide sequence // *Cell*. 1984. V. 37. № 37. P. 1027–1033.
- Ogura T., Tan A., Tsubota T. et al. Identification and expression analysis of *ras* gene in silkworm, *Bombyx mori* // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 11. P. 1–9.
- Ohsawa S. et al. Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in *Drosophila* // *Nature*. 2012. P. 547–551.
- Powers et al. Genes in *S. cerevisiae* encoding proteins with domainhomologous to the mammalian rasproteins // *Cell*. 1984. V. 36. P. 607–612.
- Prober D.A., Edgar B.A. Interactions between Ras1, dMyc, and dP13K signaling in the developing *Drosophila* wing // *Genes Dev.* 2002. V. 16. № 17. P. 2286–2299.
- Prober D.A., Edgar B.A. Ras1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing // *Cell*. 2000. V. 100. № 4. P. 435–446.
- Reuveni H., Klein S., Levitzki A. The inhibition of Ras farnesylation lead to an increase in p27<sup>Kip1</sup> and G1 cell cycle arrest // *Eur. J. Biochem.* 2003. 270(13):2759–27.
- Riley R.M., Jin W., Jibson G. Contrasting selection pressures on components of the Ras-mediated signal transduction pathway in *Drosophila* // *Mol. Ecol.* 2003. 12(5):1315–1323.
- Rojas A.M., Feuntes G., Rausell A., Valencia A. The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids // *Cell Biol.* 2012. V. 196. № 2. P. 189–201.
- Rommel C., Hafen E. Ras – a versatile cellular switch // *Current Opinion in Genetics & Development*. 1998. V. 8. № 4. P. 412–418.
- Rubin G.M., Chang H.C., Karim F. et al. Signal transduction downstream from Ras in *Drosophila* // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1997. V. LXII. P. 347–352. Cold Spring Harbor Lab. Press. 0-87969-53.
- Salzberg A., Cohen N., Halachmi N. et al. The *Drosophila Ras2* and *Rop* gene pair: a dual homology with a yeast *Ras*-like gene and a suppressor of its loss-of-function phenotype // *Development*. 1993. V. 117. № 4. P. 1309–1319.
- Sawamoto K., Okabe M., Tanimura T. et al. The *Drosophila* secreted protein Argos regulates signal transduction in the Ras/MARK pathway // *Dev. Biol.* 1996. V. 178. № 1. P. 13–22.
- Schejter E.D., Shilo B.Z. Characterization of functional domains of p21 ras by use of chimeric genes // *EMBO J.* 1985. V. 4. № 2. P. 407–412.
- Schlessinger J. How receptor tyrosine kinases activate Ras // *Trends Biochem. Sci.* 1993. V. 18. № 8. P. 273.
- Schnorr J.D., Berg C.A. Differential activity of *Ras1* during patterning of the *Drosophila* dorsoventral axis // *Genetics*. 1996. V. 144. № 4. P. 1545–1557.
- Schnorr J.D., Holdcraft R., Chevalier B. et al. Ras1 interacts with multiple new signaling and cytoskeletal loci in *Drosophila* eggshell patterning and morphogenesis // *Genetics*. 2001. V. 159. № 2. P. 609–622.
- Segal D., Shilo B.Z. Tissue localization of *Drosophila melanogaster ras* transcripts during development // *Mol. Cell Biol.* 1986. V. 6. № 6. P. 2241–2248.
- Shilo B.Z., Weinberg R.A. DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster* // *PNAS*. 1981. V. 78. P. 6789–6792.
- Simon M.A., Bowtell D.D., Dodson G.S. et al. Ras1 and putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase // *Cell*. 1991. V. 67. № 4. P. 701–716.
- Simon M.A., Dodson G.S., Rubin G.M. An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro // *Cell*. 1993. V. 73. № 1. P. 169–177.
- Therrien M., Morrison D.K., Wong A.M. et al. A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in *Drosophila* // *Genetics*. 2000. V. 156. № 3. P. 1231–1242.
- Tio M., Va C., Moses K. et al. A *Drosophila* homolog of transforming growth factor alpha, is required in the founding photoreceptor cells of the compound eye facets // *Mech. Dev.* 1994. V. 48. № 1. P. 13–20.
- Uhlirva M., Bohmann D. JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumor in *Drosophila* // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 22. P. 5294–530.
- Valencia A., Chardin P., Wittinghofer A. et al. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids // *Biochemistry*. 1991. V. 30. № 19. P. 4637–4647.
- van der Geer P., Hanter T., Lindberg R.A. Receptor protein-tyrosin kinase and their signal transduction pathways // *Ann. Rev. Cell Biol.* 1994. V. 10. P. 251–337.
- Wassarman D.A. Signal transduction downstream from Ras in *Drosophila* // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1997. V. LXII. P. 347–352. Cold Spring Harbor Lab. Press. 0-87969-535-8/97.
- Wassarman D.A., Solomon N.M., Chang H.C. et al. Protein phosphatase 2A positively and negatively regulates Ras-mediated photoreceptor development in *Drosophila* // *Genes Dev.* 1995. V. 10. № 3. P. 272–278.
- Willumsen B.M., Christiansen A., Hubbert N.I. et al. The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association // *Nature*. 1984. V. 310. № 5978. P. 583–592.
- Willumsen B.M., Cristansen A., Hubbert N.I. et al. p21 ras proteins: flexibility in the major variable region linking the catalytic and membrane anchoring domains // *EMBO J.* 1985. V. 4. № 11. P. 2893–2896.
- Wu M., Pastor-Pareja J.C., Xu T. Interaction between Ras (V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion // *Nature*. 2010. V. 463 № 7280. P. 545–548.

## Universal Intracellular Transducer RAS and Its Role in the Development of *Drosophila*

V. G. Mitrofanov<sup>a</sup>, A. I. Chekunova<sup>a</sup>, P. A. Proshakov<sup>a</sup>, and M. I. Barsukov<sup>b</sup>

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

<sup>b</sup> *Moscow State Pedagogical University, Faculty of Biology and Chemistry,  
ul. Kibal'chicha 6, Moscow, 129164 Russia*

*e-mail: vgmitro1936@mail.ru*

Received March 23, 2012; in final form, February 5, 2013

**Abstract**—*Ras* genes were first identified in the 1960s as transforming oncogenes that caused tumors in rats infected with Harvey and Kirsten sarcoma viruses (*Ha-ras* and *Ki-ras* oncogenes, accordingly). Subsequently, transforming *ras* genes were found in human cancer cells. Further investigations of neuroblastoma cells resulted in the finding of the third *ras* gene in the human, which was called *N-ras*. *Ras* gene products play an important role in the processes of cellular proliferation and differentiation and are controlled by receptor tyrosine kinases. Using *drosophila* as a model object allowed us to perform a successful genetic analysis while studying the functions of *ras* genes. Three polytene chromosome bands were detected in *D. melanogaster* with the help of the *v-Ha ras* sampling. According to Bridges' map, all three bands (*Dras1*, *Dras2*, *Dras3*) were mapped to regions 85D, 64B, and 62B of chromosome 3. Among them, only *Dras1* has a common origin with *ras* genes of mammals. Although there are numerous investigations of the role played by *ras* genes in the development of insects, this problem is still not fully understood. The importance of *ras* gene variations in the course of the evolutionary process has been insufficiently studied as well. Currently, Ras target proteins are actively identified, their signal pathways, as well as effects of influencing these pathways in the *drosophila* tissues, are studied in the cells of yeast and mammals. The main functions of Ras protein is in the signaling pathways controlling mutations during *drosophila*'s morphogenesis and the connections of *ras* gene with phenotypic symptoms of tumors.

**Keywords:** Ras family proteins, *ras* genes, ontogenesis, *Drosophila*

УДК 57.017.642

## УСТАНОВЛЕНИЕ ЛЕВО-ПРАВОЙ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ АСИММЕТРИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ: РОЛЬ БИЕНИЯ РЕСНИЧЕК И ЛЕВОСТОРОННЕГО ТОКА ЖИДКОСТИ В ОБЛАСТИ ГЕНЗЕНОВСКОГО УЗЕЛКА

© 2013 г. А. С. Ермаков

Université Montpellier 1, 5 bd Henri IV – CS 19044  
34967 Montpellier Cedex 2

E-mail: ermakov99@mail.ru

Поступила в редакцию 19.03.13 г.  
Окончательный вариант получен 17.04.13 г.

В ходе индивидуального развития позвоночных последовательно устанавливаются передне-задняя, дорсо-вентральная и лево-правая оси тела. Хотя представители позвоночных билатерально-симметричны снаружи, их внутреннее строение асимметрично. Особый интерес представляет изучение процесса установления висцеральной лево-правой асимметрии у млекопитающих, так как оно имеет, помимо фундаментального, и прикладное медицинское значение. Еще в 1976 году было выдвинуто предположение о возможной связи между биением ресничек и установлением лево-правой асимметрии у млекопитающих. В настоящее время большинство исследователей признает, что биение ресничек в области гензеновского узелка и порождаемый этим биением левосторонний ламинарный ток жидкости играют ведущую роль в потере билатеральной симметрии и запуске экспрессии генов специфического для левой стороны эмбриона сигнального каскада Nodal-Ptx2. Конкретный механизм этого явления к настоящему времени не понят до конца. Существуют три конкурирующих взгляда на то, как левосторонний ток жидкости индуцирует экспрессию ряда генов в левой стороне тела эмбриона. Гипотеза градиента морфогена постулирует, что левосторонний ток создает высокую концентрацию сигнальной биомолекулы в левой части гензеновского узелка, что, в свою очередь, стимулирует запуск экспрессии генов каскада Nodal-Ptx2. Биомеханическая гипотеза (или “модель двух типов ресничек”) гласит, что неподвижные реснички, расположенные по периферии гензеновского узелка, работают как механосенсоры, активируют механочувствительные ионные каналы и запускают процессы кальциевой сигнализации в левой части тела эмбриона. Наконец, “челночная модель” утверждает, что левосторонний ток жидкости переносит липидные везикулы, которые разбиваются при столкновении с неподвижными ресничками периферии гензеновского узелка и высвобождают находящиеся внутри сигнальные биомолекулы. Примечательно также, что за последние годы связь биения ресничек и установления асимметрии открыта также у представителей низших позвоночных. В данной статье автор рассматривает эволюцию представлений о механизмах установления лево-правой висцеральной асимметрии млекопитающих с 1976 года по настоящее время и критически переосмысливает современные представления в этой области науки. По мнению автора, в последние годы получены серьезные аргументы в пользу биомеханической гипотезы установления лево-правой асимметрии млекопитающих.

*Ключевые слова:* лево-правая асимметрия, морфогенез, мышь, реснички, эмбриология млекопитающих, биомеханика, Nodal, Ptx2, Lefty-1, Lefty-2.

DOI: 10.7868/S0475145013050030

### ПЛАН СТРОЕНИЯ ТЕЛА ПОЗВОНОЧНЫХ И ЛЕВО-ПРАВАЯ АСИММЕТРИЯ

Установление трехмерного плана строения и спецификации судьбы зародышевых тканей относительно трех ортогональных осей в ходе эмбрионального развития животных требует четкого согласования множества биологических и биохимических процессов на разных уровнях организации — от молекулярного до макроморфо-

логического. В ходе индивидуального развития позвоночных животных последовательно устанавливаются передне-задняя, дорсо-вентральная и лево-правая оси.

Хотя внешне позвоночные животные билатерально-симметричны, в их внутреннем строении присутствует лево-правая асимметрия (Neville, 1976; Levin, 2005; Raya, Belmonte, 2006; Norris, 2012), многие внутренние органы у позвоночных



животных имеют асимметричное строение или расположение. Если говорить о млекопитающих, то с левой стороны у представителей этой группы позвоночных сердце, желудок, поджелудочная железа, селезенка, с правой — печень и желчный пузырь. Легкие у млекопитающих имеют асимметричное строение, в частности, в случае мыши одна большая доля легких расположена в левой стороне тела и четыре маленьких доли в правой (Kaufman, Bard, 1999).

Принципы установления лево-правой асимметрии сходны для всех групп хордовых, хотя конкретные детали асимметричности органов могут отличаться. Примечательно также, что для нормальных представителей того или иного вида лево-правая асимметрия устанавливается в определенной ориентации (Neville, 1976). Феномен лево-правой асимметрии вызывает много вопросов (Neville, 1976; Mercola, 2003; Levin, 2004; Levin, 2005). Как порождается асимметрия в ходе эмбрионального развития? Зачем она вообще нужна? Когда она появляется в эволюции? Связана ли как-то морфологическая лево-правая асимметрия с хиральной асимметрией биологических молекул (Pasteur, 1948)? Каковы молекулярные механизмы установления лево-правой асимметрии? (Burdine, Schier, 2000; Mercola, Levin, 2001; Norris, 2012). Почему лево-правая асимметрия существует у такого большого числа разных групп организмов? Почему в природной популяции встречается один из асимметричных вариантов, а не оба варианта в отношении 50% на 50%? Ведь гораздо проще представить механизм установления асимметрии со случайным соотношением лево- и право-сторонней ориентации органов, но в природе это не так. Насколько велика роль генов в формообразовании сложноустроенных органов, таких как, например, сердце и какую роль в этом процессе играют биофизические факторы — например, гемодинамика?

Особенно важно понять установление лево-правой висцеральной асимметрии у млекопитающих и человека (Mercola, 2003; Hamada, 2002). Помимо фундаментального, изучение установления лево-правой асимметрии у млекопитающих имеет и важное прикладное значение — среди людей встречаются представители с аномалиями установления лево-правой асимметрии (Levin, 2004; Cassey, Hackett, 2000). Аномалии в установлении лево-правой висцеральной асимметрии встречаются примерно у одного на 8000 новорожденных.

*Situs inversus* встречается примерно у 1 новорожденного из 20000 (Burn, 1991). При этой аномалии происходит полная инверсия внутренних органов относительно передне-задней оси. Поскольку инверсия органов в данном случае абсо-

лютная, то их работа скоординирована, и урона здоровья такая аномалия не наносит. Скорее всего, оценка встречаемости *Situs inversus* у человека занижена, так как часть людей с таким симптомом не выявляется медиками. Другие типы аномалий, такие как изомеризм (потеря асимметрии), инверсия отдельных органов и гетеротаксия (потеря согласованности органов) часто приводят к серьезным осложнениям здоровья.

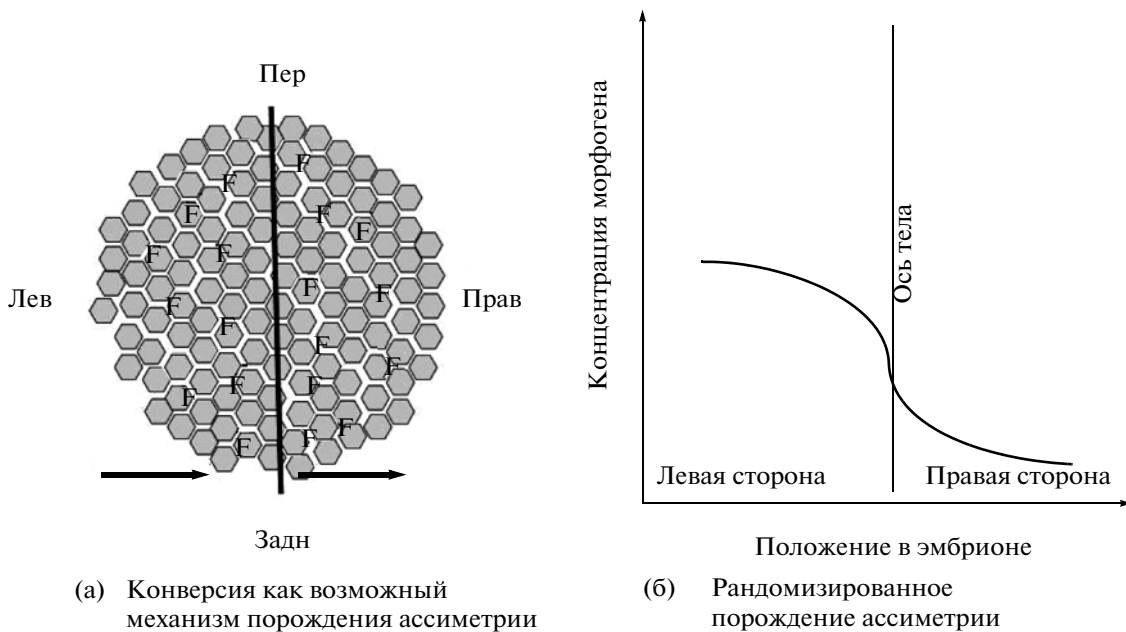
## ИСТОРИЯ ВОПРОСА. ГИПОТЕЗА БРАУНА И ВОЛЬПЕРТА

В начале 1990х Браун и Вольперт выдвинули теоретическую модель, объясняющую установление лево-правой асимметрии у млекопитающих. Согласно этой модели, установление асимметрии включает в себя три ключевых процесса: 1) конверсию, переводящую асимметрию молекул в асимметрию на клеточном и многоклеточном уровне; 2) рандомизацию или случайное порождение асимметрии (асимметрия на клеточном и надклеточном уровне) и 3) интерпретацию, в ходе которой клетки и органы распознают информацию о симметричности и в соответствии с этим развиваются морфологические структуры (Brown, Wolpert, 1990).

Браун и Вольперт исходили из простой предпосылки — если уже определены дорсо-вентральная и передне-задняя оси, то лево-правая ось задана автоматически. Из этого следует также, что, если одна из этих осей будет инвертирована, то и лево-правая ось будет инвертирована. Ученые предположили, что должна существовать асимметричная молекула, которая ориентируется по отношению к дорсо-вентральной и передне-задней оси, и которая участвует в детерминации лево-правой оси. С другой стороны, к началу 1990х известно было уже о существовании мутации *lv* у мышей, при которой инвертирование лево-правой асимметрии происходит в 50% случаев, что натолкнуло авторов на мысль о существовании механизма случайной генерации асимметрии на клеточном и надклеточном уровнях.

**Конверсия** (conversion). Авторы выдвинули гипотезу о механизме, переводящем асимметрию молекул в различия в распределении определенных веществ в левой и правой стороне тела. Согласно этой гипотезе, должна существовать асимметричная молекула, способная ориентироваться определенным образом относительно уже существующих установившихся осей. Наглядно пояснить это можно так: представим себе молекулу в форме латинской буквы F, которая обладает пространственной асимметрией (рис. 1a).

Теперь представим себе зародыш в виде пласта клеток, в котором уже установились переднезадняя ось, дорсовентральная ось и билатеральная сим-



**Рис. 1.** Модель Брауна–Вольперта. (а) Механизм конверсии. Зародыш представлен состоящим из одного слоя клеток. Уже установились передне-задняя и дорсо-вентральная оси. Предположим, что F-образная молекула обладает стереоизомерией и ориентируется определенным образом относительно этих осей. Распределение F-образных молекул задаст лево-правую асимметрию, так как их ориентация с левой стороны не является зеркальным отражением ориентации молекул с правой стороны. Если ориентация таких молекул может влиять на направление молекулярного транспорта, то такой транспорт будет ориентирован в направлении к передне-задней оси на одной стороне тела и от передне-задней оси на другой стороне. (б) Механизм рандомизированного порождения асимметрии. Представим градиент морфогена вдоль лево-правой оси, образующийся по реакционно-диффузионному механизму. Если такой градиент пересекает передне-заднюю ось тела, то концентрация морфогена на одной из сторон будет выше, чем на другой, то есть, возникает неэквивалентность левой и правой сторон зародыша. При небольших отклонениях в начальных условиях реакции направление градиента может меняться на противоположное. Это значит, что порождение асимметрии в такой системе в значительной степени случайное (рандомизированное). Однако направление градиента морфогена может быть скорректировано с помощью механизма конверсии.

метрия. Клетки определенным образом поляризованы по отношению к средней линии. Предположим, что F-образная молекула ориентируется определенным образом по отношению к переднезадней и дорсовентральной осям. В реальности такое может быть, например, если определенный участок молекулы встраивается в мембрану клеток с вентральной стороны, и, кроме того, у молекулы есть домен, который связывается с фибриллами, ориентированными в передне-заднем направлении.

В этом случае билатеральная симметрия по отношению к центральной оси на уровне ориентации таких молекул теряется. Асимметричная ориентация F-образных молекул может затем спровоцировать изменения в биохимических и физиологических процессах — например, направить транспорт молекул в сторону средней линии на одной из сторон тела и от средней линии — на другой стороне. Авторы назвали такой гипотетический механизм потери билатеральной симметрии конверсией.

**Рандомизированное порождение асимметрии** (random generation of asymmetry). В той же статье

(Brown, Wolpert, 1990) авторы предположили, что конечным итогом потери симметрии должно быть различие в распределении определенных химических веществ между левой и правой сторонами тела. Браун и Вольперт применили выдвинутую в отношении морфогенеза дрозофилы в 1970х Кауфманом идею градиента морфогена (Kauffman et al., 1978). Если такой градиент распределится вдоль лево-правой оси и пересечет ось билатеральной симметрии, то зародыш разбивается на две зоны — с высоким уровнем морфогена (одна из сторон) и с низким уровнем (противоположная сторона) (рис. 1б).

Выбор того, на какой именно стороне концентрация будет высокая, а на какой — низкая, в такой модели случаен. Однако, небольшая степень асимметрии, возникшая в результате конверсии, может послужить триггером для правильной ориентации установления лево-правого градиента морфогена.

**Интерпретация (interpretation).** Интерпретацией Браун и Вольперт называют процесс, в ходе которого клетки меняют свои свойства в зависимо-

сти от полученной информации. После того, как устанавливаются различия между левой и правой стороной на молекулярном уровне, начинается процесс формирования различий на уровне морфологии. Стороны получаются разными, однако, как считали Браун и Вольперт, нельзя в таком случае говорить о доминировании одной стороны над другой.

**Модель Брауна–Вольперта и влияние генов на установление лево-правой асимметрии.** Некоторые авторы ставили под сомнение утверждение, что гены могут непосредственно влиять на установление лево-правой асимметрии тела (Morgan, 1977; Morgan, Corballis, 1978).

Браун и Вольперт считали, что такое влияние может осуществляться на уровне конверсии. Если представить себе два изомерических варианта F-образной молекулы, которые по-разному ориентируются относительно передне-задней оси, то мы получим “переворачивания конверсии” и изменение лево-правой асимметрии на противоположную. Более вероятно мутация, в ходе которой функция белка (F-образной молекулы) теряется. В таком случае следует ожидать рандомизацию в установлении симметрии (то есть оба варианта в равных соотношениях) либо отсутствие асимметрии.

Гены могут воздействовать на этот процесс также на уровне интерпретации и рандомизированного порождения асимметрии. Очень трудно представить, однако, что генетические нарушения на уровне интерпретации приведут к полному переворачиванию асимметрии. Скорее в таких случаях следует ожидать различные типы нарушений в установлении асимметрии. В случае нарушения механизма рандомизированного порождения асимметрии возможно отсутствие асимметрии либо рандомизация асимметрии.

#### ЭТАПЫ УСТАНОВЛЕНИЯ ЛЕВО-ПРАВОЙ АСИММЕТРИИ У МЫШИ. ПРИНЦИПАЛЬНАЯ СХЕМА

Мышь (*Mus musculus*) – основной модельный объект для изучения ранних процессов формирования лево-правой висцеральной асимметрии у млекопитающих. В ходе эмбрионального развития мышцы лево-правая асимметрия устанавливается примерно на стадии 8.25 dpc (дней индивидуального развития). На этой стадии зародыш выглядит просто (Norris, 2012): передняя часть с уже обозначенными головой и зачатком сердца, далее идет средняя часть с оформившейся хордой и задняя часть, заканчивающаяся структурой под названием гензеновский узелок. По сторонам от средней линии тела, вдоль которой протянулась хорда, располагаются структуры параксиальной мезодермы – ближе к хорде сомиты (из них разовьются потом мышцы, кости и дермальная часть

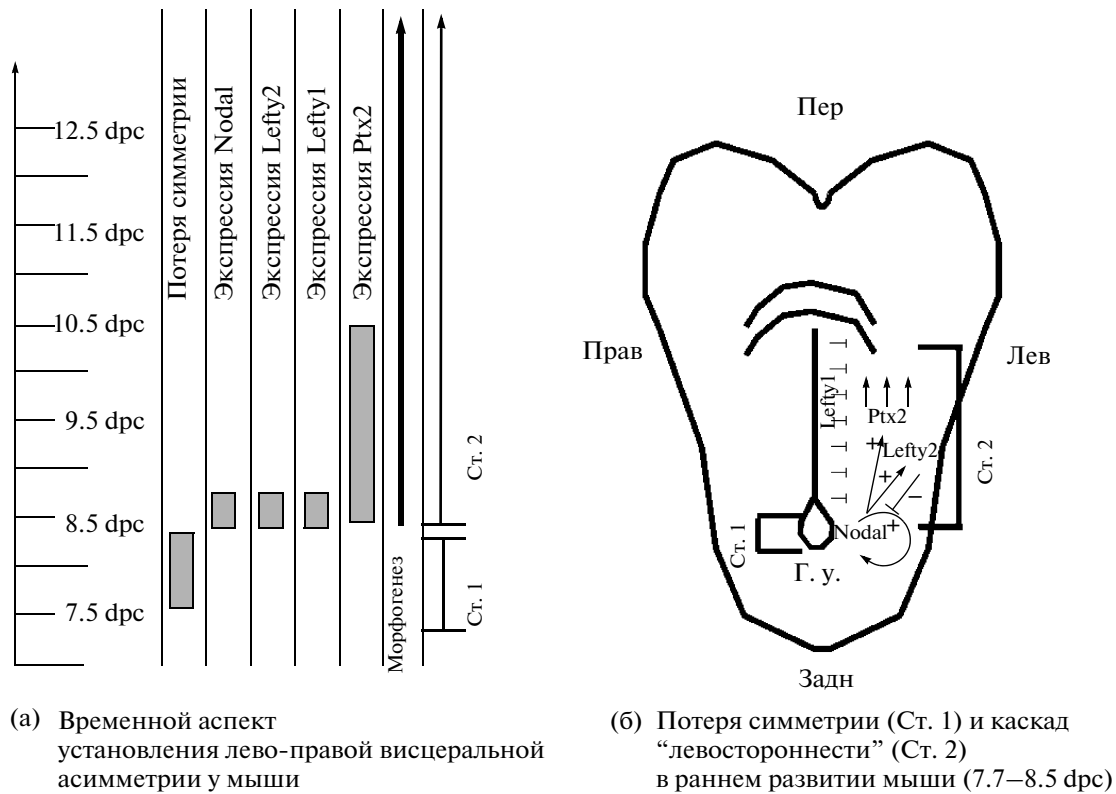
кожи), а вдоль краев идет мезодерма боковых пластинок, которая включится в состав парных внутренних органов (таких как, например, почки). Над мезодермальными структурами расположена эктодерма, а под ними – эндодерма.

Сильно огрубляя ситуацию, можно сказать, что процесс установления лево-правой асимметрии осуществляется, по крайней мере, в два этапа (Hamada et al., 2002; Shiratori, Hamada, 2006; Norris, 2012): сначала (примерно на стадиях 7.5–8.25 dpc) происходит потеря билатеральной симметрии и порождается лево-правая асимметрия, а затем включаются каскад генов с асимметричной экспрессией, что приводит к запуску нижестоящих генных каскадов, и в конечном итоге включаются гены, ответственные за морфологические перестройки, и образуются специфические морфологические структуры (рис. 2а, 2б).

**Потеря билатеральной симметрии.** В ходе первого этапа, который приходится примерно на 7.5–8.25 дней эмбрионального развития, изначально симметричная структура (эмбрион на ранней стадии развития) становится асимметричной, происходит нарушение зеркальной симметрии тела (Shiratori, Hamada, 2006). Генерируется сигнал, который стимулирует экспрессию определенных генов в левой части тела. В ходе второго этапа разворачивается каскад экспрессии специфических генов в левой стороне эмбриона, а затем эта асимметрия реализуется в строении конкретных морфологических структур (сердца, легких, кишечника). Каков конкретный механизм этого процесса, до конца непонятно. Большинство исследователей признает ведущую роль биения ресничек в области гензеновского узелка в этом процессе. На природе процессов, происходящих на стадии потери билатеральной симметрии, мы и постараемся сконцентрироваться в данной статье.

#### СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕРЕСТРОЙКИ

После того, как осуществилась потеря билатеральной симметрии, в мезодерме левой латеральной пластинки активируется экспрессия генов каскада Nodal-Ptx2 (рис. 2б). Поскольку эмбриологические эксперименты на млекопитающих ранних стадий эмбрионального развития затруднены, многие особенности сигнального каскада Nodal-Ptx2 были открыты в прямых экспериментах на куриных эмбрионах, а их основные выводы подтверждены затем в генетических экспериментах на мутантных линиях мышей. В норме Nodal экспрессируется у эмбрионов млекопитающих в мезодерме левой, но не правой, латеральной пластинки (Collignon et al., 1996).



**Рис. 2.** Принципиальная схема установления лево-правой асимметрии в развитии мыши. (а) Временной аспект. На первой стадии (Ст. 1, 7.5–8.25 дрс) происходит потеря билатеральной симметрии. События второй стадии (Ст. 2) начинаются примерно на 8.5 дрс, в ходе этой стадии происходит экспрессия генов каскада “левосторонности” и специфические морфогенетические перестройки. (б) Пространственно-морфологический аспект. Схематическое изображение эмбриона мыши примерно на 8.25–8.5 дрс, вид с вентральной стороны. События первой стадии, в ходе которой происходит потеря симметрии (Ст. 1) разворачиваются в гензеновском узелке (Г. у.). Экспрессия генов каскада “левосторонности”, с которой начинается вторая стадия (Ст. 2), происходит в мезодерме левой латеральной пластинки. Продукт гена *Nodal* активирует экспрессию самого себя и гена *Lefty 2*, а продукт гена *Lefty 2* ингибирует экспрессию *Nodal*. Паттерн экспрессии этих генов формируется в левой латеральной пластинке по реакционно-диффузионному механизму. Экспрессия *Lefty 1* (продукт которого тоже ингибирует экспрессию *Nodal*) вдоль средней линии тела ограничивает распространение этой реакции левой стороной зародыша и не дает перейти на правую. Продукт *Nodal* активирует также экспрессию гена *Ptx2*, продукт которого является ДНК-связывающим фактором и, в свою очередь, активирует комплекс генов, работа которых необходима для формирования морфологических структур левой стороны тела мыши.

У эмбрионов мутантных линий мышей с нарушениями установления лево-правой асимметрии его экспрессия может наблюдаться в тканях противоположной стороны тела (Lowe et al., 1996).

*Nodal* – представитель семейства Трансформирующих Ростовых Факторов (TGF-β). Функционирует он как димер, для его работы необходим кофактор – белок EGF-CFC. Продукт *Nodal* запускает сигнальные каскады через так называемые рецепторы первого типа *Alk4* и *Alk7* и через рецепторы второго типа *ActRIIa* и *ActRIIb*, активируя при этом транскрипционные факторы *Smad2*, *Smad4* и *Fast* (известный также как *Foxh1*) (Hamada 2002).

В клетках левой латеральной пластинки *Nodal* активирует экспрессию самого себя, экспрессию гена *Lefty2*, а также экспрессию гена *Ptx2* (Hamada, 2002; Norris, Robertson, 1999; Saijoh et al., 1999;

Saijoh et al., 2000; Adachi et al., 1999; Pedra et al., 1998). Продукт *Lefty2* – мономер, что необычно для представителей семейства TGF-β, экспрессия этого белка в эмбрионе мыши асимметрична, и он тоже экспрессируется в левой латеральной пластинке эмбриона (Meno et al., 1996; Meno et al. 1997).

Так как продукт гена *Lefty2* – мономер, он распространяется быстрее димера продукта *Nodal* (Sakuma et al., 2002; Muller et al., 2012; Marjoram et al., 2011), при этом белок-продукт гена *Lefty2* подавляет экспрессию гена *Nodal* (Meno et al., 2001).

Экспрессия как *Nodal*, так и *Lefty2* начинается на стадии 2–3 сомитов в небольшой части левой латеральной пластинки, примыкающей к гензеновскому узелку, паттерн экспрессии растет вдоль передне-задней оси. Экспрессия этих генов пре-

крашается на стадии 6–7 сомитов. Взаимодействие продуктов *Nodal* и *Lefty2* можно рассматривать как реакционно-диффузную систему на схеме активатор (*Nodal*)–ингибитор (*Lefty2*) (Saijoh et al., 2000), в ходе такой самоорганизации образуется устойчивый паттерн экспрессии гена *Nodal* в клетках левой латеральной пластинки.

*Lefty1* экспрессируется вдоль оси тела в левой части основания нервной трубки на тех же стадиях развития (Meno et al., 1997; Hamada et al., 2002). У эмбрионов линии мутантных по этому гену мышей наблюдаются дефекты в установлении лево-правой асимметрии, наиболее распространенным из которых является левосторонний изомеризм. Кроме того, у таких эмбрионов наблюдается билатеральная экспрессия *Nodal*, *Lefty-2*, *Ptx2* (Meno et al., 1998). Таким образом, можно считать, что экспрессия гена *Lefty1* играет роль дополнительного ограничителя экспрессии каскада *Nodal-Ptx2* в левой стороне эмбриона. Такой феномен получил название “срединного барьера”.

Экспрессия генов *Lefty1*, *Nodal* и *Lefty2* продолжается в течение примерно 6–8 часов. В отличие от этих генов, асимметричная экспрессия *Ptx2* в левой части тела эмбриона продолжается в течение двух суток и, кроме того, наблюдается корреляция между его экспрессией и установлением асимметричности органов (Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; Yoshioka et al., 1998).

Продукт этого гена является ДНК-связывающим фактором. Еще в конце 1990х была выдвинута гипотеза о том, что продукт гена *Ptx2* активирует определенные каскады генов, в результате работы которых сторона тела, в которой он экспрессируется, становится левой по морфологическим признакам (Ryan et al., 1998; Logan et al., 1998).

Согласно этой гипотезе, *Ptx2* инициирует работу генов, ответственных за установление лево-правой асимметрии, связываясь с регуляторными участками ДНК (промоторами и энхансерами) и активируя экспрессии нижестоящих в каскаде генов. Экспрессия этих нижестоящих генов влияет на морфологическую структуру левой части тела. Эта часть тела становится левосторонней по морфологическим критериям (например, сердце выдвигается в эту сторону, с этой стороны формируется (в случае мыши) одна крупная доля легких, а не четыре небольших доли, как с правой стороны).

Это значит, что для того, чтобы сторона тела стала левой по морфологическим признакам, необходима экспрессия генов каскада *Nodal-Ptx2*, связывание белка *Ptx2* с определенными участками ДНК и запуск экспрессии комплекса определенных (но пока не открытых) генов. Если этого каскада нет, то сторона будет правой. Упрощая ситуацию, можно сказать, что по умолчанию каж-

дая сторона тела имеет свойство стать правой (по морфологическим признакам), а, чтобы сделать ее левой, необходим сигнальный каскад “левосторонности” *Nodal-Ptx2*.

Гипотеза о главенствующей роли *Ptx2* в запуске специфического “левостороннего” морфогенеза доминирует и в настоящее время.

#### ВЕДУЩАЯ РОЛЬ БИЕНИЯ РЕСНИЧЕК ГЕНЗЕНОВСКОГО УЗЕЛКА В УСТАНОВЛЕНИИ ЛЕВО-ПРАВОЙ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ АСИММЕТРИИ

Гензеновский узелок – гомолог шпемановского организатора (дорсальной губы бластопора) у амфибий. Пересадка гензеновского узелка индуцирует у млекопитающих образование дополнительной оси тела (Beddington, 1994). Структура эта привлекает пристальное внимание эмбриологов. Гензеновский узелок у млекопитающих представляет из себя впадину, покрытую ресничками (Bellomo et al., 1996; Sulik et al., 1994).

О возможной связи между ресничками и установлением лево-правой асимметрии догадывались еще начиная с 1970х. Тогда исследование пациентов с синдромом Картагенера, при котором наблюдается инвертирование внутренних органов, показало, что у таких людей жгутики сперматозоидов теряют подвижность (Afzelius, 1976; Afzelius, 1995). У пациентов также не наблюдалось активности ресничек в дыхательных путях, они страдали синуситами и другими респираторными заболеваниями. Афзелиус, изучив сперму четырех пациентов с нарушением подвижности спермы под электронным микроскопом показал, что в микротрубочках жгутиков отсутствуют динеиновые ручки. К тому времени было известно, что реснички присутствуют в некоторых клетках эмбрионов млекопитающих. Сопоставив эти факты и зная, что при данном синдроме наблюдается инвертированное положение органов, Афзелиус выдвинул гипотезу о том, что реснички могут влиять на установление лево-правой асимметрии в эмбриональном развитии.

В 1990х американскими исследователями из группы Брюкнер было открыто, что мутация в гене лево-правого динеина (*left/right-dynein (Ird)*) может приводить к инвертированному положению внутренних органов у мышей с мутацией *iv* (Supp et al., 1997). Наблюдались аномалии в установлении лево-правой висцеральной асимметрии и при другой мутации в этом гене – *legless (lgl)*. Данное открытие явилось дополнительным аргументом в пользу гипотезы об участии микротрубочек в процессе установления лево-правой асимметрии, хотя сами авторы открытия говорили о такой возможности в осторожной форме, больше склоняясь к предположению о возможной роли

этого белка во внутриклеточном транспорте при установлении лево-правой асимметрии.

Клетки в вентральной части гензеновского узелка покрыты ресничками, направленными вонне от поверхности эмбриона. Эти реснички принадлежат к классу ресничек 9+0. Сначала считали, что реснички в области гензеновского узелка неподвижны, но потом группой японских исследователей было показано, что они бьются с частотой примерно 600 раз в минуту (Nonaka et al., 1998). Кроме того, с помощью метода генетического нок-аута авторы создали линию мышей *kif3B*—/— и изучили особенности биения ресничек у таких генномодифицированных мышей. Белок KIF3B входит в состав KIF3 комплекса, принимает участие во внутриклеточном транспорте и необходим для развития и нормального функционирования микротрубочек. Гетерозиготы *kif3B*—/— погибают примерно в середине срока беременности, у эмбрионов наблюдается при этом раздувание перикарда, замедление роста, незамыкание нервной трубки, а также рандомизация в установлении лево-правой асимметрии. Кроме того, паттерн экспрессии гена *Lefty-2* на стадии 8.5 dpc тоже нарушался — в норме этот ген экспрессируется в левой стороне тела, а в случае *kif3B*—/— эмбрионов его экспрессия либо отсутствовала, либо была билатеральной.

Было показано, что у эмбрионов *kif3B*—/—, в отличие от эмбрионов дикого типа, отсутствует биение ресничек. Наблюдая за траекториями движения флуоресцентных частиц, авторы открыли, что биение ресничек создает у эмбрионов дикого типа левосторонний ток жидкости, а у эмбрионов *kif3B*—/— такой ток жидкости отсутствовал. Поскольку гензеновский узелок по-английски называется *node*, такой ток жидкости получил название “nodal flow”. Авторы предположили тогда, что именно левосторонний ток жидкости в области гензеновского узелка и является причиной потери билатеральной симметрии.

Почему ток жидкости именно левосторонний? Первоначально авторы открытия тока (*nodal flow*) объяснили это физическими параметрами системы (реологические свойства жидкости, сила и траектория биения ресничек) и, в первую очередь, — каплевидной формой гензеновского узелка, суженного в передней части. Параметры системы таковы, считали они, что в суженной передней части гензеновского узелка ток жидкости правосторонний, а в расширенной задней части — левосторонний. Доказательством в пользу такой гипотезы авторы считали отсутствие левостороннего тока жидкости в гензеновском узелке на более поздних стадиях, когда он теряет каплевидную форму.

В начале 2000х Нонака и Ширатори (Nonaka et al., 2002) подтвердили гипотезу о ведущей роли левостороннего тока жидкости в процессе потери билатеральной симметрии с помощью прямого физического воздействия. Ученые создали уникальную камеру для культивирования мышечных эмбрионов, в которой можно искусственно менять направление и скорость циркуляции жидкости в гензеновском узелке. В исследовании использовали генно-модифицированные мыши линии *Ptx2-lacZ*, у эмбрионов таких мышей легко проследить экспрессию гена *Ptx2*, в норме экспрессирующегося в левой стороне тела и играющего важную роль в идентификации данной стороны как левой. Эмбрионов на стадиях 7.7–8.5 dpc в течение 12 часов подвергали одному из четырех режимов тока жидкости: левосторонний медленный, левосторонний быстрый, правосторонний медленный и правосторонний быстрый. Затем эмбрионов дополнительно инкубировали в течение 32 часов и оценивали их морфологию, часть из них инкубировали течение 10 часов и отслеживали экспрессию *Ptx2*.

В условиях режима быстрого левостороннего тока у эмбрионов наблюдалось нормальное установление лево-правой висцеральной асимметрии (правосторонняя сердечная петля, нормально ориентированный поворот эмбриона, экспрессия *Ptx2* в левой латеральной пластинке).

При режиме быстрого правостороннего тока, напротив, у большинства эмбрионов наблюдалось инвертированное формирование сердечной петли и инвертированный поворот, *Ptx2* экспрессировался в правой латеральной пластинке. Примечательно, что такой эффект наблюдался только при воздействии на до-сомитные стадии развития эмбрионов.

Медленный ток, как левосторонний, так и правосторонний, вызывал лишь незначительные аномалии в установлении лево-правой асимметрии эмбрионов.

#### *Почему ток жидкости левосторонний?*

К середине 2000х стало понятно, что левостороннее направление тока жидкости нельзя объяснить формой гензеновского узелка и тем, что жидкость возвращается вправо в его передней, зауженной части. Компьютерное моделирование показало (Cartwright et al., 2004), что несколько десятков вертикально ориентированных ресничек будут создавать десятки микровихреней, но не ламинарный поток.

Более корректные наблюдения Окады с соавторами (Okada et al., 2005) показали, что левосторонний ток, перпендикулярный оси тела, идет очень близко от поверхности покрывающей ген-

зеновский узелок жидкости, всего лишь в 5 микрометрах. Он достигает левой части тела, а затем жидкость возвращается назад вправо на уровне примерно 20 микрометров от поверхности, и такой правосторонний ток гораздо медленнее. В передней же, суженной части гензеновского узелка, тока жидкости не наблюдается — хотя у клеток этой части тоже есть реснички, но они не бьются.

Поняв, что дело не в каплевидной форме гензеновского узелка, авторы попытались разобраться подробнее в динамике биения ресничек. Высокоскоростная микросъемка показала, что ось биения ресничек не перпендикулярна поверхности, а почти параллельна ей и направлена назад.

Чтобы количественно оценить это явление, на основании материала записей многочисленных сверхскоростных видеосъемок авторы проанализировали особенности траектории, которую описывает кончик реснички, создав своего рода “усредненный портрет” реснички во время работы. Кончик реснички движется по кругу вокруг оси, расположенной под углом  $40^\circ \pm 10^\circ$  к поверхности и направленной назад под углом  $180^\circ \pm 40^\circ$ , ресничка при этом описывает конус с вершинным углом примерно  $40^\circ$ . Полученные данные позволили выдвинуть предположение, что не форма гензеновского узелка, а наклон осей биения ресничек под углом к поверхности приводит к созданию левостороннего тока жидкости. Биение ресничек идет по часовой стрелке, и наиболее сильный удар ресничка наносит, когда она почти вертикальна и близка к поверхности жидкости, покрывающей гензеновский узелок, это так называемый “эффективный удар”, как раз он-то и порождает быстрый левосторонний ток жидкости. Во второй половине цикла биения ресничка движется близко от поверхности клеток в правостороннем направлении, это так называемый “восстановительный удар”, который слабее и который создает более медленный правосторонний ток жидкости.

### ПЕРЕНОС ИНФОРМАЦИИ И АКТИВАЦИЯ КАСКАДА “ЛЕВОСТОРОННОСТИ”? ОСНОВНЫЕ ГИПОТЕЗЫ

Роль биения ресничек как ведущей силы процесса потери билатеральной симметрии у млекопитающих признается к настоящему времени большинством исследователей. Однако до сих пор нет единого понимания того, как ток жидкости в гензеновском узелке передает сигнал в ткани эмбриона и нет единого мнения о том, каков механизм запуска сигнального каскада левосторонности в левой стороне тела. На этот счет в настоящее время существует три гипотезы (рис. 3).

**Гипотеза переноса морфогена** исторически была первой (рис. 3а). Она высказана в 1990х груп-

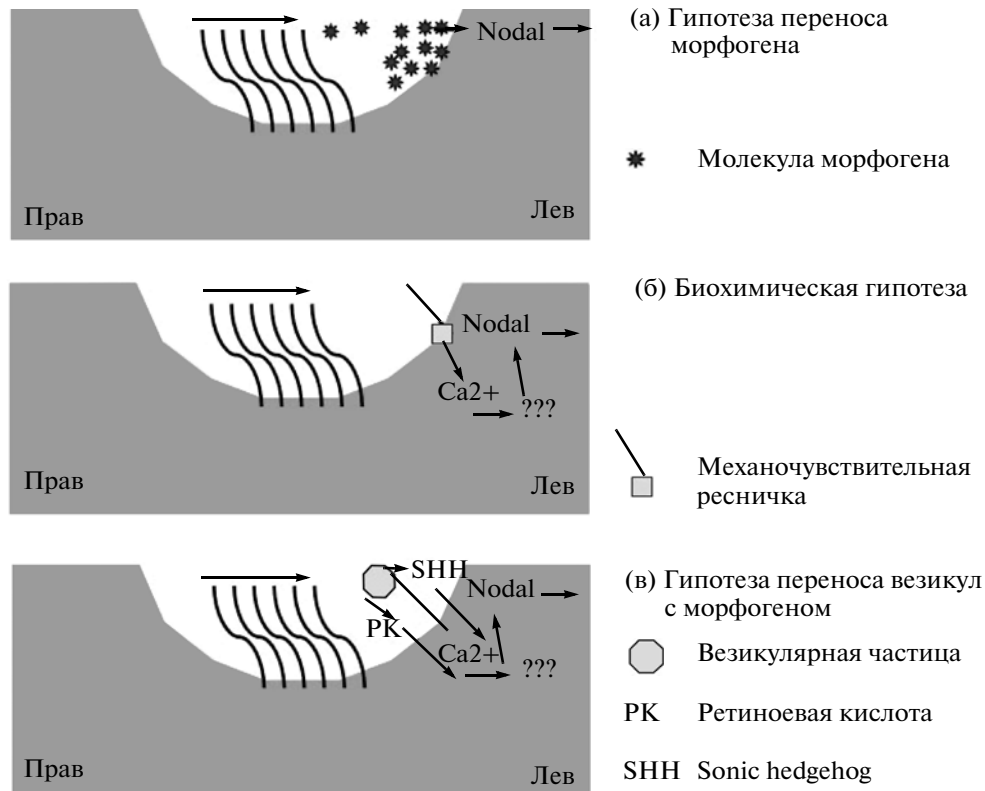
пой японских исследователей, показавших, что нарушения в установлении лево-правой асимметрии у эмбрионов, мутантных по гену KIF3B мышей, связаны с аномальным строением ресничек и отсутствием левостороннего тока жидкости в области гензеновского узелка (Nonaka et al., 1998). Авторы тогда предположили, что, благодаря создаваемому биением ресничек левостороннему току жидкости, в левой части гензеновского узелка увеличивается концентрация важной сигнальной молекулы, которая и запускает сигнальный каскад “левосторонности” в левой части тела эмбриона.

Возможности создания такого градиента морфогена в результате биения ресничек были показаны в работах по математическому моделированию (Cartwright et al., 2004). Точная природа данной сигнальной молекулы пока не известна. Экспериментальные исследования по изучению распределения молекул флуоресцентного полимера показали, что циркуляция жидкости в области гензеновского узелка как у мыши, так и у кролика может создать градиентное распределение для белковой молекулы размером порядка 40 килодальтон (Okada et al., 2005).

**“Гипотеза двух типов ресничек” или биомеханическая гипотеза.** В начале нулевых коллективом американских ученых под руководством Брюкнера была высказана альтернативная гипотеза — биомеханическая (рис. 3б), согласно которой реснички в области гензеновского узелка работают не только как генераторы механического сигнала (порождая левосторонний ток жидкости), но и как и его рецепторы, запуская затем процесс повышения концентрации ионов кальция в клетках левой стороны тела (McGrath et al., 2003).

Авторы создали генно-модифицированную линию мышей, у которых белок лево-правый динеин сшит с зеленым флуоресцентным белком, потому у таких мышей легко проследить за положением молекулы лево-правого динеина. Ранее было известно, что часть ресничек в области гензеновского узелка способна к биению, а другая часть неподвижна. Исследователи обнаружили, что есть две группы ресничек: расположенные в средней части гензеновского узелка и содержащие в своем составе лево-правый динеин и расположенные по периферии без лево-правого диненина (таких примерно треть от общего количества).

Как подвижные, так и неподвижные реснички содержат в своем составе белок polycystin-2, который выполняет функцию катионного канала. Известно, что реснички обладают механочувствительностью и что, если на ресничку подействовать механически, то в клетке происходит всплеск концентрации внутриклеточного кальция (Praetorius, Spring, 2001). Белок polycystin-2 является катионным каналом для двувалентных катионов,



**Рис. 3.** Три гипотезы механизма запуска каскада “левосторонности”. (а) Гипотеза переноса морфогена. Биение ресничек в области гензеновского узелка и порождаемый ими ток жидкости концентрируют молекулы морфогена в левой части гензеновского узелка. Высокая концентрация морфогена стимулирует экспрессию гена *Nodal* в левой части эмбриона. (б) Биомеханическая гипотеза (модель “двух типов ресничек”). Биение подвижных ресничек в средней части гензеновского узелка порождает левосторонний ток жидкости, а неподвижные реснички на периферии гензеновского узелка работают как механосенсоры. В ответ на механическое воздействие происходит открытие кальциевого канала, повышение концентрации внутриклеточного кальция и запуск неизвестных пока процессов, стимулирующих экспрессию гена *Nodal* в левой части эмбриона. (в) Гипотеза переноса везикул с морфогеном (“челночная модель”). Порождаемый биением ресничек левосторонний ток жидкости переносит везикулы, которые разбиваются, натываясь на неподвижные реснички, расположенные на периферии левой стороны гензеновского узелка. При нарушении целостности везикулы из нее выделяются сигнальные молекулы РК (ретиноевая кислота) и SHH (Sonic hedgehog). Эти молекулы стимулируют повышение внутриклеточного кальция, что, в свою очередь, запускают неизвестные пока процессы, приводящие к активации экспрессии гена *Nodal* в левой части эмбриона.

активируемый ионами кальция (Hanaoka et al., 2000; Gonzalez-Perret et al., 2001; Koulen et al., 2002) и, кроме того, это механо-чувствительный канал, который в ответ на механическое воздействие запускает повышение концентрации внутриклеточного кальция (Nauli et al., 2003). У зародышей линии мыши, у которых был проведен нок-аут гена *Pkd2*, развивается правосторонний изомеризм, то есть обе стороны тела морфологически становятся правыми (Pennekamp et al., 2002).

Авторы (McGrath et al., 2003) показали активацию внутриклеточного кальция в тканях левой половины нормальных эмбрионов как раз на стадиях, соответствующих этапу потери билатеральной симметрии. Этот паттерн был нарушен как у эмбрионов, мутантных по гену лево-правого ди-

ненина (всплеск внутриклеточного кальция наблюдался не только с левой, но и билатерально, либо отсутствовал вовсе), так и у эмбрионов линии мышей, у которых был проведен нок-аут гена *Pkd2* (у них всплеск внутриклеточного кальция вообще отсутствовал).

Получается, что для нормального развития лево-правой асимметрии важна не только способность ресничек производить левосторонний ток жидкости в области гензеновского узелка, но и их механочувствительная способность. Это заставляет нас совершенно в новом свете взглянуть на популяцию неподвижных, но содержащих *polycystin-2* ресничек — они работают как сенсоры.

На основании полученных данных авторы выдвинули гипотезу или модель “двух типов ресничек”, которую можно назвать также биомехани-



ческой гипотезой. Согласно этой гипотезе, подвижные, Ird-содержащие реснички генерируют ток жидкости в области гензеневского узелка, а неподвижные polycystin-2 содержащие реснички работают как механосенсоры; в результате рецепции механического сигнала открываются механочувствительные ионные каналы в клетках левой части эмбриона, происходит повышение концентрации внутриклеточного кальция, что в свою очередь запускает важные сигнальные процессы, приводящие к активации экспрессии ряда генов и, в частности, экспрессии генов *Nodal*, *Lefty-2* и *Ptx2* и запуска сигнального “каскада левосторонности”.

**Гипотеза переноса везикул с морфогеном или “челночная модель”.** Высказана в середине нулевых Танакой с соавторами (Tanaka et al., 2005), эта гипотеза была в какой-то степени реабилитацией идеи о градиенте морфогена в процессе установления лево-правой асимметрии млекопитающих (рис. 3в).

Пометив мембрану клеток с помощью прижизненной флуоресцентной краски и наблюдая поверхность клеток гензеневского узелка мыши на стадии 1–3 сомитов, авторы обнаружили, что под действием левосторонного тока жидкости передвигались липидные гранулы размером 0.3–5 микрометров, которые достигали левой стороны эмбриона. Авторы назвали такие липидные гранулы “везикулярными частицами гензеневского узелка” (*nodal vesicular parcels* или *NVPs*).

Если заблокировать рецепторы FGF-сигнализации, то блокируется и показанный в работах лаборатории Мартины Брюкнер всплеск концентрации внутриклеточного кальция. Образование липидных частиц при этом сильно замедляется, но обработка зародышей белком SHH (*Sonic hedgehog*) и ретиноевой кислотой восстанавливает скорость образования таких частиц. Примечательно, что обработка этими сигнальными молекулами зародышей после блокировки FGF-сигнализации восстанавливает феномен повышения внутриклеточного кальция в клетках левой части тела эмбриона. Более того, авторы продемонстрировали, что как SHH, так и ретиноевая кислота присутствуют в самих этих частицах!

У мутантных эмбрионов мышей линии *iv* с нарушением работы ресничек такие частицы образовывались, однако их движения влево не наблюдалось. На основании полученных данных авторы выдвинули модель, которую сами называли “челночной” (*shuttle-bus model*): липидные гранулы под действием левостороннего тока жидкости доставляют сигнальные молекулы SHH и ретиноевой кислоты в левую часть гензеневского узелка, там они наталкиваются на неподвижные реснички и разбиваются о них, при этом сигнальные мо-

лекулы выделяются в большой концентрации в левой части гензеневского узелка и индуцируют затем всплеск внутриклеточного кальция и сигнальные процессы, необходимые для запуска генов, отвечающих за “левосторонний морфогенез”. Остатки липидных частиц после доставки морфогенов к нужному месту встраиваются в клеточную мембрану и могут затем вновь использоваться для формирования везикулярных гранул.

### КАКАЯ ИЗ ГИПОТЕЗ НАИБОЛЕЕ ПРАВДОПОДОБНА?

Какая из трех вышеприведенных гипотез наиболее верна? Пока единого и окончательного мнения по данному вопросу нет. За ушедший год, однако, биомеханическая гипотеза получила серьезный аргумент – с помощью ряда тонких экспериментов на генно-модифицированных линиях мышей было показано, что, как и предполагали авторы “модели двух типов ресничек”, именно продукт гена *Pkd2* активирует запуск каскада левосторонности в краевых клетках гензеневского узелка, и что происходит этот запуск через кальциевую сигнализацию.

В недавнем исследовании Йошиба и его коллеги (Yoshida et al., 2012) попытались разобраться, каким образом клетки левой части гензеневского узелка ощущают ток жидкости (*nodal flow*). Они поставили ряд остроумных экспериментов на линии мышей, у которых был проведен нок-аут гена *Pkd2*. Сначала они внедрили векторную конструкцию с геном *Nodal* в клетки небольшого участка правой латеральной пластинки и показали, что экспрессия *Nodal* активировалась во всей латеральной пластинке. Этот результат доказывает, что клетки латеральной пластинки у линии мышей, у которых был проведен нок-аут гена *Pkd2*, обладают способностью к экспрессии *Nodal*.

С помощью методов генной инженерии исследователи создали три линии мышей, экспрессирующих *Pkd2* в определенных регионах зародыша. В трансгенной линии *Foxa2NNE-hsp-Pkd2-IRES-LacZ*, *Pkd2* экспрессируется по средней линии эмбриона включая гензеневский узелок. При скрещивании такой линии с мышами, у которых проведен нок-аут гена *Pkd2*, у потомков от скрещивания восстанавливается паттерн экспрессии *Nodal* и *Ptx2* в левой латеральной пластинке.

У второй трансгенной линии, *NDE-hsp-Pkd2-IRES-LacZ*, экспрессия *Pkd2* активировалась в краевых клетках гензеневского узелка, и при скрещивании мышей этой линии с мышами, у которых проведен нок-аут гена *Pkd2*, экспрессия *Nodal* и *Ptx2* в левой латеральной пластинке тоже восстанавливалась.

Наконец, у третьей линии генно-модифицированных мышей, dgFoxa2-hsp-Pkd2-IRES-LacZ, Pkd2 экспрессировался только в центральной части гензеневского узелка. Скрещивание таких мышей с мышами, у которых проведен нок-аут гена Pkd2, не приводило к восстановлению паттерна экспрессии Nodal и Ptx2. Это значит, что для инициирования паттерна экспрессии Nodal и Ptx2 необходимо присутствие продукта гена Pkd2 именно в краевых клетках гензеневского узелка. Авторы показали также, что в Pkd2-сигнализации в краевых клетках гензеневского узелка принимает участие продукт гена Cerl2.

Затем с помощью генно-модифицированной линии, у которой ген Pkd2 был сшит с геном сигнального белка Venus protein, было показано, что меченый Pkd2 локализуется в неподвижных ресничках краевых клеток гензеневского узелка.

В качестве модели для изучения запуска каскада левосторонних генов исследователи использовали линию генно-модифицированных мышей со встроенным энхансером гена Lefty1, сшитым с геном бета-лактозидазы; у эмбрионов таких мышей об активации генов каскада левосторонности можно судить по изменению окраски субстрата после расщепления его бета-галактозидазой.

В экспериментах по действию направленного (правостороннего и левостороннего) тока жидкости энхансер Lefty1 специфически активировался в той стороне тела, которая подвергалась действию тока жидкости у нормальных эмбрионов, но не у эмбрионов мышей, нок-аутных по Pkd2. Кроме того, паттерн активности этого энхансера нарушался при обработке зародышей веществами, влияющими на кальциевую сигнализацию — ионами  $Gd^{3+}$ , 2-аминоэтоксидифенилборатом и тапсигаргином. Это доказывает как ведущую роль механочувствительности через белок-продукт гена Pkd2 (polycystin-2), так и участие кальциевой сигнализации в активации каскада левосторонности.

В заключительной серии экспериментов авторы создали генно-модифицированных мышей, у которых реснички присутствовали только в краевых клетках гензеневского узелка. Для этого они использовали знание того факта, что для формирования ресничек необходима экспрессия гена Kif3a, который кодирует белок, участвующий во внутривесничном транспорте. У гомозиготных мышей линии, у которых был проведен нок-аут гена Kif3a, реснички в области гензеневского узелка не образуются. На этом фоне авторы заставили Kif3a экспрессироваться только в клетках периферии гензеневского узелка, и у эмбрионов таких мышей именно в этих клетках восстанавливались реснички.

Приложив искусственный ток жидкости, исследователи показали, что у таких эмбрионов происходит активация каскада левосторонности в левой части эмбриона в случае левостороннего тока и в правой части эмбриона в случае правостороннего тока.

Таким образом, основные положения “модели двух типов ресничек”, высказанные группой Мартини Брюкнер: сенсорная роль ресничек в краевой области гензеневского узелка и участие в этом Pkd2 и кальциевой сигнализации, блестяще подтвердились в данном исследовании. Идеи о возможной роли механических факторов в раннем морфогенезе позвоночных выдвигались Белоусовым еще в 1970е годы (Belousov et al., 1975) и получают все большее признание в наше время (Belousov et al., 2006; Keller, 2006; Davidson, Keller, 2007).

*Для потери билатеральной симметрии достаточно всего двух бьющих ресничек*

Еще одним из сильных аргументов в пользу биомеханической теории было открытие лабораторией Хамада того факта, что для установления лево-правой асимметрии достаточно, чтобы билилось всего две реснички (Shinohara et al., 2012), а для того, чтобы принять сигнал достаточно лишь нескольких ресничек-реципиентов. В своем исследовании японские ученые использовали нетоксичный вязкий раствор метилцеллюлозы и показали с помощью анализа траекторий движущихся частиц, что все реснички перестают биться при концентрации метилцеллюлозы в 1%, а при ее концентрации в 0.5% лишь часть из них продолжает биться, однако, при этом сохраняется, хотя и ослабленный, ток жидкости в области гензеневского узелка.

У зародышей после такой обработки, тем не менее, сохранялся левосторонний паттерн экспрессии Ptx2 (об экспрессии этого гена судили с помощью генно-модифицированных мышей, у которых энхансер гена Ptx2 был сшит с геном бета-галактозидазы).

Это открытие заинтриговало исследователей, и они попытались оценить минимальное количество ресничек, необходимое для инициации лево-правой асимметрии. При внимательном скрининге мутантных линий они выяснили, что у некоторых эмбрионов линий *dpcd* и *rfx3* в области гензеневского узелка бьются всего несколько ресничек. Авторы изучали биение ресничек у отдельных эмбрионов поштучно, а затем оценивали у каждого индивидуально экспрессию генов Cerl2 и Ptx2. Ученые показали, что для установления асимметричного паттерна экспрессии этих генов достаточно биения всего 2х ресничек.

Это хотя и не прямой, но тоже аргумент в пользу биомеханической модели, так как теоретические расчеты показывают, что для создания градиента сигнальных молекул необходим более сильный ток, чем тот, что порождают две бьющиеся реснички. Кроме того, у таких зародышей было сильно снижено и число неподвижных ресничек, расположенных в краевой области гензеновского узелка. Это значит, что установление лево-правой асимметрии необходимо всего несколько ресничек как для создания тока жидкости, так и для приема сигнала.

#### *Насколько консервативен такой механизм?*

Хотя еще в 2002 году выдвигались предположения о том, что биение ресничек и ток жидкости может быть ведущим механизмом порождения лево-правой асимметрии других групп позвоночных животных (Essner et al., 2002), до середины 2000х большинство исследователей лево-правой асимметрии позвоночных считало, что механизм инициации лево-правой асимметрии через биение ресничек и создание левостороннего тока жидкости уникален для млекопитающих.

Однако уже в 2005 году появляется работа Эсснера и его американских коллег (Essner et al., 2005), в которой было показано, что в купферовом пузырьке рыбы-зебры (*Danio rerio*), так же как в гензеновском узелке млекопитающих, происходит биение ресничек, и что реснички эти необходимы для нормального установления лево-правой асимметрии.

Во-первых, американские исследователи продемонстрировали, что ген лево-правого динеина *Lrd* экспрессируется в клетках купферовского пузырька, имеющих реснички. Кроме того, сняв движение микрочастиц в области купферовского пузырька и проанализировав их траектории, исследователи показали, что биение ресничек создает левосторонний поток жидкости, подобно тому как это организовано и у млекопитающих. Данные результаты заставили Эсснера предположить, что функция ресничек у рыб похожа на ту, что они играют у млекопитающих, и что они играют ведущую роль в инициации лево-правой асимметрии.

Используя тонкий луч лазера, исследователи научились аккуратно срезать реснички с клеток, из которых формируют купферовский пузырек непосредственно перед началом формирования этой структуры. Более чем у 80% эмбрионов после такой процедуры наблюдались дефекты в формировании лево-правой асимметрии. Обработка развивающихся эмбрионов с помощью блокирующих синтез лево-правого диненина морфолина приводит как к ослаблению и даже исчезновению потока жидкости, так и к аномали-

ям в установлении лево-правой асимметрии и, в частности, к аномалиям сердечного поворота и в экспрессии генов *lft2* и *lft1*. Эти результаты убедительно доказали, что не только у млекопитающих, но и у представителей другого класса позвоночных — рыб, биение ресничек необходимо для установления лево-правой асимметрии.

Роль биения ресничек в раннем развитии амфибий была открыта еще через несколько лет. Этот феномен не так просто наблюдать у амфибий, так как бьются реснички клеток крыши гастроцеля, то есть и биение ресничек и порождаемый ими ток спрятаны внутри эмбриона. Крышу гастроцеля амфибий образуют свернувшиеся клетки шпемановского организатора амфибий — гомолога гензеновского узелка млекопитающих.

Наблюдая над дорсальными эксплантатами крыши гастроцеля зародышей ксенопуса (*Xenopus laevis*), Блум и его немецкие коллеги с помощью прижизненной микровидеосъемки показали, что реснички бьются в этой области и порождают левосторонний ток жидкости (Schweickert et al., 2007; Blum et al., 2009). Реснички начинают появляться в клетках этого региона зародыша на стадии 14, достигают своего максимума в 250–270 ресничек на стадии 16, а на стадии 20 исчезают. Большая часть ресничек, как и у эмбрионов мыши, ориентирована назад. В этих клетках присутствует лево-правый диненин и ионный канал *polycystin-2*, играющие важную роль в установлении лево-правой асимметрии у млекопитающих.

С помощью анализа траекторий микрочастиц была получена информация о направлении тока жидкости. На стадии 14 наблюдалось только броуновское движение. Ощутимый левосторонний ток появляется на стадиях 15–16, на стадиях 17–18 он достигает максимума, а к стадии 20 сильно слабеет и затем исчезает.

Примечательно, что и у мыши и у ксенопуса почти совпадают как длина ресничек (5 микрометров), так и их количество (200–300 у мыши (Shiratori, Hamada, 2006; Nonaka et al., 1998) и 240–270 у *Xenopus* (Schweickert et al., 2007)).

Вкалывание раствора метилцеллюлозы высокой вязкости на стадиях 14–18 приводило к высокой степени аномалий установления лево-правой асимметрии у зародышей и нарушениям в паттернах экспрессии генов *Nodal* и *Ptx2*. Вкалывание раствора метилцеллюлозы на стадиях 19–20 также приводило к аномалиям в установлении лево-правой асимметрии, но лишь в небольшой степени. Результаты свидетельствуют о том, что порождаемый биением ресничек левосторонний ток жидкости в крыше гастроцеля необходим для запуска левостороннего каскада *Nodal-Ptx2* в левой боковой пластинке и для корректного установления лево-правой асимметрии у амфибий.

Открытие биения ресничек и левостороннего тока не только у млекопитающих, но и у рыб и амфибий позволяет выдвинуть гипотезу о том, что такой механизм слома симметрии возник у позвоночных давно и довольно широко распространен (Blum et al., 2009).

### ОТКРЫТЫЕ ВОПРОСЫ МОДЕЛИ

Наиболее адекватной моделью установления лево-правой асимметрии у млекопитающих, на наш взгляд, представляется 4х этапная схема лево-правого асимметричного морфогенеза, предложенная Хамада с соавторами (Hamada et al., 2002).

Авторы данной модели выделяют четыре стадии:

Стадия 1. Потеря билатеральной симметрии и порождение лево-правой асимметрии. Биение ресничек в области гензеновского узелка, ток жидкости (nodal flow).

Стадия 2. Перенос сигнала. В ходе этой стадии сигнал передается из области гензеновского узелка в мезодерму левой боковой пластинки.

Стадия 3. Каскад с участием генов Nodal и Lefty2 в левой боковой пластинке. Активация экспрессии Ptx2.

Стадия 4. Асимметричный морфогенез. Формирование сердца и поворот сердечной трубки, формирование разных долей сердца, асимметричная регрессия симметричных структур, формирование асимметричных легких и пищеварительной системы.

Идея о ведущей роли биения ресничек в слома симметрии и установлении лево-правой асимметрии у млекопитающих в настоящее время наиболее популярна. За прошедшие с открытия в 1998 году тока жидкости в области гензеновского узелка (nodal flow) сделан большой прогресс в изучении механизма потери симметрии и установлении лево-правой асимметрии, однако до сих пор остаются огромные пробелы в нашем понимании этого феномена. Как уже упоминалось, недавно в работах лаборатории Хамады было убедительно показано, что механический сигнал передается с помощью кальциевого канала polycystin-2 и что при этом повышается внутриклеточный кальций, однако до сих пор неясно, как именно кальциевый каскад запускает экспрессию гена Nodal (Yoshida et al., 2012).

Непонятно, что именно происходит на последнем, заключительном этапе и каким образом экспрессия Ptx2 направляет левосторонний морфогенез.

Не так все однозначно и с исключительностью роли Nodal в запуске экспрессии Ptx2. В работах лаборатории Бхаттачарья с линией мышей, мутантных по гену Cited2 (Vamforth et al., 2004), было показано, что у эмбрионов таких мышей тоже развиваются серьезные аномалии в установлении

лево-правой асимметрии, теряется экспрессия Ptx2 и Nodal в левой латеральной пластинке. Результаты позволяют предположить, что продукт этого гена либо запускает сигнальный каскад Nodal-Ptx2, либо в значительной степени перекрывается с этим каскадом. Кроме того, Ptx2 не влияет на левостороннее позиционирование сердца (Liu et al., 2001), что говорит о том, что этот процесс должен контролироваться другим сигнальным каскадом, запускаемым Nodal.

Высказываются аргументы и в пользу существования независимого от Nodal каскада контроля над установлением левостороннего морфогенеза. В работе группы Норриса было показано, что ген Ablim1 экспрессируется в мезодерме левой, но не правой латеральной пластинки, причем как в присутствии, так и в отсутствие экспрессии гена Nodal (Stevens et al., 2010).

Косвенным доказательством того, что могут существовать и другие сигнальные пути, ответственные за установление лево-правой асимметрии у млекопитающих, является открытие в ходе рецессивного скрининга группы мутантных линий мышей *gasp* (6 мутантных линий *gpg 1–6*), у эмбрионов которых нарушено не только установление лево-правой висцеральной асимметрии, но также развитие мозга (экзенцефалия) и конечностей (полидактилия) (Ermaikov et al., 2009). Такой результат позволяет предположить существование сигнального каскада, влияющего не только на формирование лево-правой асимметрии, но и на организацию мозга и конечностей.

Установление лево-правой асимметрии млекопитающих – сложно организованный биологический морфогенез, в котором тончайшим образом сочетаются биохимические и морфогенетические процессы. Этот процесс до сих пор плохо понятен. Для более полного понимания механизмов установления лево-правой асимметрии у млекопитающих необходимо объединение усилий не только эмбриологов и генетиков, но и биофизиков, математиков, механиков, реологов, структурных биохимиков, кристаллографов и специалистов по компьютерному моделированию. Изучение этого морфогенеза – замечательный пример того, насколько тесно генетика и молекулярная биология могут смыкаться с механикой молекулярных машин, непосредственно участвующих в построении морфологических структур.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adachi H., Saijoh Y., Mochida K., et al. Determination of left/right asymmetric expression of nodal by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a lefty-2 enhancer // *Genes Dev.* 1999. V. 13. № 12. P. 1589–600.

- Afzelius B.A.* A human syndrome caused by immotile cilia // *Science*. 1976. V. 193. № 4250. P. 317–319.
- Afzelius B.A.* Situs inversus and ciliary abnormalities: what is the connection? // *Int. J. Dev. Biol.* 1995. V. 39. № 5. P. 839–844.
- Bamforth S.D., Braganca J., Farthing C.R. et al.* Cited2 controls left-right patterning and heart development through a Nodal-Pitx2c pathway // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. № 11. P. 1189–1196.
- Beddington R.* Induction of a second neural axis by the mouse node // *Development*. 1994. V. 120. № 3. P. 613–620.
- Bellomo D., Lander A., Harragan I. et al.* Cell proliferation in mammalian gastrulation: the ventral node and notochord are relatively quiescent // *Dev. Dyn.* 1996. V. 205. № 4. P. 471–485.
- Belousov L.V., Dorfman J.G., Cherdantzev V.G.* Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1975. V. 34. № 3. P. 559–574.
- Belousov L.V., Luchinskaya N.N., Ermakov A.S., et al.* Gastrulation in amphibian embryos, regarded as a succession of biomechanical feedback events // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. V. 50. № 2–3. P. 113–122.
- Blum M., Beyer T., Weber T., et al.* *Xenopus*, an ideal model system to study vertebrate left-right asymmetry // *Dev. Dyn.* 2009. V. 238. № 6. P. 1215–1225.
- Brown N., Lewis Wolpert L.* The development of handedness in left/right asymmetry // *Development*. 1990. V. 109. № 1. P. 1–9.
- Burdine R., Schier A.* Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation // *Genes Dev.* 2000. V. 14. № 7. P. 763–776.
- Burn J.* Disturbance of morphological laterality in humans // *CIBA Found Symp.* 1991. V. 162. P. 282–296.
- Cartwright J.H., Piro O., Tuval I.* Fluid-dynamical basis of the embryonic development of left-right asymmetry in vertebrates // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 19. P. 7234–7239.
- Casey B., Hackett B.P.* Left-right axis malformations in man and mouse // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000. V. 10. № 3. P. 257–261.
- Collignon J., Varlet I., Robertson E.J.* Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning // *Nature*. 1996. V. 381. № 6578. P. 155–158.
- Davidson L., Keller R.* Measuring mechanical properties of embryos and embryonic tissues // *Methods. Cell Biol.* 2007. V. 83. P. 425–439.
- Ermakov A., Stevens J.L., Whitehill E. et al.* Mouse mutagenesis identifies novel roles for left-right patterning genes in pulmonary, craniofacial, ocular, and limb development // *Developmental Dynamics*. 2009. V. 238. № 3. P. 581–594.
- Essner J.J., Vogan K.J., Wagner M.K. et al.* Conserved function for embryonic nodal cilia // *Nature*. 2002. V. 418. № 6893. P. 37–38.
- Essner J.J., Amack J.D., Nyholm M.K. et al.* Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut // *Development*. 2005. V. 132. № 6. P. 1247–1260.
- González-Perrett S., Kim K., Ibarra C. et al.* Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 3. P. 1182–1187.
- Hamada H., Meno C., Watanabe D. et al.* Establishment of vertebrate left-right asymmetry // *Nature Reviews Genetics*. 2002. V. 3. № 2. P. 103–113.
- Hanaoka K., Qian F., Boletta A., Bhunia A.K. et al.* Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents // *Nature*. 2000. V. 408. № 6815. P. 990–994.
- Kauffman S.A., Shymko R. and Trabert K.* Control of sequential compartment formation in *Drosophila* // *Science*. 1978. V. 199. № 4326. P. 259–270.
- Kaufman M., Bard B.* *The Anatomical Basis of Mouse Development*. San Diego: Academic Press., 1999. 291 p.
- Keller R.* Mechanisms of elongation in embryogenesis // *Development*. 2006. V. 133. № 12. P. 2291–2302.
- Koulen P., Cai Y., Geng L. et al.* Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel // *Nat. Cell Biol.* 2002. V. 4. № 3. P. 191–197.
- Levin M.* Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review // *Mechanisms of Development*. 2005. V. 122. № 1. P. 3–25.
- Levin M.* The Embryonic Origins of Left-Right Asymmetry // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 2004. V. 15. № 4. P. 197–206.
- Logan M., Pagan-Westphal S.M., Smith D.M. et al.* The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals // *Cell*. 1998. Vol. 94. № 3. P. 307–317.
- Liu C., Liu W., Lu M.F., Brown N.A., Martin J.F.* Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity // *Development*. 2001. V. 128. № 11. P. 2039–2048.
- Lowe L.A., Supp D.M., Sampath K. et al.* Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus // *Nature*. 1996. V. 381. № 6578. P. 158–161.
- Marjoram L., Wright C.* Rapid differential transport of Nodal and Lefty on sulfated proteoglycan-rich extracellular matrix regulates left-right asymmetry in *Xenopus* // *Development*. 2011. V. 138. № 3. P. 475–485.
- McGrath J., Somlo S., Makova S. et al.* Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse // *Cell*. V. 114. № 1. P. 61–73.
- Meno C., Saijoh Y., Fujii H. et al.* Left-right asymmetric expression of the TGFβ-family member lefty in mouse embryos // *Nature*. 1996. V. 381. № 6578. P. 151–155.
- Meno C., Ito Y., Saijoh Y. et al.* Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, lefty-1 and lefty-2: their distinct expression domains, chromosomal link-

- age and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos // *Genes Cells*. 1997. V. 2. № 8. P. 513–524.
- Meno C., Shimono A., Saijoh Y. et al. Lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal // *Cell*. 1998. V. 94. № 3. P. 287–297.
- Meno C., Takeuchi J., Sakuma R. et al. Diffusion of nodal signaling activity in the absence of the feedback inhibitor Lefty2 // *Dev. Cell*. 2001. V. 1. № 1. P. 127–138.
- Mercola M., Levin M. Left-right asymmetry determination in vertebrates // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001. V. 17. P. 779–805.
- Mercola M. Left-right asymmetry: Nodal points // *Journal of Cell Science*. 2003. V. 116. № 16. P. 3251–3257.
- Morgan M.J. Embryology and inheritance of asymmetry. In *Lateralization in the Nervous System* (ed. S.R. Hardnad, et al.). New York: Academic Press. 1977. P. 173–194.
- Morgan M.J., Corbalius M.C. On the biological basis of human laterality II. The mechanism of inheritance // *Behav. Brain Sci.* 1978. V. 1. № 2. P. 270–277.
- Muller P., Rogers K.W., Jordan B.M. et al. Differential diffusivity of Nodal and Lefty underlies a reaction-diffusion patterning system // *Science*. 2012. V. 336. № 6082. P. 721–724.
- Nauli S.M., Alenghat F.J., Luo Y. et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. № 2. P. 129–137.
- Neville A.C. *Animal Asymmetry*, The Institute of Biology's Studies in Biology. No. 67. London: Arnold, 1976. 60 p.
- Nonaka S., Tanaka Y., Okada Y. et al. Randomization of left–right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein // *Cell*. 1998. V. 95. № 6. P. 829–837.
- Nonaka S., Shiratori H., Saijoh Y. et al. Determination of left–right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow // *Nature*. 2002. V. 418. № 6893. P. 96–99.
- Norris D.P. Cilia, calcium and the basis of left-right asymmetry // *BMC Biology*. 2012. V. 10. № 102. P. 1–8.
- Norris, D.P., Robertson E.J. Asymmetric and nodespecific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements // *Genes Dev.* 1999. V. 13. № 12. P. 1575–1588.
- Okada Y., Takeda S., Tanaka Y. et al. Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination // *Cell*. 2005. V. 121. № 4. P. 633–644.
- Pasteur L. *Researches on molecular asymmetry*. Alembic Club Reprint. Vol. 14. Edinburgh, Livingstone, 1948. 46 p.
- Pennekamp P., Karcher C., Fischer A. et al. The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. № 11. P. 938–943.
- Piedra M.E., Icardo J.M., Albajar M. et al. Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry // *Cell*. 1998. V. 94. № 3. P. 319–324.
- Praetorius H.A., Spring K.R. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium // *J. Membr. Biol.* 2001. V. 184. № 1. P. 71–79.
- Raya A., Izpisua Belmonte J.C. Left-right asymmetry in the vertebrate embryo: from early information to higher-level integration // *Nat. Rev. Genet.* 2006. V. 7. № 4. P. 283–293.
- Ryan A.K., Blumberg B., Rodriguez-Esteban C. et al. Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates // *Nature*. 1998. V. 394. № 6693. P. 545–551.
- Saijoh Y., Adachi H., Mochida K. et al. Distinct transcriptional regulatory mechanisms underlie left–right asymmetric expression of lefty-1 and lefty-2 // *Genes Dev.* 1999. V. 13. № 3. P. 259–269.
- Saijoh Y., Adachi H., Sakuma R. et al. Left-right asymmetric expression of lefty2 and nodal is induced by a signaling pathway that includes the transcription factor FAST2 // *Mol. Cell*. 2000. V. 5. № 1. P. 35–47.
- Sakuma R., Ohnishi Y., Meno C. et al. Inhibition of by Lefty mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion // *Genes Cells*. 2002. V. 7. № 4. P. 401–412.
- Shinohara K., Kawasumi A., Takamatsu A. et al. Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. № 622. P. 1–8.
- Shiratori H., Hamada H. The left-right axis in the mouse: from origin to morphology // *Development*. 2006. V. 133. № 11. P. 2095–2104.
- Sulik K., Dehart D.B., Inagaki T. et al. Morphogenesis of the murine node and notochordal plate // *Dev. Dyn.* 1994. V. 201. № 3. P. 260–278.
- Supp D.M., Witte D.P., Potter S.S. et al. Mutation of an axonemal dynein affects left–right asymmetry in inversus viscerum mice // *Nature*. 1997. V. 389. № 6654. P. 963–966.
- Schweickert A., Weber T., Beyer T. et al. Cilia driven leftward flow determines laterality in *Xenopus* // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 1. P. 60–66.
- Stevens J., Ermakov A., Braganca J. et al. Analysis of the asymmetrically expressed Ablim1 locus reveals existence of a lateral plate Nodal-independent left sided signal and an early, left-right independent role for nodal flow // *BMC Dev. Biol.* 2010. V. 10. № 54. P. 1–12.
- Tanaka Y., Okada Y., Hirokawa N. FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination // *Nature*. 2005. V. 435. № 7039. P. 172–177.
- Yoshida S., Shiratori H., Kuo I.Y. et al. Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2 // *Science*. 2012. V. 338. № 6104. P. 226–231.
- Yoshioka H., Meno C., Koshiba K. et al. Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry // *Cell*. 1998. V. 94. № 3. P. 299–305.

## Establishment of Visceral Left–Right Asymmetry in Mammals: The Role of Ciliary Action and Leftward Fluid Flow in the Region of Hensen’s Node

A. S. Ermakov

*Université Montpellier 1, 5 bd Henri IV, CS 19044 34967 Montpellier Cedex 2 France*

*e-mail: ermakov99@mail.ru*

Received March 19, 2013; in final form, April 17, 2013

**Abstract**—During individual development of vertebrates, the anteroposterior, dorsoventral, and left–right axes of the body are established. Although the vertebrates are bilaterally symmetric outside, their internal structure is asymmetric. Of special interest is the insight into establishment of visceral left–right asymmetry in mammals, since it has not only basic but also an applied medical significance. As early as 1976, it was hypothesized that the ciliary action could be associated with the establishment of left–right asymmetry in mammals. Currently, the majority of researchers agree that the ciliary action in the region of Hensen’s node and the resulting leftward laminar fluid flow play a key role in the loss of bilateral symmetry and triggering of expression of the genes constituting the Nodal–Ptx2 signaling cascade, specific of the left side of the embryo. The particular mechanism underlying this phenomenon is still insufficiently clear. There are three competing standpoints on how leftward fluid flow induces expression of several genes in the left side of the embryo. The morphogen gradient hypothesis postulates that the leftward flow creates a high concentration of a signaling biomolecule in the left side of Hensen’s node, which, in turn, stimulates triggering of gene expression of the Nodal–Ptx2 cascade. The biomechanical hypothesis (or two-cilia model) states that the immotile cilia located in the periphery of Hensen’s node act as mechanosensors, activate mechanosensory ion channels, and trigger calcium signaling in the left side of the embryo. Finally, the “shuttle-bus model” holds that leftward fluid flow carries the lipid vesicles, which are crashed when colliding immotile cilia in the periphery of Hensen’s node to release the contained signaling biomolecules. It is also noteworthy that the association between the ciliary action and establishment of asymmetry has been recently discovered in representatives of the lower invertebrates. In this paper, the author considers evolution of concepts on the mechanisms underlying establishment of visceral left–right asymmetry since 1976 until the present and critically reexamines the current concepts in this field of science. According to the author, serious arguments favoring the biomechanical hypothesis for determination of left–right asymmetry in mammals have been obtained.

**Keywords:** left–right asymmetry, morphogenesis, mouse, cilia, mammalian embryology, biomechanics, Nodal, Ptx2, Lefty-1, Lefty-2

УДК 591

## ОБ ОДНОЙ УСТАРЕВШЕЙ ТРАДИЦИИ: СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ГАСТРУЛЯЦИЯ У ГУБОК?

© 2013 г. А. К. Дондуа, Р. П. Костюченко

Санкт-Петербургский государственный университет

199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: akdondua@mail.ru

Поступила в редакцию 26.02.13 г.

Окончательный вариант получен 04.04.13 г.

Анализ сравнительно-эмбриологических и молекулярно-биологических данных приводит к заключению, что в процессе эволюции животных у предков современных губок и эуметазоа первоначально возникли универсальные базовые механизмы морфогенеза, которые послужили основой различной эволюции индивидуального развития в линии Parazoa и Eumetazoa. У первых морфогенез в раннем эмбриогенезе имел своим итогом формирование водоносной системы как средства улавливания и доставки пищевых частиц в различные части животного. У вторых морфогенетические движения приобрели характер гастрюляции, в ходе которой формировались зародышевые листки и пищеварительная система. Морфогенетические движения клеток у Metazoa возникли независимо от процессов клеточной спецификации. Они первичны сравнительно с клеточной дифференциацией. Не наличие зародышевых листков, но сходство механизмов морфогенеза лежит в основе единства всех Metazoa.

**Ключевые слова:** гастрюляция, зародышевые листки, морфогенез, эволюция, Parazoa, Metazoa, губки, книдарии, Wnt-сигналинг.

DOI: 10.7868/S0475145013050029

Самодостаточность науки о развитии зародышей, проблемы которой волновали естествоиспытателей с античных времен, была, по-видимому, осознана в 1840-е годы после выхода в свет работ К.М. Бэра, очертивших круг вопросов, которые встают перед исследователями, пытающимися понять закономерности индивидуального развития животных. Сам термин “эмбриология”, в научном обиходе впервые появился, вероятно, в 1842 году в статье Карла Фогта “*Embryologie des salmons*”, которая была опубликована в “Естественной истории рыб пресных вод Европы” под редакцией Л. Агасица (С. Vogt, 1842). К этому времени Х. Пандером и К. Бэрмом было разработано учение о зародышевых листках, которое стало краеугольным камнем сравнительной эмбриологии. Выяснилось, что по завершении дробления и формировании бластулы у животных образуются обособленные в пространстве клеточные территории – зародышевые листки. Карл Бэр считал, что зародышевые листки – универсальные структуры, которые возникают на ранних этапах эмбриогенеза всех позвоночных животных. Позднее Александр Ковалевский (1871) показал, что формирование зародышевых листков является общим свойством эмбрионального раз-

вития всех многоклеточных животных, включая беспозвоночных. Гомологичные и универсальные для всех Eumetazoa зародышевые листки получили наименование эктодермы и энтодермы. Эти термины первоначально были использованы для описания анатомии взрослых Стрекающих (Allman, 1853). Принятая ныне номенклатура листков – эктодерма, энтодерма и мезодерма – прочно вошла в эмбриологическую литературу вместе с теорией гастреи Э. Геккеля (Е. Haeckel, 1874), чему способствовал видный английский зоолог Рей Ланкестер (Е. Ray Lankester, 1876 по: Beetschen, 2001).

Важным этапом развития учения о зародышевых листках было установление принципа специфичности, согласно которому каждый зародышевый листок у разных животных дает одинаковый круг производных. Наружный листок, или эктодерма является источником покровной и нервной ткани. Внутренний листок, или энтодерма дает пищеварительную систему. У трехслойных животных кроме этих двух зачатков имеется еще и средний листок, или мезодерма из которой образуется мускулатура, соединительная ткань, кровь, целомический эпителий, хрящевой и костный скелеты. Признание гомологии зародышевых



листочков у представителей всех групп животных создало прочную основу для сравнительно-эмбриологических исследований. Как подчеркивал наш замечательный соотечественник П.Г. Светлов, без теории зародышевых листков сравнительная эмбриология “превращается в хаос фактов” (Светлов, 1963).

В настоящее время процесс первоначального морфогенетического преобразования бластулы, в ходе которого происходит пространственное обособление зародышевых листков, принято называть *гастроуляцией* (от греч. γαστήρ — желудок), так как этот процесс у примитивных форм завершается образованием архентерона, или первичного кишечника. Гастроуляция происходит у всех типов многоклеточных животных за исключением губок, тканевая организация которых существенно отличается от организации Eumetazoa. У губок нет энтодермы и никогда — ни в эмбриогенезе, ни после метаморфоза — не образуется гастральная полость.

Гастроуляция, будучи ключевым событием раннего онтогенеза, с морфогенетической точки зрения не является каким-то уникальным и высоко специфическим процессом. Лежащие в основе гастроуляции перемещения клеточных пластов или миграции мезенхимы являются частным проявлением общих принципов морфогенеза, которые используются для реализации и иных процессов на более поздних стадиях развития. В основе формирования зародышевых листков лежат различные морфогенетические процессы, в том числе *ингрессия (иммиграция), эпиболия, деламинация и инвагинация*. Гастроуляция путем ингрессии обычна для Стрекающих. Если выселение носит повсеместный характер, говорят о *мультиполярной иммиграции*; если же оно сосредоточено в одной области зародыша, ее называют *униполярной*. При гастроуляции путем *клеточной деламинации* элементы энтодермы образуются в результате направленного деления клеток бластулы, митотические веретена которых ориентированы перпендикулярно поверхности зародыша. *Морулярной деламинацией* называют образование энтодермы путем спецификации клеток, занимающих внутреннюю часть морулы. Гастроуляция может происходить и вследствие впячивания эпителиальной стенки бластулы, или *инвагинации*. Если внутренний энтодермальный слой образуется в результате обрастания внутренних клеток поверхностными, говорят об *эпиболии*. Часто при образовании зародышевых листков сочетаются разные типы клеточных движений. У позвоночных широко представлено *конвергентное вытяжение*.

Морфогенетические движения, которые обеспечивают гастроуляцию, имеют в своей основе различные и вполне устойчивые клеточные, мо-

лекулярные и генетические механизмы, которые активируются обычно на стадии поздней бластулы. Спецификация клеток зародыша представляет особый класс явлений. Она жестко не связана с морфогенетическими движениями в раннем эмбриогенезе, и может реализоваться как в период дробления, так и после него. Перемещаться могут и гетерогенные клеточные пласты, содержащие различные презумптивные зачатки, и однородные, дифференцирующиеся в ходе или после завершения гастроуляции.

Мы полагаем, что универсальные механизмы эпителиального формообразования, равно как и механизмы, обеспечивающие эпиболию, при которой один слой клеток распространяется по поверхности другого слоя, или ингрессию и миграцию мезенхимы, возникли в процессе долгой эволюции независимо и существенно раньше гастроуляции, как способа образования зародышевых листков. Морфогенетические движения, с помощью которых осуществляется гастроуляция Двухслойных и Трехслойных животных, наблюдаются и в раннем эмбриогенезе Губок. Трансформация зародыша в молодую губку у разных видов происходит в результате таких процессов, как инвагинация, ингрессия и эпиболия клеток. Однако у Губок разнообразны клеточные перемещения, лежащие в основе формирования личинки, не связаны с образованием зародышевых листков, т.е. структур, гомологичных эктодерме, энтодерме или мезодерме Eumetazoa.

Независимость морфогенетических перемещений и формирования зародышевых листков в период гастроуляции Eumetazoa проявляется и в развитии Стрекающих. Действительно, у последних имеются механизмы инвагинации и эвагинации, которые лежат в основе различных эпителиальных морфогенезов на продвинутых стадиях индивидуального развития (Белоусов, 1987). Тем не менее на стадии гастроуляции у Hydrozoa наблюдаются лишь ингрессии или деламинации, но не инвагинация. Не исключено, что существование автономных (не связанных напрямую с гастроуляцией) механизмов эпителиального формообразования, закрепленных в виде особых генетических программ, лежит в основе независимого возникновения инвагинации в процессах гастроуляции в разных группах Metazoa (Беклемишев, 1964).

В этой связи представляются принципиально важными данные, свидетельствующие о разобщенности процессов обособления внутреннего зародышевого листка и спецификации его клеток, продемонстрированные у *Nematostella vectensis* (Kumburegama et al., 2011). У этой актинии образование архентерона начинается с изгибания стенки бластулы, индуцированного появлением

бутылковидных клеток на анимальном полюсе. Оказалось, что этот процесс обусловлен Wnt/PCP сигналингом при участии материнского фактора *NvStrabismus* (*NvStbm*). Этот белок сосредоточен в анимальной области зиготы. В период дробления он сохраняет свою локализацию, а в начале гастрюляции экспрессируется в апикальной области бутылковидных клеток бластопора. При использовании соответствующего морфолино блокируется и образование бутылковидных клеток, и начальная инвагинация архентерона, тогда как спецификация энтодермальных клеток, опосредованная каноническим Wnt-сигналингом, не подавляется. Наоборот, избирательное блокирование канонического (*Wnt/β-catenin*) сигналинга ингибирует спецификацию энтодермы, но не влияет на образование бутылковидных клеток и первоначальную инвагинацию архентерона. Таким образом, у *Nematostella*, инвагинация архентерона и спецификация энтодермы направляются различными генетическими программами. Как подчеркивают авторы, эти данные можно рассматривать как свидетельство независимого возникновения инвагинации и спецификации энтодермы в ходе эволюции многоклеточных (Kumburegama et al., 2011).

Подробный и объективный анализ противоречивых взглядов эмбриологов разных поколений на проблему зародышевых листков у губок (Иванова-Казас, 1975; Ересковский, 2005) освобождает нас от необходимости аналогичного рассмотрения. Отметим лишь, что существовало и до сих пор бытует мнение, что губки — животные с инверсией зародышевых листков (Schulze, 1878), у которых во время метаморфоза происходит перемещение эктодермы внутрь тела. На этом основании губок относили к *Epanthiozoa* (от греч. ἐναντιος — противоположный, противлежащий) (Delage, 1898). Как отмечает А.В. Ересковский (Ересковский, 2005), в литературе широко представлена и другая точка зрения, согласно которой зародышевые листки у Губок образуются только во время метаморфоза. Важно подчеркнуть, что на протяжении всей истории исследования эмбриологии губок, начиная с Бючли (Bütschli, 1884) существовали исследователи, которые, не будучи связанными догмой универсальности гомологии зародышевых листков, полагали, что у губок зародышевые листки отсутствуют. На этих позициях стоял, в частности, П.П. Иванов (1937, 1945).

Признание того, что у губок имеется гастрюляция, в ходе которой образуются зародышевые листки, беспросветно запутывает проблему, так как, по сути дела, оно означает, что в эмбриогенезе губок формируется первичный кишечник, архентерон. Между тем многократно было показано, что у губок типичное внутриклеточное пищеварение,

при котором секреция пищеварительных ферментов не происходит. Эта ситуация существенно отличается от процесса пищеварения у тех *Metazoa*, которые лишены пищеварительной полости. Так, *Trichoplax adhaerens* (*Placozoa*) накрывает пищевые частицы вентральной поверхностью, где формируются временные пищеварительные мешки, железистые клетки которых секретируют пищеварительные ферменты (Серавин, Гудков 2005). У губок подобных железистых клеток на поверхности тела нет. У них пищеварение внутриклеточное (Vacelet, Dupont, 2004).

В чем смысл раннего разделения клеточного материала личинки губок на два слоя? Лейтмотивом морфогенеза у губок является формирование не кишечной полости, а водоносной системы, которая многократно увеличивает контактирующую с внешней средой поверхность тела, регулирует скорость водотока, и, тем самым, способствует эффективности питания. Водоносная система губок — это, скорее, “*пищедоставляющая*”, а не *пищеварительная* система. Функционально, как средство доставки энергетических ресурсов в разные области тела, водоносная система губок аналогична кровеносной системе билатеральных. С учетом этого, эпителий, выстилающий водоносную систему, и выполняющий наряду с локомоторной функцию извлечения пищевых частиц из прокачиваемой воды, нельзя без большой натяжки считать энтодермой. В отличие от хоаноцитов производные энтодермы у *Eumetazoa* обеспечивают секрецию пищеварительных ферментов.

Очевидно, что важнейшим этапом эволюции Многоклеточных животных был период, когда происходила выработка механизмов формирования пространственно организованной гетерогенной структуры, в рамках которой стала возможной дифференциация тканей и органов. Становление и эволюция этих механизмов, связанных с эволюцией генов и организации геномов, заняли значительный отрезок времени, предшествующий появлению многоклеточных животных. Эти механизмы сохранились в относительно первозданном виде у губок и существенно видоизменились в линии, ведущей к билатеральным животным.

Известно, что обеспечение формирования многоклеточности осуществляется главным образом за счет систем генов регуляции клеточного цикла и роста, программируемой клеточной смерти; адгезии между клетками и клетками и внеклеточным матриксом, клеточного сигналинга и регуляции развития через транскрипционные факторы, распознавания свой—чужой, и, наконец, генов спецификации и терминальной дифференцировки клеток. Недавние исследования показали, что в геномах губок закодированы ком-

поненты всех основных наборов молекул, управляющих формированием многоклеточного организма из зиготы и поддержанием собственно *многоклеточности* такого животного (Manuel et al., 2004; Adell, Müller, 2004; Nichols et al., 2006; Larroux et al., 2007; Gazave et al., 2008; Harcet et al., 2010; Srivastava et al., 2010, и др.). В тоже время, сложность представленных компонентов у губок существенно ниже, чем у Eumetazoa, особенно по сравнению с наиболее продвинутыми, а ряд ключевых эволюционно консервативных компонентов и вовсе отсутствует (см. ниже).

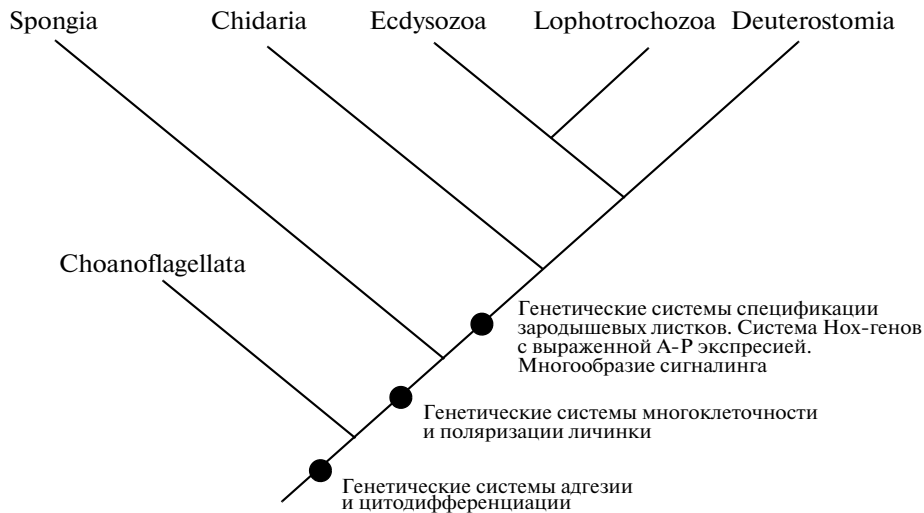
У губок обнаружены разнообразные молекулы адгезии, обеспечивающие межклеточные контакты и связь между клетками и внеклеточным матриксом. Впервые факторы агрегации были выявлены у *Geodia cydonium* и *Microciona prolifera* (Müller, Zahn 1973; Henkart et al., 1973; Müller, 1982). Эти факторы в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  взаимодействуют с встроенным в мембрану клетки рецептором. Агрегация клеток происходит при участии полипептида 140 kDa, который взаимодействует с галектином, связывающим индивидуальные молекулы фактора агрегации с рецепторами плазматической мембраны. Позднее, были клонированы гены галектина (Pfeifer et al., 1993, Müller et al., 1997), обеспечивающего межклеточную адгезию, и нуклеотидные последовательности интегрина (Pancer et al., 1997, Wimmer et al., 1999a), который участвует в соединении клеток с внеклеточным матриксом. Как оказалось, галектины губок имеют характерный консервативный углеводный сайт связывания [LH(F)NPR(G)VNT(G)W(T)EFPF], который обнаруживается во всех S-лектинах позвоночных, а также в лектине губок (Pfeifer et al., 1993). Таким образом, было установлено, что у губок имеются гены, кодирующие вещества, близко родственные молекулам адгезии Первичноротых и Вторичноротых, и которые играют важную роль в осуществлении морфогенетических процессов, связанных с перемещением клеток в пространстве. Недавний анализ генома губки *Amphimedon* подтвердил наличие у губок как кадгертинов, так и иммуноглобулинов (Srivastava et al., 2010).

Исследования последних лет выявили у губки *Amphimedon queenslandica* (Demospongiae) ключевой механизм канонического сигналинга с участием Wnt и  $\beta$ -катенина, большинство генов которого не обнаружены у хоанофлагеллят. Были идентифицированы такие гены как Wnt, Frizzled, SFRP (secreted Frizzled-related proteins), GSK3 (Glycogen synthase kinase 3), Lrp5/6, Dvl, Axin, APC,  $\beta$ -catenin, Tcf и Groucho и подробно исследована динамика их экспрессии в эмбриогенезе этой губки (Adamska et al., 2010). Вместе с тем, в геноме *Amphimedon* отсутствуют ортологи ряда ключевых компонентов неканонического пути

Wnt/PCP, которые появляются у книдарий (Kumburegama et al., 2011). Полученные результаты свидетельствуют, что Wnt/ $\beta$ -катениновый сигналинг, один из важнейших элементов управления морфогенезом всех Metazoa, в процессе эволюции возник на этапе формирования предка ныне существующих Metazoa. Последующая дупликация генов и возможное увеличение сложности белковых взаимодействий привели к формированию более сложно регулируемых Wnt-путей, наблюдаемых у современных Билатеральных.

Как и у всех Metazoa в раннем развитии губок Wnt-сигналинг принимает участие в формировании эмбриональной оси и переднезадней поляризации, которая внешне проявляется в направлении движения личинки. Асимметричность переднезадней оси детерминируется экспрессией гена *WntA* в зоне будущего заднего полюса. Как известно, у губок нет Нох-генов, поэтому высказывается предположение, что в эволюции животных полярирующий код Wnt появляется раньше Нох-кода (Guder et al., 2006; Ryan, Vaxevanis, 2007). Wnt-сигналинг участвует в детерминации оси и при бесполом размножении: так, у *Ephydatia muelleri* гены *Wnt* определяют формирование оси ювенильной особи, вылупляющейся из геммулы (Windsor, Leys, 2010). При действии хлористого лития, который ингибирует киназу GSK3, и тем самым увеличивает концентрацию  $\beta$ -катенина у молодых особей *E. muelleri* происходило увеличение числа оскулюмов, что интерпретируется, как умножение числа осей тела. В геноме *Amphimedon queenslandica* выявлены три Wnt последовательности, а в геноме *Oscarella lobularis* — две (Lapébie et al., 2009). Сравнивая эти гены с родственными генами книдарий авторы отмечают, что их число у губок значительно меньше, чем у книдарий, у которых, как и у позвоночных, их насчитывается 12 (Kusserow et al., 2005). Несмотря на определенные отличия Wnt генов губок от соответствующих генов эуметазоа, все Wnt гены губок обнаруживают структурное сходство (Lapébie et al., 2009). Поляризация личинки у *A. queenslandica* обусловлена также асимметричной экспрессией гена *TGF- $\beta$*  на переднем полюсе. И Wnt, и *TGF- $\beta$*  экспрессируются радиально относительно переднезадней оси (Adamska et al., 2007).

В геноме губок представлено большинство семейств генов (NK, Six, Pax, bHLH), обеспечивающих развитие сенсорных клеток (хотя количество генов этих семейств, как правило, меньшее, чем у Eumetazoa), однако, у них нет генов семейств Нох/paraНох и многих других ключевых регуляторов нейрогенеза, и, соответственно, у губок нет нервной системы (Galliot et al., 2009; Srivastava et al., 2010). С учетом принципа специфичности зародышевых листков на этом основании можно



Основные инновации развития, ведущие к возникновению Билатеральных (объяснения в тексте).

сказать, что у губок имеется покровный эпителий, но не эктодерма. Примечательно, что у губок нет и ряда других критически важных для гаструляции и спецификации зародышевых листков факторов. Так, в геномах губок не обнаружены гены, вовлеченные в процесс формирования мезодермы у трехслойных и процессы гаструляции, как у билатеральных, так и у радиальных животных — FoxA, Gsc, Twist, Snail (Srivastava et al., 2010). В геноме губок отсутствует и другой критически важный фактор Otx, который наряду, а в ряде доказанных случаев совместно, с FoxA регулирует процессы инвагинации и спецификации энтодермы у Eumetazoa (Oliveri et al., 2006; Mazza et al., 2007; Galliot et al., 2009). Таким образом, несмотря на наличие у губок основных семейств генов, ряд эволюционно консервативных факторов спецификации зародышевых листков еще отсутствуют, и соответствующие звенья генетических регуляторных сетей, вероятно, не могут функционировать.

Подводя итоги сказанному, можно заметить, что в основе возникновения механизмов развития и становления многоклеточности животных, этих самых впечатляющих событий в эволюции животных, лежало становление некой минимальной генетической регуляторной сети. На рисунке представлены последовательность возникновения некоторых механизмов, обеспечивающих развитие Metazoa. Период, предшествовавший расхождению губок и Eumetazoa, характеризуется появлением генов, связанных с синтезом разного рода молекул адгезии и клеточных контактов, что создало предпосылки межклеточных взаимодействий. На следующем этапе уже после расхожде-

ния хоанофлагеллят и многоклеточных, но до расхождения современных типов Metazoa появляются такие транскрипционные факторы как Paired, POU, T-box, возникает Wnt-сигналинг, становятся возможными морфогенетические движения индивидуальных клеток и их пластов. После отделения Губок в ветви Eumetazoa происходит неуклонное расширение объемов основных классов транскрипционных факторов (Largoux et al., 2008). Общность базовых генетических механизмов, лежащих в основе становления в онтогенезе многоклеточности и морфогенетических процессов, является свидетельством общности происхождения различных типов Metazoa (Adamska et al., 2010; Srivastava et al., 2010). Формирование на этой основе водоносной системы как способа улавливания и доставки пищевых частиц в различные части животного привело к возникновению Parazoa. Развитие архентерона и возникновение полостного пищеварения стало возможным в результате дифференциации зародышевых листков, что лежало в основе происхождения Eumetazoa. Итак, появление систем клеточной адгезии и механизмов ее пространственного и временного контроля было необходимой предпосылкой возникновения всех Metazoa. Есть все основания думать, что морфогенетические движения клеток у Metazoa возникли независимо от процессов клеточной спецификации, и являются первичными сравнительно с клеточной дифференциацией. Не наличие зародышевых листков, но сходство механизмов морфогенеза лежит в основе единства Metazoa. Традиционное признание существования зародышевых листков у Parazoa устарело.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беклемишев В.Н. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных // М.: Наука 1964.
- Ересковский А.В. Сравнительная эмбриология губок (Porifera). СПб.: Изд. СПбГУ, 2005. 204 с.
- Иванов П.П. Общая и сравнительная эмбриология. М.-Л., 1937. 809 с.
- Иванова-Казас О.М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Новосиб.-М., Наука 1975. 372 с.
- Светлов П.Г. О значении теории зародышевых листков в современной науке // Арх. анат. гист. и эмбр. 1963. Т. 44. № 4. С. 7–25.
- Серавин Л.Н., Гудков А.В. *Trichoplax adhaerens* (тип Плазозоа) одно из самых примитивных многоклеточных животных. Санкт-Петербург, 2005. 69 с.
- Adamska M., Degnan S.M., Green K.M., Adamski M., Larroux C., Degnan B.M. Wnt and TGF- $\beta$  expression in the sponge *Amphimedon queenslandica* and the origin of metazoan embryonic patterning // PLoS ONE. 2007/2(10): e1031.
- Adamska M., Degnan B.M., Green K., Zwafink C. What sponges can tell us about the evolution of developmental processes // Zoology. 2011. V. 114. P. 1–10.
- Adamska M., Larroux C., Adamski M., Green K., Lovas E., Koop D., Richards G.S., Zwafink C., Degnan B.M. Structure and expression of conserved Wnt pathway components in the demosponge *Amphimedon queenslandica* // Evol. Devel. 2010. V. 12. № 5. P. 494–518.
- Adell T., Müller W.E. Isolation and characterization of five Fox (Forkhead) genes from the sponge *Suberites domuncula* // Gene. 2004. V. 334. P. 35–46.
- Allman G. On the anatomy and physiology of Cordylophora, a contribution to our knowledge of the tubularian Zoophytes // Philosophical Transactions of the Royal Society. 1853. V. 143. P. 367–384.
- Galliot B., Quiquand M., Ghila L., de Rosa R., Miljkovic-Licina M., Chera S. Origins of neurogenesis, a cnidarian view // Dev. Biol. 2009. V. 332. P. 2–24.
- Delage Y. Sur la place des Spongiaires dans la classification // C.R. Acad. Paris. 1898. V. 126. P. 545–548.
- Ereskovsky A.V., Dondua A.K. The problem of germ layers in sponges (Porifera) and some issues concerning early metazoan evolution // Zool. Anz. 2006. V. 245. P. 65–76.
- Gazave E., Lapébie P., Renard E., Bézac C., Boury-Esnault N., Vacelet J., Perez T., Manuel M., Borchiellini C. NK homeobox genes with choanocytespecific expression in homoscleromorph sponges // Dev. Genes. Evol. 2008. V. 218. P. 479–489.
- Guder C., Philipp I., Lengfeld T., Watanabe H., Hobmayer B., Holstein T.W. The Wnt code: cnidarians signal the way // Oncogene. 2006. V. 25. P. 7450–7460.
- Harcet M., Roller M., Cetkovic H., Perina D., Wiens M., Müller W.E., Vlahovicek K. Demosponge EST sequencing reveals a complex genetic toolkit of the simplest metazoans // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. P. 2747–2756.
- Henkart P., Humphreys S., Humphreys T. Characterization of sponge aggregation factor. A unique proteoglycan complex // Biochemistry. 1973. V. 12. P. 3045–3050.
- Kumburegama S., Wijesena N., Xu R., Wikramanayake A.H. Strabismus-mediated primary archenteron invagination is uncoupled from Wnt/ $\beta$ -catenin-dependent endoderm cell fate specification in *Nematostella vectensis* (Anthozoa, Cnidaria): implications for the evolution of gastrulation // Evodevo. 2011. V. 21. P. 2.
- Kusserow A., Pang K., Sturm C., Hroudá M., Lentfer J. et al. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone // Nature. 2005. V. 433. P. 156–160.
- Lapébie P., Gazave E., Ereskovsky A., Derelle R., Bézac C. et al. WNT/ $\beta$ -Catenin signalling and epithelial patterning in the homoscleromorph sponge *Oscarella* // Plos one. 2009. 4(6): e5823. doi:10.1371.
- Larroux C., Fahey B., Degnan S.M., Adamski M., Rokhsar D.S., Degnan B.M. The NK Homeobox gene cluster predates the origin of Hox genes // Curr. Biol. 2007. V. 17. P. 706–710.
- Larroux C., Luke G.N., Koopman P., Rokhsar D.S., Shimeld S.M., Degnan B.M. Genesis and Expansion of Metazoan Transcription Factor Gene Classes // Mol. Biol. Evol. 2008. V. 25. P. 980–996.
- Mazza M.E., Pang K., Martindale M.Q., Finnerty J.R. Genomic organization, gene structure, and developmental expression of three clustered otx genes in the Sea Anemone *Nematostella vectensis* // J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.). 2007. V. 308B. P. 494–506.
- Manuel M., Le Parco Y., Borchiellini C. Comparative analysis of brachyury T-domains, with the characterization of two new sponge sequences, from a hexactinellid and a calcisponge // Gene. 2004. V. 340. P. 291–301.
- Müller W.E.G. Cell membranes in sponges // Intern. Rev. Cytol. 1982. V. 77. P. 129–181.
- Müller W.E.G., Müller I.M. Porifera: an enigmatic taxon disclosed by molecular biology/cell biology // In: Custódio M.R. et al. (eds). Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. 2007. P. 89–106.
- Müller W.E.G., Blumbach B., Wagner-Hülsmann C., Lessel U. Galectins in the phylogenetically oldest metazoa, the sponges (Porifera) // Trends Glycosci. Glycotecnol. 1997. V. 9. P. 123–130.
- Müller W.E.G., Zahn R.K. Purification and characterization of a species-specific aggregation factor in sponges // Exp. Cell Res. 1973. V. 80. P. 95–104.
- Nichols S.A., Dirks W., Pearse J.S., King N. Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 12451–12456.
- Oliveri P., Walton K.D., Davidson E.H., McClay D.R. Repression of mesodermal fate by foxa, a key endoderm regulator of the sea urchin embryo // Development. 2006. V. 133. P. 4173–4181.
- Pancer Z., Kruse M., Müller I., Müller W.E.G. On the origin of adhesion receptors of metazoa: cloning of the integrin  $\alpha$  subunit cDNA from the sponge *Geodia cydonium* // Molec. Biol. Evol. 1997. V. 14. P. 391–398.
- Pfeifer K., Haasemann M., Gamulin V., Bretting H., Fahrenholz F., Müller W.E.G. S-type lectins occur also in invertebrates: high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium* // Glycobiology. 1993. V. 3. P. 179–184.

- Ryan J.F., Baxevanis A.D., Hox, Wnt, and the evolution of the primary body axis: insights from the early-divergent phyla // *Biol. Direct.* 2007. V. 2. P. 37.
- Srivastava M., Simakov O., Chapman J., Fahey B., Gauthier M.E.A. et al. The *Amphimedon queenslandica* genome and the evolution of animal complexity // *Nature.* 2010. V. 466. P. 720–727.
- Vacelet J., Dupont E. Prey capture and digestion in the carnivorous sponge *Asbestopluma hypogea* (Porifera: Demospongiae) // *Zoomorphology.* 2004. V. 123. P. 179–190.
- Vogt C. Embryologie des salmons // In: Histoire naturelle des poissons d'eau douce de l'Europe centrale par L. Agassiz, 2° Livraison. 1842.
- Wimmer W., Blumbach B., Diehl-Seifert B., Koziol C., Batel R., Steffen R., Müller I.M., Müller W.G. Increased expression of integrin and receptor tyrosine kinase genes during autograft fusion in the sponge *Geodia cydonium* // *Cell Adhes. Commun.* 1999. V. 7. P. 111–124.
- Windsor P.J., Leys S.P. Wnt signaling and induction in the sponge aquiferous system: evidence for an ancient origin of the organizer // *Evol. Dev.* 2010. V. 12. P. 481–590.

## Concerning One Obsolete Tradition: Does Gastrulation in Sponges Exist?

A. K. Dondua and R. P. Kostyuchenko

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

*e-mail: akdondua@mail.ru*

Received February 26, 2013; in final form, April 4, 2013

**Abstract**—The analysis of comparative-embryological and molecular-biological data leads to the conclusion that universal basic mechanisms of morphogenesis occurred first in the evolution of animals in the ancestors of modern sponges and eumetazoans, which served as a basis of different evolution of individual development in Parazoa and Eumetazoa lines. In the former, morphogenesis in early embryogenesis led to formation of the water-current system as a means for capturing and delivery of food particles to different parts of the animal. In the latter, morphogenetic movements manifested themselves as gastrulation, during which the germ layers and the digestive system formed. The morphogenetic movements of cells in Metazoa emerged independently of cell specification. They are primary relative to cell differentiation. The unity of all Metazoa is based on the similarity of mechanisms of morphogenesis rather than on the presence of germ layers.

**Keywords:** gastrulation, germ layers, morphogenesis, evolution, Parazoa, Metazoa, sponges, cnidarians, Wnt signaling

УДК 597.828:591.34

## КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ В ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ОСТРОМОРДОЙ ЛЯГУШКИ (*R. ARVALIS*) ЧАСТЬ 3: МОДУЛЬНОСТЬ ИЛИ ЦЕЛОСТНОСТЬ РАЗВИТИЯ<sup>1</sup>

© 2013 г. Е. А. Северцова, А. С. Северцов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119899 Москва, Ленинские горы

E-mail: SevertsovaEA@gmail.com

Поступила в редакцию 18.04.12 г.

Окончательный вариант получен 25.10.12 г.

Статический анализ морфометрии личинок постэмбриональных стадий развития остромордой лягушки позволил оценить степень и характер корреляционных связей развивающихся структур. Рассматривая корреляцию, как проявление множественных физиологических взаимодействий между развивающимися структурами, мы показали, что наиболее вероятным является сценарий развития структур личинок как целостного процесса сопровождающегося возрастанием доли незначительных коррелятивных связей при возрастании общего числа структур. При этом во время критических периодов развития наблюдается увеличение доли более сильных корреляционных взаимодействий между структурами, чье формирование происходит на этом этапе развития.

*Ключевые слова:* узловые стадии развития, филотипические стадии, модульность, изменчивость, коррелированность, *Rana arvalis*.

DOI: 10.7868/S0475145013030063

В течение эмбриогенеза всех позвоночных животных есть периоды морфологического подобия. В работах XX века авторы современных концепций стремятся назвать подобные периоды как “Körpergrundestalt” (Seidel, 1960), “филетические стадии” (Cohen, 1977), стадии “зоотипа/филотипа” (Slack et al., 1993), “филотипический период” (Sander, 1983; Richardson, 1995), “критический период” (Светлов, 1978) или “узловые стадии” (Дорфман, Черданцев, 1977). Демонстрируется синхронизация экспрессии НОХ – генов с филотипическими стадиями (Slack et al., 1993), преимущественное возникновение аномалий развития на этих стадиях и сокращение морфологической изменчивости, по сравнению с предшествующими и последующими стадиями развития. Для объяснения этого явления, были предложены модели песочных часов “houn-glass model” (Raff et al., 1991; Raff, 1996) или “phylotypic egg-timer” модель (Duboule, 1994). Однако более детальные исследо-

вания показали несоответствие теории песочных часов (Bininda-Emonds et al., 2003).

В настоящее время рассматриваются три эволюционные гипотезы, объясняющие возникновение таких периодов в развитии: а) случайные процессы, б) эпигенетические процессы и в) процессы естественного отбора. Каждая из этих гипотез имеет свое объяснение влияния генетической и средовой изменчивости в формировании филотипической стадии. Так, William (1992) считал, что подобие ранних стадий эмбрионального развития появляется как продукт совместного действия направленного/дивергентного отбора на поздних стадиях, а собственно филотипические стадии возникают не под действием отбора, а в результате увеличения фенотипической изменчивости связанной с увеличением сложности развивающегося зародыша. Kirschner и Gerhart (1998) рассматривали возникновение филотипических стадий как результат действия стабилизирующего отбора, создающего платформу для эволюционной стабильности организма. При этом действие стабилизирующей формы естественного отбора и эпигенетические процессы не исключают друг друга, поскольку изменчивость фенотипа является следствием действия аддитивной генетической из-

<sup>1</sup> Предлагаемая статья является третьей частью серии статей. Часть 1 посвящена изучению критических периодов в эмбриогенезе остромордой лягушки на основе анализа общих размеров зародыша, а часть 2 – на основе характеристик головных структур.

менчивости, воздействия окружающей среды и эпигенетического взаимодействия.

Идея эпигенетического эффекта придания формы развивающемуся эмбриону принадлежит Гексли (1942) и развита Уодингтоном (Waddington, 1953, 1956). В современной трактовке этой концепции филотипический период появляется как результат взаимодействий между клетками, тканями, развивающимися органами, поэтому изменения в одном элементе ведут к изменениям многих взаимодействующих структур и функций (Horder, 2006, 2008). Все стадии развития потенциально открыты для эволюционных преобразований, но поскольку эпигенетические взаимодействия так фундаментальны, ранние эволюционные стадии так стабильны (Horder, 2006). Предполагается, что фенотипическая изменчивость снижается на филотипической стадии и что генотипическая изменчивость увеличивается с увеличением числа генных взаимодействий.

Альтернативное объяснение этого: развитие может быть так изменчиво, что комбинируется из некоторого количества отдельных модулей (Raff, 1996; Wagner, Misof, 1993; Wagner, 1996). Модульность может быть описана как групповая характеристика процесса имеющего строгое взаимодействие ее составляющих по сравнению с характеристиками за пределами модуля. Модули могут охватывать разные уровни развития. Модули могут быть независимы от других модулей и могут ускоряться или запаздывать, или быть смещены во времени или в пространстве относительно друг друга. Изменения в одном модуле может происходить независимо от изменений в других модулях.

Предыдущие наши исследования, посвященные изучению узловых стадий развития, позволили выделить три группы признаков (Северцова, Северцов, 2011; 2012). Принадлежность признака к одной из групп определялась характером их изменчивости и коррелированности. Под коррелированностью мы понимали взаимозависимость развивающихся структур зародыша, выражаемую математически посредством коэффициента корреляции Спирмена. При значениях коэффициента больше 0.6 корреляция считалась условно высокой. При значении в диапазоне от 0.6 до 0.4 – средней, а при значении менее 0.4 – слабой. В состав первой группы отнесены признаки, характеризующие ростовые процессы в развитии: общая длина личинки ( $L_o$ ), длина ее тела ( $L_b$ ) и хвостовой пластины ( $L_x$ ), ширина хвостовой пластины ( $W_x$ ). Ко второй, – ширина ( $W_g$ ) и длина головы ( $Dlg$ ), длина морды ( $DI$ ) и ширина ротовой присоски ( $W$ ). Эти признаки рассматривались нами как характеристики процессов дифференциации головных структур. К третьей группе отнесены признаки:

высота морды ( $Vis$ ), высота ротовой присоски ( $H$ ) и ширина ротового отверстия ( $R$ ), а так же расстояние между зрачками глаз ( $eye$ ). Для этих признаков не были выделены узловые стадии на исследованном промежутке развития.

Целью данного исследования было проведение оценки коррелированности развития головастика со стадии хвостовой почки до стадии почки задней конечности. Для выполнения этой цели была поставлено несколько задач: 1. Оценить корреляционные взаимодействия между признаками, характеризующими основные процессы развивающегося зародыша. 2. Провести оценку возможной модульности развития.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на постэмбриональных стадиях развития остромордой лягушки *Rana arvalis* Nills., собранных на нулевой стадии развития из водоемов двух районов города Москвы и из подмосковного водоема. В районе Южное Бутово из водоема, расположенного на окраине Битцевского парка, примерно в полукilометре от внешнего кольца МКАД, были взяты пробы от 6 кладок. Водоем представляет собой глубокую яму, заполняемую талой водой и содержащую большое количество бытового и промышленного мусора (полиэтиленовые пакеты, автомобильные покрышки и т.п.). Второй водоем располагался в районе Востряково, в 200 метрах от внутреннего кольца МКАД, рядом с бензозаправкой. Этот постоянный водоем пополняется как за счет талой воды, так и за счет воды, поступающей из соседних, более крупных прудов. Из него были собраны пробы от 6 кладок. Третий водоем, из которого осуществлялся сбор проб икры остромордой лягушки от пяти кладок, расположен в 50 км к западу от Москвы, на территории Звенигородской биологической станции МГУ. Этот водоем представляет собой зарастающее болото с достаточно кислой водой ( $pH = 5.2$ ).

Пробы икры, объемом около 100 икринок от каждой кладки, переносились в лабораторию и помещались в кристаллизаторы с водой из нативных водоемов. Температура воды поддерживалась в пределах 15–19 градусов. Стадии развития определялись согласно таблицам Дабагян и Слепцовой (1975), разработанным для травяной лягушки, но часто аппроксимируемым и на развитие остромордой лягушки. Прослежено развитие с 27 по 39 стадии включительно. Каждые 3–4 часа по 10–15 личинок фиксировали 7% раствором формальдегида для последующего фотографирования при помощи фотокамеры, установленной на бинокulare фирмы Zeisse.



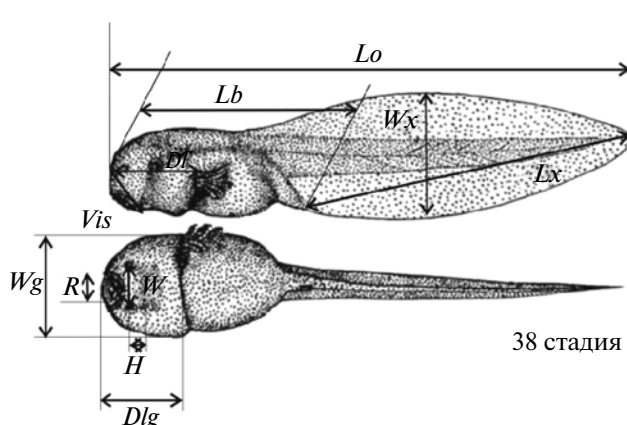


Рис. 1. Морфометрические признаки на примере 38 стадии развития остромордой лягушки (*Rana arvalis*). Обозначения признаков см. в тексте.

На основе полученных фотографий, с помощью программы Axio Vision (Zeisse) проводились промеры личинок по следующим признакам (рис. 1): общая длина личинки ( $Lo$ ); длина тела личинки ( $Lb$ ), от наиболее выступающей части головы до анального отверстия; длина хвостовой пластины ( $Lx$ ), от анального отверстия до конца хвостовой пластины; и ширина хвостовой пластины ( $Wx$ ), по наиболее широкой части середины хвостовой пластины; длина морды ( $Dl$ ) – от основания жабр до наиболее выступающей части морды; высота морды ( $Vis$ ) – от края присоски до точки наиболее выступающей части морды; ширина головы ( $Wg$ ) – расстояние, измеренное по линии жаберных щелей у личинки, лежащей на спине; длина головы ( $Dlg$ ) – расстояние, измеренное у личинки, лежащей на спине от линии жаберных щелей до наиболее выступающей точки морды; ширина присоски ( $W$ ) – расстояние между валиками присоски; высота присоски ( $H$ ) в сагиттальном направлении; ширина ротового отверстия ( $R$ ) – расстояние между уголками ротового отверстия; расстояние между зрачками глаз ( $eye$ ).

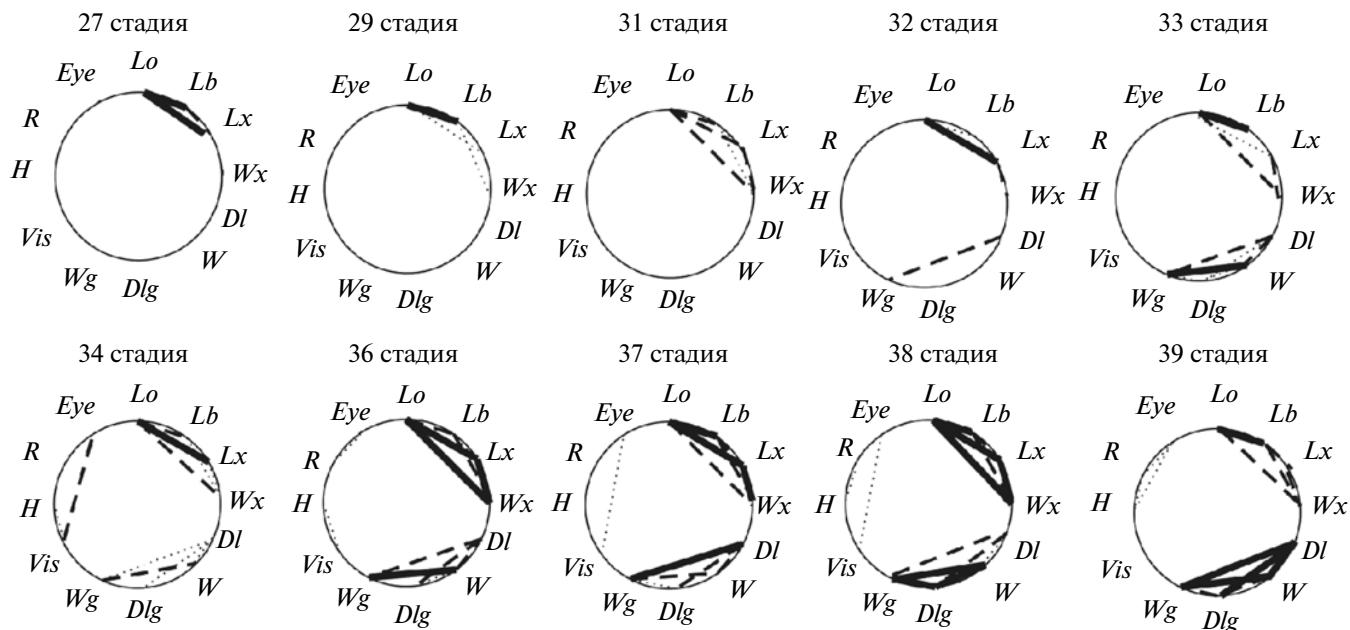
Полученные данные обрабатывали при помощи программ Excel и STATISTIKA 6.0. Рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена и строились корреляционные графы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

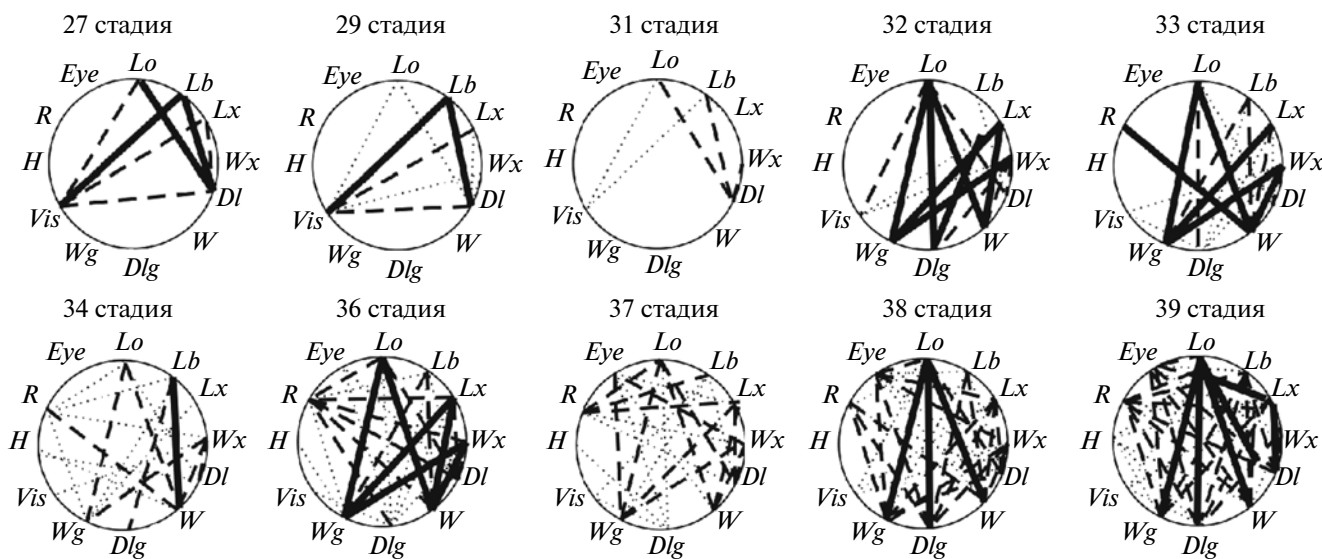
Построение корреляционных граф проводилось с таким расчетом, чтобы можно было оценить взаимодействие признаков включенных в одну группу (рис. 2). Взаимодействие между признаками первой группы наблюдается уже с 27 стадии развития и в дальнейшем число корреляционных пар и сила их взаимодействия остается на довольно высоком уровне. Коэффициенты корреляции

выше 0.6 между признаками “общая длина личинки” ( $Lo$ ) и “длина туловища” ( $Lb$ ) или “длина хвостовой пластины” ( $Lx$ ). “Ширина хвостовой пластины” ( $Wx$ ), как признак, маркирующий плавательные способности, характеризуется корреляционным взаимодействием с другими признаками группы на 36й и старших стадиях развития. У признаков второй группы значимые коэффициенты корреляции отмечены начиная только с 32 стадии. По мере развития взаимозависимость  $Wg$ ,  $Dl$ ,  $W$  и  $Dlg$  становится более очевидной: возрастает доля и сила значимых коэффициентов корреляции. Между признаками третьей группы наблюдаются только слабые и малочисленные взаимодействия. Начиная с 34 стадии развития только для пары  $Vis$ - $eye$  отмечена значимая корреляция. Для других пар признаков если и есть корреляционные взаимодействия, то они крайне слабы. Таким образом, большинство значений коэффициентов корреляции Спирмена внутри выделенных групп не высоки и их реальное количество значительно меньше теоретически возможного.

Более наполнены корреляционные графы, отражающие взаимодействие признаков, относящихся к разным группам (рис. 3). При этом увеличение числа межгрупповых корреляций происходит в критический период развития (на узловых стадиях) и выражено, как правило, в появления и/или усилении коррелятивных связей для признаков, анализируемая стадия для которых является узловой (Северцова, Северцов, 2011; 2012). Эта картина наиболее наглядно отображена для стадий 32 и 33, являющихся узловыми для признаков  $Lo$ ,  $Lx$  и  $W$ , и для 36й стадии – узловой для признаков  $Lb$ ,  $Dl$  и  $Wg$ . Интересно отметить, что число корреляционных взаимодействий на других стадиях развития так же велико, но в их число входят в



**Рис. 2.** Внутригрупповые корреляционные графы, построенные на основе значений коэффициентов корреляции Спирмена, рассчитанных для абсолютных значений признаков. Графы рассчитаны для каждой стадии. Значения коэффициентов корреляции меньше 0.4 обозначены точковой линией; значения больше 0.6 – толстой сплошной линией; значения коэффициентов корреляции больше 0.4, но меньше 0.6 – пунктирной линией.

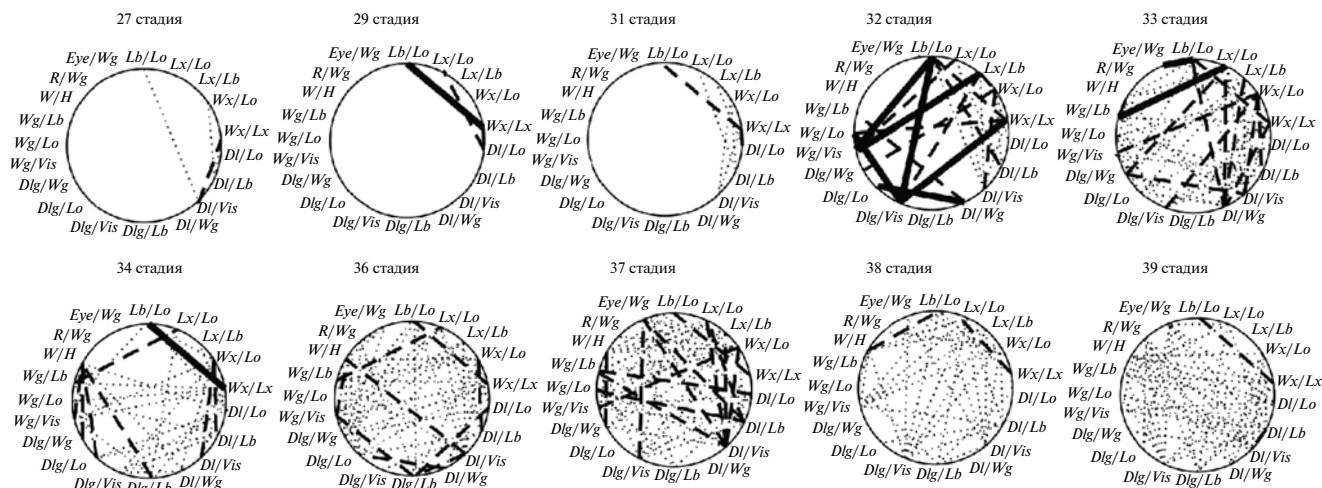


**Рис. 3.** Межгрупповые корреляционные графы, построенные на основе значений коэффициентов корреляции Спирмена, рассчитанных для абсолютных значений признаков. Графы рассчитаны для каждой стадии. Значения коэффициентов корреляции меньше 0.4 обозначены точковой линией; значения больше 0.6 – толстой сплошной линией; значения коэффициентов корреляции больше 0.4, но меньше 0.6 – пунктирной линией.

основном многочисленные не сильные корреляции. Обилие таких взаимодействий не позволяют объединить группы выделенных признаков в самостоятельные модули. Напротив, обилие межгрупповых взаимодействий демонстрирует регуля-

торный характер развития личинок остромордой лягушки.

Иным возможным механизмом регуляции развития может быть коррелятивные взаимодействия, наблюдаемые не между абсолютными зна-



**Рис. 4.** Корреляционные графы для относительных значений признаков. Исключены все корреляции между компонентами пропорций (не указаны корреляции между парами  $Lb/Lo$  и  $Lx/Lo$  и т.д.). Графы рассчитаны для каждой стадии. Значения коэффициентов корреляции меньше 0.4 обозначены точковой линией; значения больше 0.6 — толстой сплошной линией; значения коэффициентов корреляции больше 0.4, но меньше 0.6 — пунктирной линией.

чениями признаков, а между их отношениями. Этот показатель можно рассматривать как характеристику согласованной пропорциональности развития (Irmeleretal., 2004). Как видно из рис. 4, сильные корреляции наблюдаются именно на тех стадиях, для которых выделены узловые стадии. Для доузловых стадий, т.е. с 27 по 31 включительно характерно немного слабых корреляционных взаимодействий, а на постузловых стадиях, 38 и 39й, доля корреляций сильно возрастает, но большинство из них не превышает значение 0.4. Собственно на узловых стадиях с 32 по 37 наблюдается устойчивая корреляция двух основных процессов: общего роста тела ( $Lb/Lo$ ) и размеров хвостовой пластины ( $Wx/Lx$ ). Однако, эта корреляция фактически единственная, остальные же корреляции, появляясь на одних стадиях, на последующих, либо становятся более слабыми, либо не значимыми. Это коррелятивное обилие может быть отражением только общей зарегулированности процесса развития, когда не только непосредственно все процессы развития, но и их взаимодействия находятся в постоянной согласованности друг с другом.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие любого организма нельзя отрывать от проспективного значения — формирования функционирующих структур. Структуры (подсистемы организма) формируются и начинают функционировать к тому моменту, когда их функции необходимы, как компоненты приспособленности организма. П.К. Анохин (1968) назвал этот принцип системогенезом. Необходимость формирования адаптивной организации к началу следующего эта-

па онтогенеза в полной мере относится к целостному организму. У остромордой лягушки такими этапами являются вылупление и переход к активному плаванию. Морфометрический анализ развития позволяет математическими методами выявить взаимосвязь развивающихся структур и оценить их роль в общем развитии организма. На этом основании корреляций между признаками можно рассматривать как проявление множественных функциональных взаимодействий между развивающимися структурами (Raff, 1994; Schwenk, 2001; Schwenk, Wagner, 2003, 2004). Корреляции внутри групп признаков, характеризующих ростовые процессы или дифференциацию головных структур, показывают, что взаимозависимость показателей роста происходит до этапа начала функционирования органа. Хвостовая пластина начинает расти и приобретать пропорции, обеспечивающие плавание до расплытия головастиков по водоему. Размеры и пропорции головы складываются позже, на стадиях после вылупления, но их функционирование начинается только с переходом к активному кормлению. При этом связи между отделами развивающейся личинки оказываются многочисленными и разнообразными. Их становление может рассматриваться, как регуляторный механизм развития (Северцова, 2002).

Один из возможных сценариев такой регуляции развития основан на ситуации, когда, выступая в роли внутренних сдерживателей, корреляции снижают фенотипическую изменчивость, сужая степень свободы развития. В свою очередь, такое сужение варибельности развития той или иной структуры будет сопровождаться высокой степенью взаимодействия между элементами, которые в

дальнейшем разделяются на модули. Однако, как показал Galis с коллегами (Galis, Metz, 2001; Galis, Sinervo, 2002), выступая в роли модулей филотипические стадии, по терминологии авторов, наиболее уязвимы. Нарушение в одном из модулей будет неизменно приводить к серьезным проблемам во всем развитии: невозможности развития личинки при утрате его структурной части. Такой путь развития рассматривается многими авторами как маловероятный и не эффективный (Roth, Wake, 1985; Wake, 1989; Chipman, 2001; 2002; Richardson, Oelschlager, 2002; Bininda-Emonds et al., 2003; Galis et al., 2003), поскольку, как подтверждают и наши данные, наблюдается много взаимодействий между модулями.

Иной регуляторный механизм основан на разной степени согласования развивающихся структур, выражающегося в обилии слабых коррелятивных связей или появлении небольшого числа жестких корреляций. Этот вариант кажется более реалистичным. Безусловно, развитие отдельных структур зародыша, несущих разную функциональную нагрузку, очень важно. В то же время, если бы их развитие проходило вне связи с другими структурами оно было бы бессмысленным: организм терял бы способность реагировать как единое целое. В крайнем варианте такой рассогласованности процесса развития организма, как единого целого, можно говорить о группе признаков, характеризующих развитие каких-то отдельных структур зародыша, что может приводить к возникновению гетерохроний (Richardson, 1995). Предполагается, что этот механизм возникает как способ, снижающий вероятность нарушений развития путем компартиментизации развивающегося организма в модули (Raff 1994; 1996) и реализация такого сценария развития, по-видимому, наблюдается только в стресс-условиях, причем на эмбриональных стадиях, когда модули еще не взаимодействуют с окружающей средой (Северцова, Северцов, 2007). В нормальных условиях общий ход развития характеризуется низкой модульностью (Galis and Metz, 2001; Galis and Sinervo, 2002; Galis et al., 2002), поскольку границы модулей размыты из-за большого числа взаимодействий между ними. Возможно этот сценарий развития, вслед Ирмерли с коллегами (Irmelery et al., 2004) можно охарактеризовать термином “согласованная пропорциональность” или, более привычным для русскоязычной литературы — “сбалансированность развития” (Шмальгаузен, 1969). В предложенной в свое время Уоддингтоном модели “эпигенетического ландшафта”, развитие отдельных структур происходит в пределах так называемого креода — канала развития (Уоддингтон, 1947; Шишкин, 1984). Понятию креода соответствуют

“формообразовательный аппарат” (Филатов, 1939) и “морфогенетические корреляции” (Шмальгаузен, 1938, цит. по 1982). В модели Уоддингтона и в обобщении Филатова не рассматриваются межкреодные взаимодействия. Шмальгаузен стремится преодолеть этот недостаток, введя понятие эргонтических корреляций — функциональных взаимодействий не вполне сформировавшихся, но уже функционирующих структур. Однако межкреодные взаимодействия начинаются раньше, чем подсистемы организма, креоды или модули, по терминологии зарубежных авторов, достигают функционального состояния. Эти взаимодействия и выражаются слабыми и средними корреляциями функционально не связанных подсистем развивающегося организма. Таким образом, межкреодные взаимодействия обеспечивают целостность всего организма. Они, как и внутрикреодные являются морфогенетическими корреляциями, но более слабыми, чем корреляции внутри креода. Ранее нами высказывалось предположение, что именно корреляционные связи будут выступать в роли “сдерживателя” изменчивости и тем самым будут определять характер развития отдельных структур в пределах нормы реакции (Северцова, 2007). Но эта упрощенная схема ясна и понятна только на начальных этапах развития. По мере развития, чем сложнее становится структура, тем важнее сохранить ее целостность вопреки дифференциации частей. Соответственно, первоначальную роль начинают играть межкреодные взаимодействия, как раз и обеспечивающие общую сбалансированность развития посредством корреляционных взаимодействий между развивающимися структурами.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анохин П.К. Биология и физиология условного рефлекса // М., 1968. 546 с.
- Дабабян Н.В., Слепцова Л.А. Травяная лягушка (*Rana temporaria* L.) // Объекты биологии. М.: Наука, 1975. С. 442–462.
- Дорфман Я.Г., Черданцев В.Г. Роль силы тяжести в раннем развитии // Внешняя среда и развивающийся организм. М.: Наука, 1977. С. 140–173.
- Светлов П.Г. Физиология (механика) развития. Л.: Наука, 1978. Т. 1. Процессы морфогенеза на клеточном и организменном уровнях. 279 с. Т. 2. Внутренние и внешние факторы развития. 263 с.
- Северцова Е.А. Адаптивные процессы и изменчивость эмбриогенеза бесхвостых амфибий в городских популяциях. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: Изд-во МГУ, 2002. 24 с.
- Северцова Е.А., Северцов А.С. Механизмы адаптивной регуляции эмбриогенеза бесхвостых амфибий, обитающих в условиях антропогенного загрязнения водоемов // ЖОБ. 2007. Т. 68. № 5. С. 323–331.

- Северцова Е.А., Северцов А.С.* Критические периоды в эмбриогенезе *R. arvalis*. Часть 1: линейные размеры зародыша // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 2. С. 1–12.
- Северцова Е.А., Северцов А.С.* Критические периоды в эмбриогенезе *R. arvalis*. Часть 2: развитие головных структур // Онтогенез. 2012. Том 43. № 3. С. 1–9.
- Уоддингтон К.Х.* Организаторы и гены. М.: Гос. Из-во иностр. Лит., 1947. 240 с.
- Филатов Д.П.* Сравнительно-морфологическое направление в механике развития, его объект, цели и пути // АН СССР, 1939. 119 с.
- Шишкин М.А.* Индивидуальное развитие и естественный отбор // Онтогенез. 1984. Т. 15. № 2. С. 115–136.
- Шмальгаузен И.И.* Проблемы дарвинизма. Л.: Наука, 1969. 492 с.
- Шмальгаузен И.И.* Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии // М., 1982. С. 12–223.
- Bininda-Emonds O.R.P., Jeffery J.E., Richardson M.K.* Inverting the hourglass: quantitative evidence against the phylotypic stage in vertebrate development // Proc. R. Soc. 2003. V. 270. P. 341–346.
- Cohen J.* Reproduction. London: Butterworths, 1977.
- Chipman A.D.* Developmental exaptation and evolutionary change // Evol. Devel. 2001. V. 3. P. 299–301.
- Chipman A.D.* Variation, plasticity and modularity in anuran development // Zoology. 2002. V. 105. P. 97–104.
- Duboule D.* Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony // Development. 1994. V. 120. P. 135–142.
- Galis F., Metz J.A.* Testing the vulnerability of the phylotypic stage: on modularity and evolutionary conservation // J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.). 2001. V. 291. P. 195–204.
- Galis F., van Dooren T.J.M., Metz J.A.* Conservation of the segmented germband stage: robustness or pleiotropy? // Trends Genetics. 2002. V. 18. P. 504–509.
- Galis F., Sinervo B.* Divergence and convergence in early embryonic stages of metazoans // Contributions to Zoology. 2002. V. 71. P. 101–113.
- Galis F., Wagner G.P., Jockush E.* Why is limb regeneration possible in amphibians but not in reptiles, birds, and mammals? // Evolution and Development. 2003. V. 52. P. 1–13.
- Horder T.J.* Gavin Rylands de Beer: how embryology foreshadowed the dilemmas of the genome // Nat. Rev. Genet. 2006. V. 7. P. 892–898.
- Irmiler I., Schmidt K., Starck J.M.* Developmental variability during early embryonic development of zebra fish, *Danio rerio* // J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol. 2004. V. 302. P. 446–457.
- Kirschner M., Gerhart J.C.* Evolvability // Proc. Natl. Acad. Sci. 1998. V. 95. P. 8420–8427.
- Raff R.A.* Developmental mechanism in the evolution of animal form: origins and evolvability of body plans // In: Early Life on Earth (Bengston S. editor). New York: Columbia University Press, 1994. P. 489–500.
- Raff R.A.* The Shape of Life. Genes, Development, and the Evolution of Animal Form // Chicago: University of Chicago Press, 1996.
- Raff R.A., Wray G.A., Henry J.J.* Implications of radical evolutionary changes in early development for concepts of developmental constraint // In: New Perspectives on Evolution. New York: Wiley-Liss, 1991. P. 189–207.
- Richardson M.K.* Heterochrony and the phylotypic period // Developmental Biology. 1995. V. 172. P. 412–421.
- Richardson M.K., Oelschläger H.H.A.* Time, pattern, and heterochrony: a study of hyperphalangy in the dolphin embryo flipper // Evolution and Development. 2002. V. 4. P. 435–444.
- Roth G., Wake D.B.* Trends in the functional morphology and sensorimotor control of feeding behavior in salamanders: an example of the role of internal dynamics in evolution // Acta Biotheoretica Leiden. 1985. V. 34. P. 175–192.
- Sander K.* The evolution of patterning mechanisms: gleanings from insect embryogenesis and spermatogenesis // Developmental Evolution. 1983. V. 302b. P. 137–159.
- Schwenk K.* Functional units and their evolution // In: The character concept in evolutionary biology. (Wagner G.P. editor). Academic Press, San Diego, 2001. P. 165–198.
- Schwenk K., Wagner G.P.* Constraint // In: Key Words and Concepts in Evolutionary Development Biology. Harvard University Press. Cambridge, 2003. P. 52–61.
- Schwenk K., Wagner G.P.* The relativism of constraints on phenotypic evolution // In: Phenotypic integration: Studying the ecology and evolution of complex phenotypes. Oxford Univer. Press, 2004. P. 390–408.
- Seidel F.* Körpergrundgestalt und Keimstruktur. Eine Erörterung über die Grundlagen der vergleichenden und experimentellen Embryologie und deren Gültigkeit bei phylogenetischen Untersuchungen // Zoologischer Anzeiger. 1960. V. 164. P. 245–305.
- Slack J.M.W., Holland P.W.H., Graham C.F.* The zootype and the phylotypic stage // Nature. 1993. V. 361. P. 490–492.
- William G.C.* Natural selection. Domains, levels, and challenges // Oxford: Oxford University Press, 1992.
- Waddington C.H.* Genetic assimilation of an acquired character // Evolution. 1953. V. 7. P. 118–126.
- Waddington C. H.* Principles of Embryology // Allen & Unwin, London, 1956.
- Wake D.* Phylogenetic implications of ontogenetic data // Geobios, memoire special. 1989. V. 12. P. 369–378.
- Wagner G.P.* Homologues, natural kinds and the evolution of modularity // Amer. Zool. 1996. V. 36. P. 36–43.
- Wagner G.P., Misof B.Y.* How can a character be developmentally constrained despite variation in developmental pathways // J. Evol. Biol. 1993. V. 6. P. 449–455.

**Crucial Stages of Embryogenesis of *Rana arvalis*:**  
**Part 3. Modularity or Developmental Integrity<sup>2</sup>**

**E. A. Severtsova and A. S. Severtsov**

*Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia*

*e-mail: SevertsovaEA@gmail.com*

Received April 18, 2012; in final form, October 25, 2012

**Abstract**—Static analysis of the morphometry of larvae of the postembryonic stages of development of *Rana arvalis* made it possible to estimate the extent and nature of correlations between developing structures. Considering a correlation as a manifestation of multiple physiological interactions between developing structures, we showed that the most likely scenario is the development of larval structures as a holistic process that is accompanied by an increase in the proportion of minor correlative interactions with an increase in the total number of structures. During the critical periods of development, an increase in the proportion of stronger correlative interactions between the structures that form at this stage of development is observed.

*Keywords:* crucial stages of development, phylotypic stages, modularity, variability, correlation, *Rana arvalis*

---

<sup>2</sup>This is the third in a series of three papers dealing with crucial stages in the embryonic development of this species. In Part 1, their analysis is based on linear measurements of embryonic structures; in Part 2, on parameters of variation in developing head structures.

УДК 575.18:598.241.2

## НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОЛА ПТЕНЦОВ ЖУРАВЛЕЙ ПО ДНК ИЗ КАПИЛЛЯРНЫХ СОСУДОВ АЛЛАНТОИСА

© 2013 г. Е. А. Мудрик, Т. А. Кашенцева\*, Е. А. Гамбург, Е. Ю. Гаврикова\*\*, Д. В. Политов

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

119991 Москва, ГСП-1, ул. Губкина, д.3

\*Питомник редких видов журавлей, Окский государственный заповедник

391072 Рязанская обл., Спасский р-он, п. Брыкин Бор

\*\*Станция реинтродукции редких видов птиц, Хинганский государственный природный заповедник

675740, Амурская обл., п. Архара

E-mail: mudrik@vigg.ru

Поступила в редакцию 27.02.13 г.

Окончательный вариант получен 11.04.13 г.

На четырех видах журавлей (подсем. Gruinae, Aves), размножавшихся в Питомнике редких видов журавлей Окского заповедника в течение 2009–2012 гг., продемонстрирован неинвазивный метод определения пола птенцов после их вылупления на основе ДНК, выделенной из капиллярных сосудов аллантоиса подскорлуповых оболочек яиц. Используя молекулярный маркер пола EE0.6, установлен пол 26 птенцов стерха *Grus leucogeranus*, 15 птенцов японского журавля *G. japonensis*, четырех птенцов серого журавля *G. grus* и одного птенца журавля-красавки *Anthropoides virgo*. Данный метод может быть рекомендован для определения пола птенцов и соотношения полов у журавлей, размножающихся как в искусственных условиях, так и в природных популяциях.

**Ключевые слова:** журавли, определение пола, аллантоис, подскорлуповая оболочка, ДНК, неинвазивные молекулярные методы.

DOI: 10.7868/S0475145013050054

Птицы семейства Журавлиных (*Gruidae*) не обладают выраженным внешним половым диморфизмом. Как правило, самцы журавлей крупнее, чем самки (Флинт, 1987), однако использование лишь размерно-весовых критериев не гарантирует установление пола даже у взрослой птицы (Swengel, 1996). Акустический метод позволяет определять пол журавлей по особенностям вокализации не ранее, чем в возрасте 8–12 месяцев, когда происходит “голосовое созревание” птиц (Walkinshaw, 1973). Показано, что самцы издают более низкие звуки, чем самки (Carlson, Trost, 1992; Брагина, Бёме, 2007), но чаще всего это можно установить только при исполнении унисональных криков в дуэте с брачным партнером (Archibald, 1976; Swengel, 1996). Определение пола у птенцов журавлей еще более затруднительно не только в связи с отсутствием морфометрических различий, но и различий в свистовых звуках (Кленова и др., 2005; 2008). Вместе с тем, проблема половой дифференциации птенцов чрезвычайно актуальна при разведении журавлей в ис-

кусственных условиях и для ведения племенных книг, поскольку большинство видов этих птиц являются редкими и охраняемыми как в России, так и в мире (Meine, Archibald, 1996).

Наиболее точная половая идентификация птиц, в том числе на ранних этапах онтогенеза, достигается с помощью анализа изменчивости генов, локализованных в половых хромосомах у гетерогаметных самок (кариотип WZ) и гомогаметных самцов (ZZ). Наиболее распространенными ДНК-маркерами пола у птиц являются ген хромохеликазы (Ellegren, 1996; Griffiths et al., 1996; 1998) и уникальная последовательность W-хромосомы EE0.6 (0.6 т.п.н. фрагмент *EcoRI*) (Ogawa et al., 1997; Itoh et al., 2001). Механизм определения пола с помощью маркера EE0.6 заключается в выявлении специфической последовательности фиксированного размера на W-хромосоме самок. При этом данный маркер содержит общий для самцов и самок Z/W внутренний контроль, являющийся частью экзона – консервативной последовательности сцепленного с полом гена (Itoh

et al., 2001). Таким образом, в полимеразной цепной реакции (ПЦР) у самцов амплифицируется один фрагмент ДНК известной длины, дающий на электрофореграмме однополосный спектр, а у самок — два ПЦР-продукта, один из которых совпадает по размеру с “мужским” фрагментом, а другой специфичен только для самок (двухполосный спектр).

Для молекулярной диагностики пола птенцов первых месяцев жизни забор крови представляет очевидный риск, поэтому неинвазивные методы получения материала — источника ДНК особенно важны. Капиллярные сосуды в аллантаоисе яйца являются частью кровеносной системы птенца — их сообщение с пупочными сосудами обеспечивает дыхательную и выделительную функции развивающегося эмбриона (Гилберт, 1993). После успешного вылупления птенца в подскорлуповой оболочке яйца остается редуцированный аллантаоис, часто с сохранившимися капиллярными сосудами, которые могут служить материалом для выделения ДНК (рис. 1). Об использовании сосудов аллантаоиса как источника ДНК для определения пола у эмбрионов и “новорожденных” птенцов известно из работ по домашним птицам (Turkuyilmaz et al., 2010; Vozkayaa et al., 2013). Сведения о применении этого метода у редких видов птиц, разводимых в искусственных условиях или размножающихся в природе, отсутствуют. Поскольку в центрах разведения журавлей существует практика сохранения и поддержания маркированных коллекций скорлупы яиц, мы обратили внимание на возможность использования таких коллекций для определения пола вылупившихся птенцов.

В течение четырех сезонов размножения (2009–2012 гг.) журавлей в Питомнике редких видов журавлей Окского государственного природного биосферного заповедника (далее — Питомник) мы тестировали методику молекулярного определения пола на 44 птенцах четырех видов журавлей с использованием капиллярных сосудов аллантаоиса (таблица). Аллантаоис яиц удалось взять для генетического анализа не от всех птенцов и не от всех содержащихся в Питомнике видов журавлей, поскольку во многих случаях родители съедали скорлупу сразу после вылупления птенцов. Всего доступными для работы оказались подскорлуповые оболочки 26 яиц стерха (*Grus leucogeranus* Pallas), четырех яиц серого журавля (*G. grus* L.) и одного яйца журавля-красавки (*Anthropoides virgo* L.). Кроме того, подскорлуповые оболочки 15 яиц японского журавля (*Grus japonensis* Muller) были получены со Станции реинтродукции редких видов птиц Хинганского государственного природного заповедника. В 2009–2012 гг. на Станцию реинтродукции были переданы яйца от

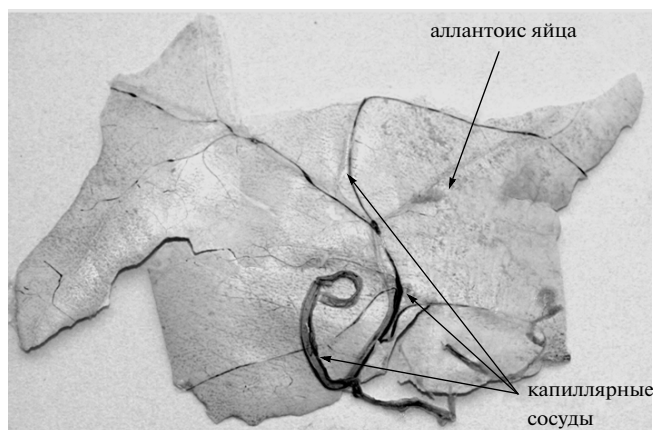
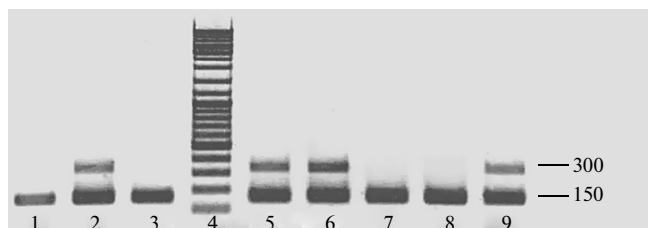


Рис. 1. Фотография аллантаоиса яйца японского журавля с капиллярными сосудами.

производителей японских журавлей Питомника для инкубации и выращивания птенцов с последующим их выпуском в природу на территории Амурской области — в пределах естественного гнездового ареала данного вида. Японский журавль и стерх — наиболее редкие в России виды журавлей, занесенные в Красную книгу Российской Федерации (I категория статуса) и Красный список Международного союза охраны птиц. Журавль-красавка и серый журавль — самые распространенные в России виды журавлей, однако охраняемые на региональном уровне в связи с угрозами местам их обитаний и, как следствие, сокращающейся численностью.

Выделение ДНК из препарированных капилляров аллантаоиса проводили с помощью ионообменной смолы Chelex100 (Walsh et al., 1991). В качестве маркера пола использовали последовательность EE0.6, амплифицированную с помощью комбинации праймеров А (AWS05/NRD4: 5'-CACCCCTGGATTGGACAACCTATTTC-3'; 5'-TCAGAGCACTCTTTCCAGGAA-3') и В (SINT-F/SINT-R: 5'-TAGGCTGCAGAATACAGCAT-3'; 5'-TTGTGCAGTTCTAGTCCATA-3'), адаптированную для журавлей (Bao et al., 2009a; 2009b) и протестированную нами ранее на разных видах журавлей с известным полом (Мудрик и др., 2011; Мудрик и др., 2013). Условия ПЦР были следующими: первичная денатурация при 94°C — 5 мин, далее 30 циклов, включающих денатурацию при 94°C — 50 с, отжиг праймеров при 57°C — 50 с, элонгацию при 72°C — 50 с, и завершающая элонгация при 72°C — 10 мин. Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 1.5% агарозном геле (буферная система TAE) при напряжении 120 В с последующим окрашиванием геля бромистым этидием и визуализацией ампликонов в ультрафиолетовом





**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации маркера пола EE0.6 (AB) у птенцов журавлей, родившихся в 2012 г. Порядок образцов: 1–3 – стерх; 4 – маркер длин фрагментов; 5, 6 – японский журавль, 7 – журавль-красавка; 8, 9 – серый журавль. Пол птенцов: 1, 3, 7, 8 – самцы, 2, 5, 6, 9 – самки. Числами обозначены размеры фрагментов в парах нуклеотидов.

свете с помощью системы гель-документации Kodak Edas 290.

Как и ожидалось, у птенцов всех четырех видов журавлей электрофоретический спектр EE0.6 самцов был представлен одним вариантом с молекулярным весом 150 пар нуклеотидов (п.н.), “женский” спектр – двумя полосами, 150 и 300 п.н. (рис. 2). В таблице приведены результаты

определения пола птенцов по годам. Так, за три года среди 26 стерхов идентифицировано поровну самок и самцов, среди 15 японских журавлей за четыре года – восемь самцов и семь самок, из четырех серых журавлей за три года – три самки и один самец, один птенец красавки, родившийся в 2012 г., оказался самцом. В целом за четыре года среди 44 птенцов четырех видов 23 были идентифицированы как самцы и 21 – как самки.

Таким образом, мы продемонстрировали, что неинвазивный метод идентификации пола птенцов по ДНК, выделенной из капиллярных сосудов аллантаоиса, позволяет определять пол журавлят сразу после их вылупления. Кроме того, данный метод может использоваться при ретроспективном установлении пола птиц, реинтродуцированных в природу, но после которых сохранилась скорлупа с подскорлуповыми оболочками.

Можно отметить также, что примененный нами ДНК-маркер пола EE0.6 эффективен не только в отношении видов журавлей, включенных в данную работу, но и для таких видов как черношейный (*G. nigricollis* Przewalski) (Bao et al., 2009b), даурский (*Grus vipio* Pallas) и черный (*G. monacha*

Результаты молекулярного определения пола у птенцов четырех видов журавлей в период 2009–2012 гг. с использованием ДНК, выделенной из капиллярных сосудов аллантаоиса после вылупления птенцов

Вид журавлей	Год рождения	Количество птенцов	Самцы	Самки
Стерх	2010	8	4	4
	2011	6	4	2
	2012	12	5	7
		<b>26</b>	<b>13</b>	<b>13</b>
Японский журавль	2009–2010	9	5	4
	2011	4	3	1
	2012	2	0	2
		<b>15</b>	<b>8</b>	<b>7</b>
Серый журавль	2010	1	0	1
	2011	1	0	1
	2012	2	1	1
		<b>4</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Журавль-красавка	2012	1	1	0
		<b>44</b>	<b>23</b>	<b>21</b>

Temminck) журавли (Бао et al., 2009b; Мудрик и др., 2013), а также впервые протестированные нами канадский (*G. canadensis* L.), индийский (*G. antigone* L.), восточный (*Balearica regulorum* Bennett) и западный (*B. pavonia* L.) венценосные журавли (Мудрик и др., 2013). Описанный неинвазивный метод позволяет определять пол птенцов и устанавливать соотношение полов не только у птиц, разводимых в искусственных условиях, но и у журавлей из природных популяций, при исследовании которых подскорлуповые оболочки являются более доступным материалом, чем кровь или свежие перья.

### БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа поддержана программами фундаментальных исследований Президиума РАН “Биологическое разнообразие” (подпрограмма “Генофонды и генетическое разнообразие”, 2010–2011 гг.) и “Живая природа” (подпрограмма “Динамика и сохранение генофондов”, 2012 г.), а также Евроазиатской региональной ассоциацией зоопарков и аквариумов (ЕАРАЗА) в рамках программы “Сохранение журавлей Евразии” (2012 г.).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брагина Е.В., Бёме И.Р. Половые и индивидуальные различия в вокальном репертуаре взрослых стерхов (*Grus leucogeranus*, Gruidae) // Зоологический журнал. 2007. Т. 86. № 12. С. 1468–1481.
- Гилберт С. Биология развития. М.: Мир, 1993. 228 с.
- Кленова А.В., Володин И.А., Володина Е.В., Кашенцева Т.А. Половые различия в свистовых звуках при дискорфорте у птенцов японского журавля // Орнитология. 2005. Т. 32. С. 105–111.
- Кленова А.В., Володин И.А., Володина Е.В., Кашенцева Т.А. Соотношение индивидуальных, половых и родственных различий в свистовых звуках птенцов японского журавля (*Grus japonensis*) в онтогенезе // Зоологический журнал. 2008. Т. 87. № 4. С. 458–465.
- Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Гамбург Е.А., Политов Д.В. Определение пола у десяти видов журавлей с помощью ДНК-маркера EE0.6 // Генетика. 2013. (в печати).
- Мудрик Е.А., Кашенцева Т.К., Политов Д.В. Определение пола журавлей с помощью сцепленных с полом ДНК-маркеров // Журавли Евразии (биология, распространение, миграция, управление). М., 2011. С. 126–127.
- Флинт В.Е. Семейство журавлиные – Gruidae. Птицы СССР, Курообразные, журавлеобразные. Л.: 1987. 266–335 с.
- Archibald G.W. The unison call of cranes as a useful taxonomic tool. Ithaca, 1976. 167 p.
- Bao W.B., Musa H.H., Luan D.Q., Zhang H.X., Chen G.H. Molecular method of sex identification in Siberian white crane (*Grus leucogeranus*) // Journal of Applied Animal Research. 2009a. V. 35. № 2. P. 169–172.
- Bao W.B., Wu S.L., Zhang H.X. Sex identification of seven species of cranes in China by PCR // Journal of Animal and Veterinary Advances. 2009b. V. 8. № 6. P. 1137–1140.
- Bozkayaa F., Gürlera Ş., Yertürkb M., Aydılekc N. Isolation of DNA from embryo and chorio-allantoic membranes and sexing by PCR in Japanese quail // British Poultry Science. 2013. V. 54. № 1. P. 106–111.
- Carlson G., Trost C.H. Sex determination of the Whooping Crane by analysis of vocalizations // Condor. 1992. V. 94. № 532–536.
- Ellegren H. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of nonratite birds // Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences. 1996. V. 263. № 1377. P. 1635–1641.
- Griffiths R., Daan S., Dijkstra C. Sex identification in birds using two CHD genes // Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences. 1996. V. 263. № 1374. P. 1251–1256.
- Griffiths R., Double M.C., Orr K., Dawson R.J.G. A DNA test to sex most birds // Molecular Ecology. 1998. V. 7. № 8. P. 1071–1075.
- Itoh Y., Suzuki M., Ogawa A., Munechika I., Murata K., Mizuno S. Identification of the sex of a wide range of carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences // Journal of Heredity. 2001. V. 92. № 4. P. 315–321.
- Meine C.D., Archibald G.W. The cranes: Status survey and conservation action plan. IUCN, Gland, Switzerland, and Cambridge, UK, 1996. 294 p.
- Ogawa A., Solovei I., Hutchison N., Saitoh Y., Ikeda J., Macgregor H., Mizuno S. Molecular characterization and cytological mapping of a nonrepetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing Carinatae birds // Chromosome Res. 1997. V. 5. P. 93–101.
- Swengel S.R. Sex determination // Crane: Their Biology, Husbandry, and Conservation (ed. by D.H. Ellis). Washington, 1996. P. 223–231.
- Turkyilmaz M.K., Karagenc, L., Fidan, E. Sexing of newly-hatched chicks using DNA isolated from chorio-allantoic membrane samples by polymerase chain reaction in Denizli chicken // British Poultry Science. 2010. V. 51. № 4. P. 525–529.
- Walkinshaw L.H. Cranes of the world. New York: Winchester Press, 1973. 370 p.
- Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material // Biotechniques. 1991. V. 10. № 4. P. 506–513.

## Non-Invasive Method of Sex Identification of Crane Chicks by the DNA from Capillary Vessels of Allantois

E. A. Mudrik<sup>a</sup>, T. A. Kashentseva<sup>b</sup>, E. A. Gamburg<sup>a</sup>, E. Yu. Gavrikova<sup>c</sup>, and D. V. Politov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup> Crane Breeding Centre, Oka State Nature Reserve, Brykin Bor, Spassk district, Ryazan oblast, 391072 Russia

<sup>c</sup> Reintroduction Station of Rear Birds, Khinganskii State Nature Reserve, Arkhara, Amur oblast, 675740 Russia

e-mail: mudrik@vigg.ru

Received February 27, 2013; in final form, April 11, 2013

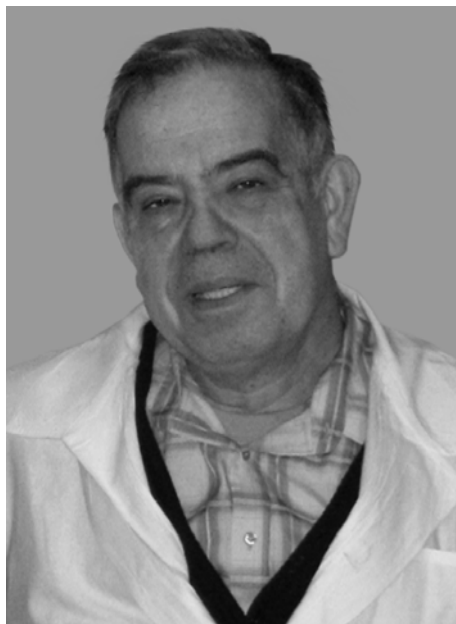
**Abstract**—The non-invasive method of determining the sex of chicks after hatching based on the DNA isolated from capillary vessels of allantois of the egg-shell membranes was demonstrated on four crane species (Gruinae, Aves), which were bred in the Crane Breeding Centre of the Oka Nature Reserve in 2009–2012. Using the EE0.6 molecular marker of sex, the gender of 26 Siberian (*Grus leucogeranus*), 15 Red-crowned (*G. japonensis*), 4 Common (*G. grus*) and 1 Demoiselle (*Anthropoides virgo*) crane chicks was identified. This method can be recommended for determining the sex of chicks and the ratio of sexes in cranes that reproduce both in captivity and natural populations.

**Keywords:** cranes, sex identification, allantois, egg-shell membrane, DNA, non-invasive molecular methods

УДК 591

## ВАЛЕРИЙ ИВАНОВИЧ СТАРОСТИН (1939–2012)

DOI: 10.7868/S0475145013040022



16 декабря 2012 г. ушел из жизни выдающийся специалист в области биологии развития, заведующий лабораторией гистогенеза Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, доктор биологических наук Валерий Иванович Старостин.

Валерий Иванович Старостин родился 31 октября 1939 г. в г. Харькове. Детские годы провел в г. Ашхабаде, где окончил среднюю школу. В 1956 г. поступил на биолого-почвенный факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, который окончил в 1961 г.

По окончании Университета В.И. Старостин работал старшим лаборантом в 1-м Московском медицинском институте им. Н.М. Сеченова. С 1962 по 1965 гг. учился в аспирантуре на кафедре гистологии и эмбриологии Университета дружбы народов им. П. Лумумбы. С 1965 по 1967 гг. работал ассистентом кафедры гистологии и эмбриологии 1-го Московского медицинского института. С 1967 по 1971 гг. был младшим научным сотрудником Института медико-биологических проблем МЗ СССР. В 1967 г. защитил кандидатскую диссертацию на тему “Реактивные изменения элементов соединительной ткани и крови в очаге асептического воспаления при введении некоторых нейротропных фармакологических смесей”.

С 1971 г. научная деятельность Валерия Ивановича Старостина связана с Институтом биологии

развития им. Н.К. Кольцова РАН, где он прошел путь от младшего научного до ведущего научного сотрудника. В 1986 г. защитил докторскую диссертацию “Органные и тканевые основы кроветворения”. В 2010 г. В.И. Старостин возглавил лабораторию гистогенеза, сменив на этом посту академика Н.Г. Хрушова.

В.И. Старостин сумел сохранить и продолжить богатые научные традиции и направление работы лаборатории – разработку фундаментальной проблемы гистогенеза рыхлой соединительной ткани, а именно, происхождения и дифференцировки мезенхимных стромальных (МСК) и кроветворных клеток. Его отличали глубокие фундаментальные познания и уважение к традициям классической гистологии, да и сам он был великолепным гистологом. Для исследований, проводимых В.И. Старостиным, были характерны оригинальная постановка экспериментов, использование многообразных моделей и современных методических приемов.

Научные интересы В.И. Старостина были связаны в первую очередь с гистогенезом соединительной и кроветворной тканей. Он был одним из крупнейших в нашей стране специалистов в области исследования МСК и их взаимодействия с кроветворными клетками на разных стадиях индивидуального развития. Проблемы взаимоотно-

шения кроветворных и стромальных клеток были отражены им в коллективной монографии “Стволовые клетки крови” (1988). Непосредственно Валерием Ивановичем и под его руководством были получены новые данные о структуре гистогенетического ряда МСК, их возрастных и органных особенностях и потенциях к дифференцировке в различных экспериментальных системах *in vivo* и *in vitro*. Проводимые с его участием исследования влияния сверхмалых доз ионизирующего излучения на строму костного мозга выявили феномен радиационного гормезиса, который для этой клеточной системы был обнаружен впервые. Этот факт послужил еще одним подтверждением несостоятельности господствующей до недавнего времени парадигмы о беспороговом эффекте радиации малой интенсивности.

Научные интересы Валерия Ивановича не ограничивались исследованием только стромальных клеток. В частности, в последние годы он занялся проблемой малоизученных аспектов скелетного миогенеза, а именно характеристикой эктопических миогенных клеток-предшественников, локализованных в мышечных органах. Он был автором более 100 научных работ, опубликованных в отечественных и зарубежных изданиях.

Огромная эрудиция биолога и поистине энциклопедические знания в других областях науки заслужили ему глубочайшее уважение всех, кто нуждался в его консультациях и советах.

Много сил и времени В.И. Старостин отдавал подготовке молодых ученых, стараясь передать

им свои знания и привить широту мышления, раскрывая перспективы той области исследования, которой они занимались. Под его руководством были защищены четыре кандидатских диссертации. Продолжительное время он вел практические занятия и читал лекции для студентов МГУ и РУДН. Требовательность к ученикам и коллегам сочеталась у него с неизменной доброжелательностью, внимательным и чутким отношением, готовностью помочь.

Все, кто общался с Валерием Ивановичем, отмечали неординарность его суждений и тонкую иронию. Он был прекрасно образованным человеком, знавшим несколько иностранных языков и обладавшим обширными познаниями в самых разнообразных областях (география, военная история, литература и др.).

Уход Валерия Ивановича стал огромной, невосполнимой потерей для Института и всей биологической науки. Мы сделаем все возможное, чтобы продолжить дело, которому он посвятил всю свою жизнь. Светлая память замечательному человеку и ученому.

Сотрудники Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

*Е.И. Домарацкая*  
*О.В. Паюшина*  
*Н.Н. Буторина*  
*Э.И. Буеверова*  
*Т.М. Никонова*

---

Сдано в набор 13.05.2013 г.	Подписано к печати 01.08.2013 г.	Дата выхода в свет 23.09	Формат 60 × 88 <sup>1</sup> / <sub>8</sub>
Цифровая печать	Усл. печ. л. 10.0	Усл. кр.-отт. 1.0 тыс.	Уч.-изд. л. 9.75
	Тираж 98 экз.	Зак. 1575	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