	Название статьи	Страницы	Цит.
	БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ		
☐	ПАТТЕРНЫ ЭКПРЕССИИ ГЕНОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИХ ДЛЯ ЛИНИИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК, В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА СВЯЗАНЫ С РЕГУЛЯЦИЕЙ БАЗОВОГО И ПЕРВИЧНОГО СТАТУСОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Хайдуков С.В.	403-424	3
	МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ		
☐	ВЛИЯНИЕ ОКСИДА АЗОТА НА ЭКСПРЕССИЮ АПОПТОЗНЫХ ГЕНОВ И HSP70 У ДРОЗОФИЛЫ Джансугурова Л.Б.	425-438	0
	КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ		
☐	ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА НА МИГРАЦИЮ НЕЙРОНОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ГОНАДОТРОПИН-РИЛИЗИНГ ГОРМОН, В ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ КРЫС Шарова В.С., Извольская М.С., Воронова С.Н., Захарова Л.А.	439-446	3
	МЕДИЦИНСКАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ		
☐	ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА В СПЕРМАТОЗОИДАХ ЧЕЛОВЕКА КОРРЕЛИРУЕТ СО СНИЖЕНИЕМ ЧАСТОТЫ ФОРМИРОВАНИЯ БЛАСТОЦИСТ И ЧАСТОТЫ ИМПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ ПРИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОМ ОПЛОДОТВОРЕНИИ Цибизов А.С., Абдулмеджидова А.Г., Краснопольская К.В., Гаджиева З.С., Кущ А.А.	447-452	1
	ЭМБРИОГЕНЕЗ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ		
☐	ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ, МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ IAR-2, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ОНКОГЕНОМ RAS: ВКЛАД БЕЛКА МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ Е-КАДХЕРИНА Житняк И.Ю., Глушанкова Н.А.	453-464	5
	ФИЗИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ		
☐	СРЕДНЕЕ УХО МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ОНТОГЕНЕЗЕ Солнцева Г.Н.	465-480	0

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 6, с. 403–424

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

УДК 57.017.6; 57.085.23; 57.032;616-006.2.04

ПАТТЕРНЫ ЭКПРЕССИИ ГЕНОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИХ ДЛЯ ЛИНИИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК, В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА СВЯЗАНЫ С РЕГУЛЯЦИЕЙ БАЗОВОГО И ПЕРВИЧНОГО СТАТУСОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

© 2011 г. О. Ф. Гордеева, Н. В. Лифанцева, С. В. Хайдуков*

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

**Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН*

117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.06.11 г.

Окончательный вариант получен 24.06.11 г.

Одним из основных критериев плюрипотентного потенциала клеточных линий является их способность дифференцироваться в линию половых клеток. Линии плюрипотентных стволовых клеток с базовым статусом (ground state) плюрипотентности отличаются от линий с первичным статусом (primed state) способностью обеспечивать развитие полноценных гамет. С целью определения молекулярных механизмов, вовлеченных в регуляцию различных статусов плюрипотентности, мы исследовали паттерны экспрессии генов, участвующих в регуляции развития линии половых клеток, в плюрипотентных стволовых клетках различных типов и клетках эмбриональных тератокарцином мыши и человека. Было установлено, что плюрипотентные стволовые клетки *in vitro* и в бластоцисте, а также гоноциты на стадии E13.5 имеют сходные профили экспрессии в отличие от клеток эпибласта на стадии E6.5. Количественный ПЦР-анализ в реальном времени показал, что ген *Vasa/Ddx4* экспрессируется в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека на более низком уровне, чем в бластоцисте и гоноцитах. Кроме того, уровни экспрессии генов *Vasa/Ddx4* и *E-ras* значительно выше в эмбриональных стволовых клетках мыши, чем в эмбриональных стволовых клетках человека. При культивировании дифференцирующихся эмбриональных стволовых клеток и эмбриональных герминативных клеток мыши, а также клеток эмбриональных тератокарцином мыши в системе культивирования, способствующей репрограммированию клеток от первичного (primed) к базовому (ground) статусу плюрипотентности (2i + LIF), мы обнаружили, что только плюрипотентные клетки способны регулировать уровни экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx4*, восстанавливая исходный статус, тогда как в клетках эмбриональных тератокарцином уровни экспрессии генов практически не изменяются. Мы предполагаем, что паттерны экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в частности гена *Vasa/Ddx4*, могут быть вовлечены в регуляцию базового и первичного статусов плюрипотентности.

Ключевые слова: плюрипотентные клетки, эмбриональные стволовые клетки, тератокарцинома, линия половых клеток, бластоциста, ground state, *Vasa*, *Oct4*, *E-ras*.

Плюрипотентные клетки млекопитающих участвуют в формировании всех типов клеток развивающегося организма и некоторых внезародышевых структур. Для исследования механизмов раннего развития млекопитающих широко используются модели *in vitro* – постоянные клеточные линии плюрипотентных стволовых клеток. Для получения линий плюрипотентных стволовых клеток были разработаны технологические подходы, заключающиеся в культивировании и размножении *in vitro* плюрипотентных клеток доимплантационных эмбрионов или первичных половых клеток разных стадий развития, а также в экспериментальном репрограммировании соматических и половых клеток взрослых организмов до плюрипотентного статуса (Gordeeva, 2010). Различные линии плюрипотентных стволовых клеток обладают сходными биологическими свойствами, однако клетки линий разных видов, а также линий, полученных с помощью разных методов, проявляют существенные различия в регуляции их статуса, в потенциале к дифференцировке и канцерогенезу (Adewumi et al., 2007; Okita et al., 2007; Sharova et al., 2007; Chin et al., 2010; Guenther et al., 2010).

Одним из основных критериев плюрипотентности полученных клеточных линий является их способность дифференцироваться в линию половых клеток. Однако установлено, что не все линии способны обеспечивать развитие полноценных гамет у химерных животных (Hayashi, Surani, 2009). Кроме того, этот критерий не применим для тестирования плюрипотентных стволовых клеток чело-

века. Было показано, что линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека отличаются от линий плюрипотентных стволовых клеток мыши, но сходны с линиями стволовых клеток эпибласта мыши, которые получены из более поздней популяции плюрипотентных клеток эмбрионов (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Известно, что линии стволовых клеток эпибласта мыши способны дифференцироваться только в соматические клетки, но не способны участвовать в развитии линии половых клеток (Guo et al., 2009). Восстановление потенциала стволовых клеток эпибласта мыши до плюрипотентного статуса, а именно способности формировать линию половых клеток, возможно при усилении экспрессии гена *Klf4* или при ингибировании GSK3- и ERK/MAPK-киназ (Guo et al., 2009; Silva et al., 2008; Ying et al., 2008). На основе полученных фактов было предложено различать статусы линий плюрипотентных стволовых клеток. Так, линии ЭСК мыши соответствуют базовому статусу плюрипотентности (ground state), а линии стволовых клеток эпибласта мыши и ЭСК человека – первичному статусу (primed state) (Nichols, Smith, 2009).

Линии плюрипотентных эмбриональных герминативных клеток (ЭГК) были получены из первичных половых клеток разных стадий развития (от E8.5 до E13.5), которые являются более поздней эмбриональной популяцией коммитированных клеток. Однако в отличие от клеток эпибласта при получении линий ЭГК не требуется дополнительных манипуляций для стабилизации базового статуса плюрипотентности. Эти факты свидетельствуют о большем сходстве генных регуляторных сетей плюрипотентных клеток бластоцисты и первичных половых клеток в отличие от клеток эпибласта. Однако молекулярные механизмы, обеспечивающие конверсию первичных половых клеток в плюрипотентные клетки, практически не исследованы (Resnick et al., 1992; Stewart et al., 1994; Hayashi, Surani, 2009).

Стоит отметить, что значительно раньше, чем были получены первые линии плюрипотентных стволовых клеток из бластоцисты, из опухолей семенников и яичников были выделены линии клеток эмбриональных тератокарцином (ЭТК), которые были способны дифференцироваться в эмбриональные клетки различных типов. Эти трансформированные клеточные линии фактически являются первыми линиями "псевдоплюрипотентных" стволовых клеток, подвергшихся аномальному репрограммированию *in vivo* (Kleinsmith, Pierce, 1964). Кроме того, многочисленные исследования показали, что при адаптации и длительном культивировании *in vitro* в ЭСК и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках происходят генетические и эпигенетические изменения, способствующие их онкогенной трансформации (Mayshar et al., 2010; Laurent et al., 2011). В некоторых трансформированных линиях ЭСК снижается потенциал к дифференцировке, а нуллипотентные линии ЭТК вообще утрачивают способность спонтанно дифференцироваться (Hovatta et al., 2010). Таким образом, при трансформации плюрипотентных клеток может происходить изменение статуса от плюрипотентного до нуллипотентного.

Несмотря на интенсивные исследования плюрипотентных стволовых клеток различного происхождения, вопросы эквивалентности их статуса и потенциала к дифференцировке, сходства механизмов поддержания базового и первичного статуса плюрипотентности, обеспечения баланса пролиферации и дифференцировки, а также способности к онкогенной трансформации остаются открытыми. С целью определения молекулярных механизмов, вовлеченных в регуляцию различных фаз плюрипотентности, мы исследовали паттерны экспрессии генов, участвующих в регуляции развития линии половых клеток, в различных типах плюрипотентных стволовых клеток и клеток ЭТ мыши и человека. Мы изучили также возможность реверсии фенотипа и изменения паттернов генной экспрессии дифференцирующихся ЭСК и ЭГК, а также ЭТК мыши в системе культивирования, способствующей репрограммированию клеток от первичного (primed) к базовому (ground) статусу плюрипотентности

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток in vitro. В работе были использованы ЭСК мыши линий R1 и CCE, а также ЭГК мыши линий EGC-10 и EG-12.5, любезно предоставленные доктором А. Макларен (A. McLaren, WTCR Institute of Cancer and Developmental Biology, Cambridge, UK). Линии ЭСК человека ESM01, ESM02 и ESM03 любезно предоставлены проф. Г.П. Георгиевым (Институт биологии гена РАН, Москва). ЭТК мыши линий F9 и P19 и ЭТК человека линии PA-1, а также культуры первичных эмбриональных фибробластов человека (ЭФ) получены из Российской коллекции клеточных культур (Банк клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Все плюрипотентные клеточные линии мыши и человека, а также линии ЭТК культивировали в среде DMEM, содержащей 1 мМ L-глутамина, 0.1 мМ заменимых аминокислот, 0.1 мМ β-меркаптоэтанола и 15% телячьей фетальной сыворотки ("HyClone", США). Для линий ЭСК человека вместо сыворотки в среду добавляли 15% заменителя телячьей фетальной сыворотки (Knockout Serum Replacement, "Gibco", США) и 10 нг/мл основного фактора роста фибробластов человека ("Invitrogen", США). Недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки мыши и человека поддерживали на фидере из первичных эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ), инактивированных митомицином С

(10 мкг/мл) (“Sigma”, США). ЭСК и ЭГК мыши культивировали в бесфидерной системе, добавляя в среду фактор ингибирования лейкемии (leukemia inhibitory factor, LIF) (10 нг/мл) (“Sigma”, США).

Для получения эмбриоидных тел, формируемых клетками линий R1, CCE, EGC-10, EG-12.5, F9, P19 и PA-1, использовали метод “висячей капли”, описанный ранее (Гордеева и др., 2009). Эмбриоидные тела (ЭТ) из ЭСК человека получали при механическом разделении колоний недифференцированных клеток. Кластеры клеток культивировали в планшетах для суспензионного культивирования (“Greinerbio”, Германия) в течение последующих 5 сут (ЭТ5).

Для изучения процессов репрограммирования, ЭТ линий R1 и EG-12.5 на 3-и сут развития (ЭТ3) и монослойные клеточные культуры линий F9 и P19 (плотностью 5 тыс. клеток/см^2) на 2-е сут после посева культивировали в течение 48 ч в среде с добавлением фактора LIF, а также ингибиторов GSK3-киназы BIO (2.5 мкМ) и MEK/ERK-протеинкиназы PD 98059 (50 мкМ) (“Sigma”, США). Число клеток, выросших в среде с LIF и в коктейле ингибиторов с LIF (условия 2i + LIF), подсчитывали через 48 ч и анализировали с помощью проточной цитометрии. Статистический анализ проводили с использованием ANOVA и парного критерия Стьюдента.

Анализ клеточного цикла с помощью проточной цитометрии. Суспензию клеток фиксировали холодным 70%-ным этанолом, затем промывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали в течение 30 мин в фосфатно-солевом буфере, содержащем иодид пропидия (20 мкг/мл, “Molecular Probes”, США) и РНКазу А (200 мкг/мл, “Fermentas”, Литва). Пробы анализировали с помощью проточного цитометра Cytomics FC500 (“Beckman Coulter”, США), просчитывая 5000–10000 клеток в образце. Анализ гистограмм проводили с использованием программы MultiCycle AV Software (“Phoenix Flow Systems”, США).

Получение образцов тканей эмбрионов и половозрелых мышей. В работе использовали мышей линии C57Bl/6 из питомника лабораторных животных НПП “Пущино” ФИБХ РАН. Исследовали бластоцисты (стадия E4.5), эпибласты с удаленными оболочками и плацентами (E6.5), зачатки гонад вместе с мезонефросами (E10.5) и семенники зародышей (E13.5), а также органы взрослых животных в возрасте 3–4 мес.

Получение аутопсийного материала тканей человека. Разрешение на изъятие материала для исследований было получено в Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения г. Москвы. Процедуры по изъятию образцов аутопсийного материала проводили в Судебно-медицинском морге № 2 г. Москвы врачи-патологоанатомы в соответствии с биоэтическими требованиями и с соблюдением закона Российской Федерации “О погребении и похоронном деле”. Получение образцов тканей семенника человека проведено в ходе стандартного патолого-медицинского исследования трупов мужчин, погибших насильственно и не имевших при жизни хронических патологий. Объем образца семенника (не более 1–2 мл) помещали в лизирующий раствор для экстракции РНК Trizol (“Invitrogen”, США). Выделение тотальной РНК проводили в день аутопсии.

Получение тератом и тератокарцином in vivo. Для получения экспериментальных тератом и тератокарцином в качестве реципиентов были использованы иммунодефицитные мыши линии Nude (Nu/Nu) в возрасте 5–7 мес из питомника лабораторных животных НПП “Пущино” ФИБХ РАН. Экспериментальным животным трансплантировали 1 млн клеток подкожно. Развившиеся тератомы и тератокарциномы извлекали через 3–12 нед после инъекции клеток. Образцы опухолей использовали для дальнейших исследований. Для гистологических исследований образцы опухолей фиксировали в фиксаторе Буэна. Гистологические срезы подготавливали с помощью стандартных процедур. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, а затем исследовали с помощью системы анализа микроскопических изображений Leica DMRXA2 (Германия).

Гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы. Клетки фиксировали 3%-ным раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (“Sigma”, США) в течение 15–20 мин. После промывки в фосфатно-солевом буфере образцы инкубировали в растворе, содержащем 10 мл 0.02 М буфера *трис*-HCl (pH 8.6), 1 мг нафтола AS-BI-фосфата и 5 мг красителя Fast Red-TR (“Sigma”, США), в течение 30–40 мин при температуре 37°C.

Иммуногистохимический анализ. Экспрессию специфических белков в клеточных культурах выявляли с помощью иммунофлуоресцентного анализа по методике, описанной ранее (Гордеева и др., 2009). Для выявления экспрессии белков Oct4 и Vasa использовали антитела кролика к этим белкам в разведениях 1 : 150 (“Santa Cruz Biotechnology”, США; “Abcam”, Великобритания). В качестве вторичных антител использовали антитела цыпленка против кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированные флуорохромами Alexa 596, в разведении 1 : 900 (“Molecular Probes”, США). Препараты докрашивали флуоресцентным красителем DAPI для визуализации клеточных ядер. Контрольные препараты обрабатывали так же, как и опытные образцы, исключая добавление первичных антител. В качестве отрицательного клеточного контроля были использованы первичные эмбриональные фибробласты мыши, в качестве положительного – срезы семенников взрослых мышей. Для получения криосрезов семенники фиксировали 4%-ным параформальдегидом, промывали фосфатно-со-

Таблица 1. Структура праймеров, используемых для анализа генной экспрессии в клеточных линиях и эмбрионах мыши

Ген	№ последовательности	Прямой и обратный праймеры	Размер, п.о.
Oct4/Pou5f1	NM_013633.2	5'caccctgggcgttctctttg3' 5'gttctcattgttgtcggcttcc3'	142
Nanog	NM_028016	5'caagcggtggcagaaaaac3' 5'tggataagagcacccgactg3'	702
Stella/Dppa3	NM_139218.1	5'agagaagggtccgcactttg3' 5'ttcccgattttcgcattctc3'	193
Fragillis/Ifitm3	NM_025378.2	5'tgctccgcaccatgaaccac3' 5'gtgaagcacttcaggaccgg3'	460
Dazl	NM_010021.4	5'gccagcactcagtcttcatc3' 5'gttggaggctgcatgtaagt3'	419
Vasa/Ddx4	NM_010029.2 NM_001145885.1	5'aggaatgccatcaaaggaacaac3' 5'gcccaacagcgacaaacaag3'	118
C-kit	NM_001122733.1 NM_021099.3	5'atgaagcctggcgtttccta3' 5'ctggctgccaaatctctgtg3'	218
Blimp1/Prdm1	NM_007548.3	5'acacagttcccaagaatgcca3' 5'gaagggtgaaatgttggaacg3'	510
Scp3	NM_011517.2	5'gctgatgaaaaggctccagt3' 5'cgaacatttfccatctcttg3'	553
E-ras	NM_181548.2	5'gcctacaaagtctagcatcttgg3' 5'cgaagcattggtgagtcatctg3'	191
Gata4	NM_008092	5'tctcactatgggcacagcag3' 5'gggacagcttcagagcagac3'	100
Hprt	NM_013556	5'cgttgggcttacctcactgctttc3' 5'ggtcataacctggttcatcatcgctaatc3'	150

левым буфером, импрегнировали раствором сахарозы (20%) и замораживали в среде Tissue-freezing medium (“Leica”, Германия) при температуре –20°С. Криосрезы были приготовлены на криостате Leika CM 1900. Иммуногистохимический анализ на срезах семенников проводили по описанному выше протоколу для клеточных культур. Регистрацию специфического окрашивания и фотографирование препаратов проводили с использованием системы анализа изображений Leika DMRXA2.

Анализ генной экспрессии. Для анализа экспрессии изучаемых генов выделяли тотальную РНК из недифференцированных и дифференцированных плюрипотентных и тератокарциномных клеток, из тканей эмбрионов и взрослых животных, используя смесь Trizol (“Invitrogen”, США). Для предотвращения контаминации ДНК все образцы тотальной РНК обрабатывали ДНКазой (TurboDNA kit, “Ambion”, США) по протоколу производителя. Синтез кДНК библиотек проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV и олиго$(dT)_{18}$-праймеров (“Fermentas”, Литва). Для реакции синтеза кДНК использовали 1 мкг тотальной РНК для каждого образца. ПЦР-анализ экспрессии изучаемых генов проводили на амплификаторе “Eppendorf” (Германия) по следующей программе. Предварительная денатурация: 94°С – 5′; отжиг праймеров: 58°С – 45″; удлинение цепи: 72°С – 45″; денатурация 94°С – 45″, 35 циклов; завершающее удлинение цепи: 72°С – 5′. Специфические праймеры были сконструированы на основе данных о структуре исследуемых генов в базах данных GenBank, MGI и Ensemble (табл. 1, 2). Продукты ПЦР-анализа фракционировали в агарозном геле. Результаты электрофореза регистрировали с помощью трансиллюминатора (“Bio-Rad”, США).

Количественный анализ генной экспрессии проводили на амплификаторе “Applied Biosystems 7500” (США) с использованием набора для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green (“Синтол”, Россия) по следующему протоколу. Предварительная денатурация: 94°С – 5′; отжиг праймеров и элонгация: 60°С – 45″; денатурация 94°С – 15″, 40 циклов. Уровень флуоресценции детектировали при 60°С в каждом цикле. Для всех ПЦР продуктов был проведен анализ кривых плавления для исключения образования нескольких ампликонов. Каждый эксперимент был проведен в трех повторах. Уровень экспрессии генов в каждом образце был нормализован к уровню экспрессии мРНК гена гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфера-

Таблица 2. Структура праймеров, используемых для анализа генной экспрессии в линиях эмбриональных стволовых и тератокарциномных клеток человека

Ген	№ последовательности	Прямой и обратный праймеры	Размер, п.о.
OCT4/POU5F1	NM_002701 NM_203289	5'cgaaagagaaagcgaaccagtatc3' 5'acccagcagcctcaaaatcc3'	220
NANOG	NM_024865	5'tgcctcacacggagactgtc3' 5'ctgcgtcacaccattgctattc3'	386
DPPA3	NM_199286	5'gcctagtgttgtgtcaagac3' 5'ggtgcaagaataagatttatggc3'	520
IFITM3	NM_003641	5'ccatgtcgtctggtccctgt3' 5'gaatgacactgtagacaggtg3'	410
DAZL	NM_001351	5'catcctcctccaccacagtt3' 5'aagcattgcccgacttcttc3'	480
VASA/DDX4	NM_001166534.1 NM_001166533.1 NM_024415.2 NM_001142549.1	5'gcccaggaatgccatcaaag3' 5'acggtctgctgaacatctctac3'	160
C-KIT	NM_000222.2 NM_001093772.1	5'ttccttgttgaccgctcctt3' 5'caacgttgcctgacgttcat3'	474
BLIMP1/PRDM1	NM_182907.1 NM_001198.3	5'ctacccttatcccggagagc3' 5'gtacgaggggatgaaagctg	592
SCP3	NM_001177949.1 NM_001177948.1 NM_153694.4	5'gggggtgaagtgcagaatatg3' 5'ctcttgctgctgagtttcca3'	471
E-RAS	NM_181532.2	5'cttgcttcttctcttcccacttg3' 5'gctgcctgccaacatccc3'	184
GATA4	NM_002052	5'gatgggacgggtcactatctg3' 5'ggcagttggcacaggagag3'	160
HPRT	NM_000194.2	5'aagatggtcaaggtcgcaagc3' 5'gaagtattcattatagtcaagggcatatcc3'	132

зы (HPRT). Относительный уровень мРНК был рассчитан с помощью сравнительного Ct-метода (ABI Relative Quantification Study software, Applied Biosystems, США). Для определения статистически значимых различий между относительными уровнями экспрессии генов в образцах был проведен анализ вариаций (ANOVA). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы изучали паттерны экспрессии генов, которые являются ключевыми регуляторами детерминации и специализации линии половых клеток у млекопитающих. В изучаемый транскрипционный профиль также были включены гены транскрипционных факторов *Oct4* и *Nanog*, являющиеся основными регуляторами плюрипотентного статуса и также экспрессирующиеся в линии половых клеток (Pesce, Schöler, 2001; Rilianawati et al., 2003; Kehler et al., 2004; Lacham-Kaplan, 2004; Cauffman et al., 2005; Saitou et al., 2005). Мы изучали экспрессию следующих генов:

Stella/Dppa3 (Developmental pluripotency-associated 3) и *Fragilis/Ifitm3 (interferon induced transmembrane protein 3)*, активных в самых ранних предшественниках первичных половых клеток в развивающемся эпибласте (E6.5–E7.5) (Saitou et al., 2002);

Dazl/Tpx2 (Deleted in azoospermia-like), экспрессирующегося на всех стадиях развития половых клеток, а также в доимплантационных эмбрионах (Cauffman et al., 2005; Reynolds, Cooke, 2005; Reynolds et al., 2005, 2007);

Blimp1/Prdm1 (PR domain containing 1, with ZNF domain), который является одним из ключевых регуляторов, обеспечивающих ограничение программы развития линий соматических клеток в предгаструляционном эпибласте (Ohinata et al., 2005);

Vasa/Mvh/Ddx4 (DEAD-box polypeptide 4), экспрессирующегося на всех стадиях развития линии половых клеток от стадии мигрирующих первичных половых клеток до стадий пахитенных сперматоцитов в семенниках и первичных ооцитов самок у половозрелых животных (Tanaka et al., 2000; Toyooka et al., 2000; Reynolds et al., 2005);

Scp3 (Synaptonemal complex protein 3) – одного из регуляторов мейоза (Reynolds et al., 2007);

E-ras (ES cell-expressed Ras), который является специфическим регулятором пролиферации плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*, а также первичных половых клеток *in vivo* (Takahashi et al., 2003).

Кроме того, мы исследовали характер экспрессии гена *Gata4*, специфически экспрессирующего-

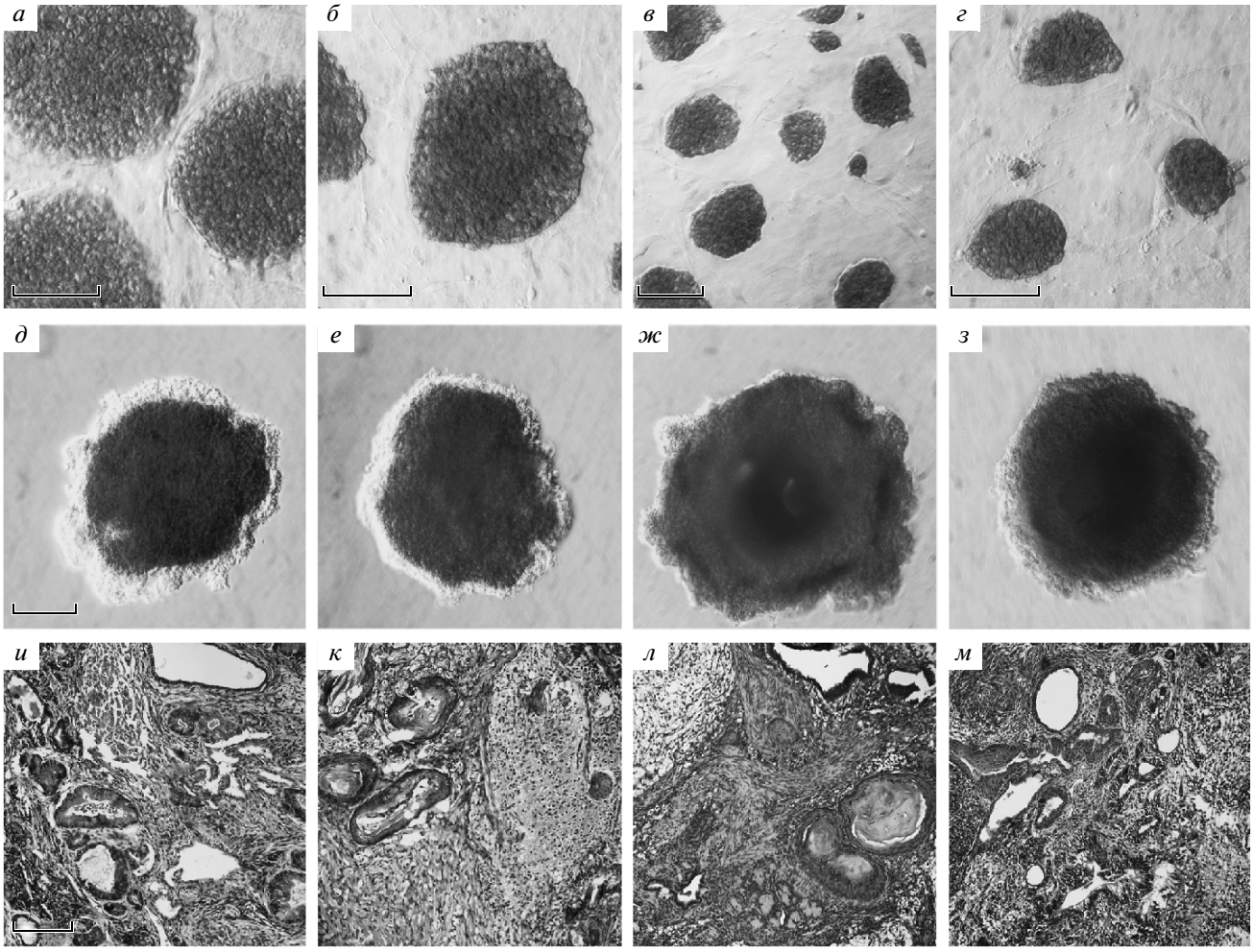


Рис. 1. Линии плюрипотентных стволовых клеток мыши: ЭСК линий R1 (*а*, *д*, *и*) и ССЕ (*б*, *е*, *к*) и ЭГК линий EGC-10 (*в*, *ж*, *л*) и EG-12.5 (*г*, *з*, *м*). Активность щелочной фосфатазы в недифференцированных клетках колоний и эмбриоидных тел (*а*–*з*), формируемых плюрипотентными клетками на начальных стадиях дифференцировки. Срезы тератом, развившихся после трансплантации в организм взрослых иммунодефицитных мышей Nude плюрипотентных клеток линий R1 (*и*), ССЕ (*к*), EGC-10 (*л*) и EG-12.5 (*м*). Масштаб: 100 мкм.

ся в клетках внезародышевой энтодермы на самых ранних стадиях развития плюрипотентных клеток, для изучения динамики ранней дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток различных линий (Zhang et al., 2007).

Изучение паттерна экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в ЭСК и ЭГК мыши. Используемые линии ЭСК ССЕ, R1 и ЭГК EGC-10, EG-12.5 являются плюрипотентными клеточными линиями и способны участвовать в развитии соматических и половых клеток химерных животных (Nagy et al., 1993; Wood et al., 1993; McLaren, Durcova-Hills, 2001; Durcova-Hills et al., 2003). В наших экспериментах эти клеточные линии сохраняли способность спонтанно дифференцироваться *in vitro* и *in vivo* в клетки в различных типов (рис. 1). Линии ЭСК и ЭГК, поддерживаемые в бесфидерной системе с добавлением фактора LIF, практически не различались по скорости роста и времени удвоения популяции. Анализ распределения клеток по стадиям клеточного цикла с помощью проточной цитометрии показал, что линии ЭСК и ЭГК имеют аналогичную структуру клеточного цикла с преимущественным накоплением клеток в *S*-фазе (рис. 2).

Изучение экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, показало, что все исследуемые плюрипотентные клеточные линии имели практически идентичные паттерны экспрессии этих генов (рис. 3). В недифференцированных ЭСК R1, ССЕ и ЭГК EGC-10, EG-12.5, а также в ЭТ1 и ЭТ5 экспрессировались гены *Stella*, *Fragilis*, *Dazl*, *Vasa/Ddx4*, а также *E-ras* и *C-kit*. В дифференцирующихся клетках ЭТ1 и ЭТ5 было обнаружено усиление экспрессии генов *Blimp1/Prdm1* и *Scp3,* а также гена *Gata4*.

Сравнительный анализ профилей экспрессии изучаемых генов в плюрипотентных и первичных половых клетках эмбрионов мышей показал, что в бластоцистах (E4.5) экспрессируются не только ге-

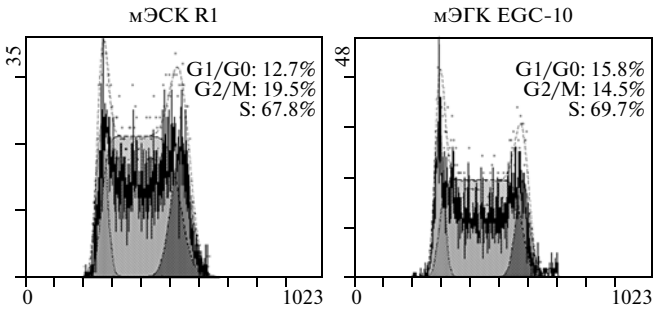


Рис. 2. Анализ клеточного цикла ЭСК R1 и ЭГК EGC-10 мыши. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, по оси ординат – число клеток.

ны *Oct4*, *Nanog*, *Stella*, *Fragilis*, *Dazl* и *C-kit*, но и *Vasa/Ddx4* и *Scp3*. В предшествующих работах других авторов экспрессия гена *Vasa/Ddx4* в плюрипотентных клетках бластоцист и недифференцированных ЭСК и ЭГК мыши выявлена не была (Hübner et al., 2003; Toyooka et al., 2003). Обнаруженный нами уровень экспрессии *Vasa/Ddx4* в бластоцистах был сопоставим с таковым в гоноцитах на стадии E13.5, где экспрессия была выявлена и другими исследователями (Toyooka et al., 2000). Кроме того, экспрессия *Vasa/Ddx4* в бластоцистах была значительно выше, чем в клетках эпибласта (E6.5) и в первичных половых клетках после их заселения в зачатки гонад (E10.5). Интересно отметить, что в

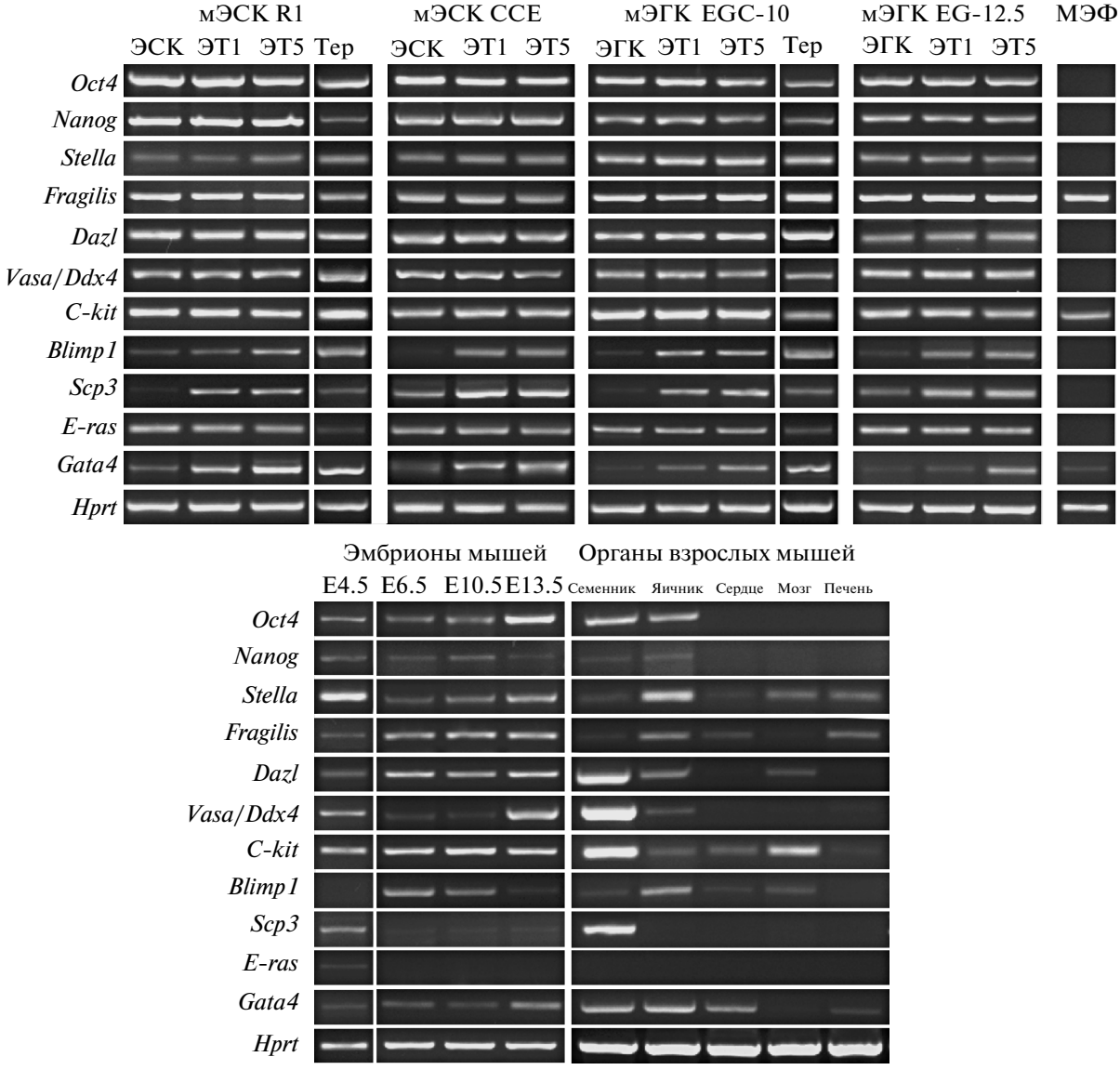


Рис. 3. Профили экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в линиях плюрипотентных стволовых клеток, в зародышах мыши и органах взрослых мышей.

ЭТ1, ЭТ5 – эмбриоидные тела на 1-е и 5-е сут развития, Тер – тератомы, сформированные линией ЭСК или ЭГК; МЭФ – мышиные эмбриональные фибробласты.

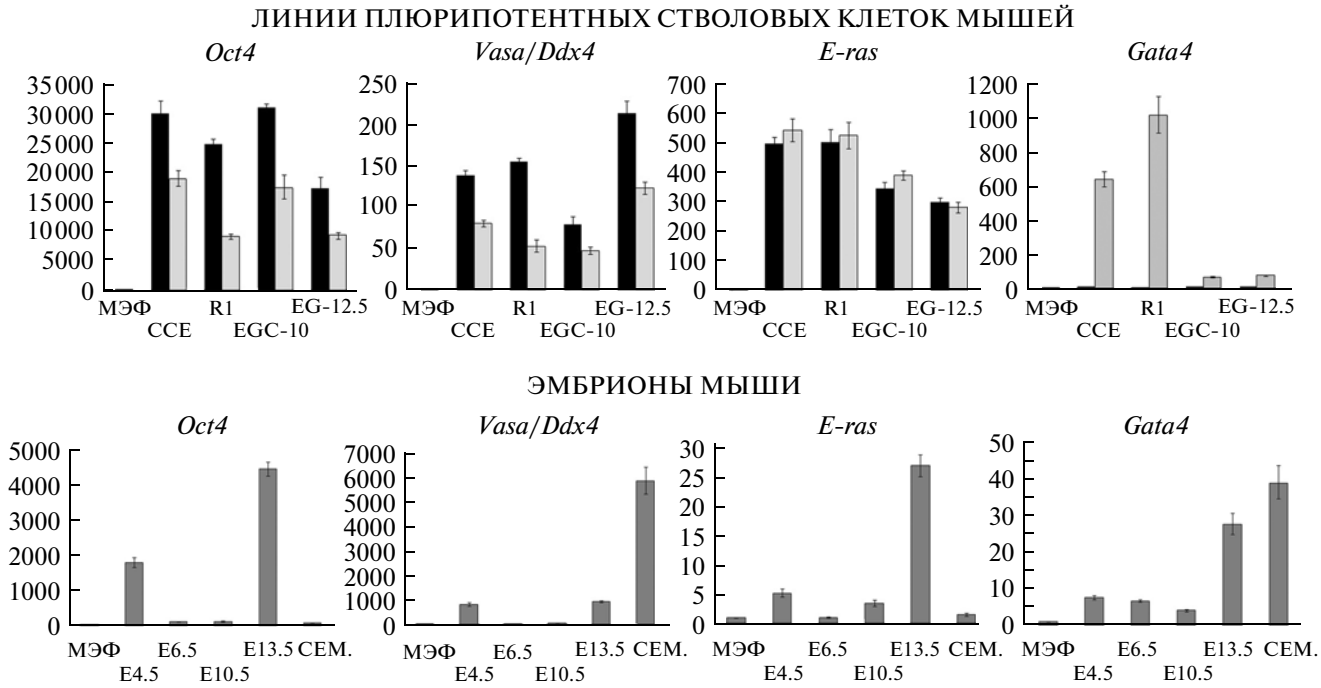


Рис. 4. Количественный анализ экспрессии генов *Oct4*, *Vasa/Ddx4*, *E-ras* и *Gata4* в линиях плюрипотентных стволовых клеток мыши, а также плюрипотентных и первичных половых клетках эмбрионов мыши. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *Hprt* (уровень экспрессии в МЭФ принят за 1 относительную единицу).

(■) – недифференцированные клетки; (■) – ЭТ5; Сем – семенник половозрелого самца.

отличие от ЭСК и ЭГК мы не обнаружили экспрессию гена *E-ras* в эмбриональных клетках ни на одной из изученных стадий развития, как и в органах взрослых животных.

Полученные результаты стимулировали нас к более детальному сравнительному анализу генной экспрессии в линиях плюрипотентных стволовых клеток и эмбрионах, а также в первичных половых клетках. Количественный анализ генной экспрессии показал, что в плюрипотентных стволовых клетках, поддерживаемых *in vitro*, гены *Oct4* и *E-ras* экспрессируются на более высоком уровне, чем в клетках бластоцисты, эпибласта и первичных половых клетках (рис. 4). Так, уровень экспрессии гена *Oct4* в ЭСК и ЭГК мыши в среднем был выше в 10–17 раз, чем в бластоцистах, и более чем в 300 раз выше, чем в клетках эпибласта. Уровни экспрессии гена *E-ras* в линиях ЭСК и ЭГК были в 100, 500 и 20 раз выше, чем в бластоцистах, эпибласте и гоноцитах соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что по сравнению с плюрипотентными клетками ранних эмбрионов и развивающимися первичными половыми клетками в плюрипотентных стволовых клетках, поддерживаемых *in vitro*, происходит значительное усиление уровней экспрессии генов, участвующих в регуляции их самообновления.

С другой стороны, уровень экспрессии гена *Vasa/Ddx4* был в среднем в 6 раз ниже в ЭСК и ЭГК, чем в клетках бластоцисты и гоноцитах (E13.5), но существенно выше, чем в клетках эпибласта и первичных половых клетках на стадии E10.5. Интересно отметить, что уровень экспрессии гена *Vasa/Ddx4* в EGC-10 был ниже, чем в EG-12.5, и подобная тенденция была выявлена также и для первичных половых клеток (E10.5) и гоноцитов (E13.5). Кроме того, мы обнаружили, что уровни экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx4* параллельно снижались приблизительно вдвое к 5-м сут дифференцировки ЭТ. Проведенный иммуногистохимический анализ показал, что в недифференцированных ЭСК и ЭГК мыши и в бластоцистах ген *Vasa/Ddx4* экспрессируется не только на уровне мРНК, но и на уровне белка (рис. 5).

Анализ экспрессии гена *Gata4* в процессе дифференцировки ЭСК и ЭГК мыши показал, что экспрессия этого гена в ЭТ, формируемых ЭСК, была более чем в 20 раз выше, чем в ЭТ, образованных ЭГК (рис. 4). Таким образом, несмотря на значительное сходство этих линий, ЭСК быстрее и эффективнее дифференцировались в клетки внезародышевой энтодермы, чем ЭГК. Эти данные о скорости дифференцировки ЭСК и ЭГК подтверждают наши предыдущие иммуногистохимические исследования экспрессии белка Gata4 в процессе дифференцировки ЭТ, формируемых ЭСК и ЭГК (Гордеева и др., 2009).

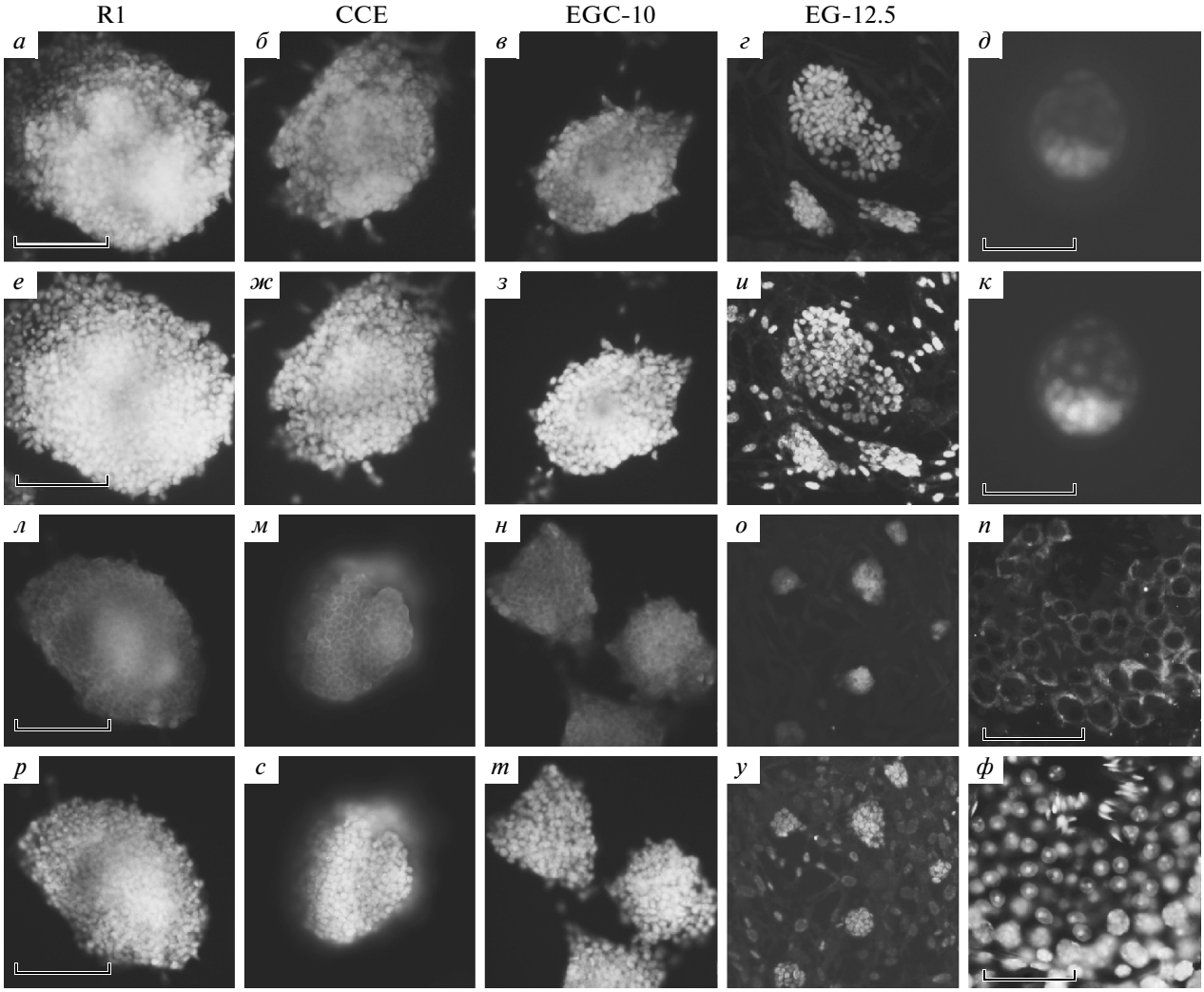


Рис. 5. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии белков Oct4 (*а–г*) и Vasa (*д*, *л–п*) в недифференцированных клетках линий ЭСК R1, CCE (*а*, *л*) и ЭГК EGC-10, EG-12.5 (*б*, *м*) в клетках бластоцисты (*д*) и семенников мыши (*п*). Ядра клеток на соответствующих препаратах докрашены DAPI (*е–к*; *р–ф*).
Масштаб: *а–г*, *е–и*, *л–о*, *р–у* – 100; *д*, *к*, *п*, *ф* – 50 мкм.

Анализ экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в ЭСК человека. Далее мы исследовали линии ЭСК человека, которые, как было отмечено выше, отличаются по статусу от плюрипотентных стволовых клеток мыши. Все используемые линии ЭСК человека (ESM01, ESM02 и ESM03) были способны к дифференцировке в различные производные *in vitro* и *in vivo* в тератомах (рис. 6). Анализ клеточного цикла линий ESM01 и ESM02 показал, что структура их клеточного цикла сходна с таковой для линий ЭСК и ЭГК мыши (рис. 7).

Исследование экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в недифференцированных клетках, ЭТ1 и ЭТ5 показало, что паттерны их экспрессии сходны для разных линий и в целом аналогичны ЭСК мыши. Однако обратил на себя внимание очень низкий уровень экспрессии генов *VASA/DDX4* и *E-RAS* (рис. 8). Количественный ПЦР-анализ показал, что уровни экспрессии генов *VASA/DDX4* и *E-RAS* приблизительно одинаковы и значительно ниже, чем в клетках ЭСК и ЭГК мыши (рис. 9). Так, например, уровень экспрессии гена *VASA/DDX4* в ЭСК человека был в 1000 раз ниже, чем во взрослом семеннике человека, тогда как уровень его экспрессии в ЭСК мыши был только в 40 раз ниже, чем в семеннике мыши. Кроме того, при одинаковой эффективности реакции показатель ΔCt *VASA/DDX4* для ЭСК человека составлял (в среднем для трех линий) 7.150 ± 0.09, в то время как для ЭСК мыши он был 1.823 ± 0.048. Эти данные подтверждают и результаты иммуногистохимического анализа, который не выявил VASA/DDX4-позитивных клеток в колониях недифференцированных ЭСК ESM01, ESM02 и ESM03 (рис. 10).

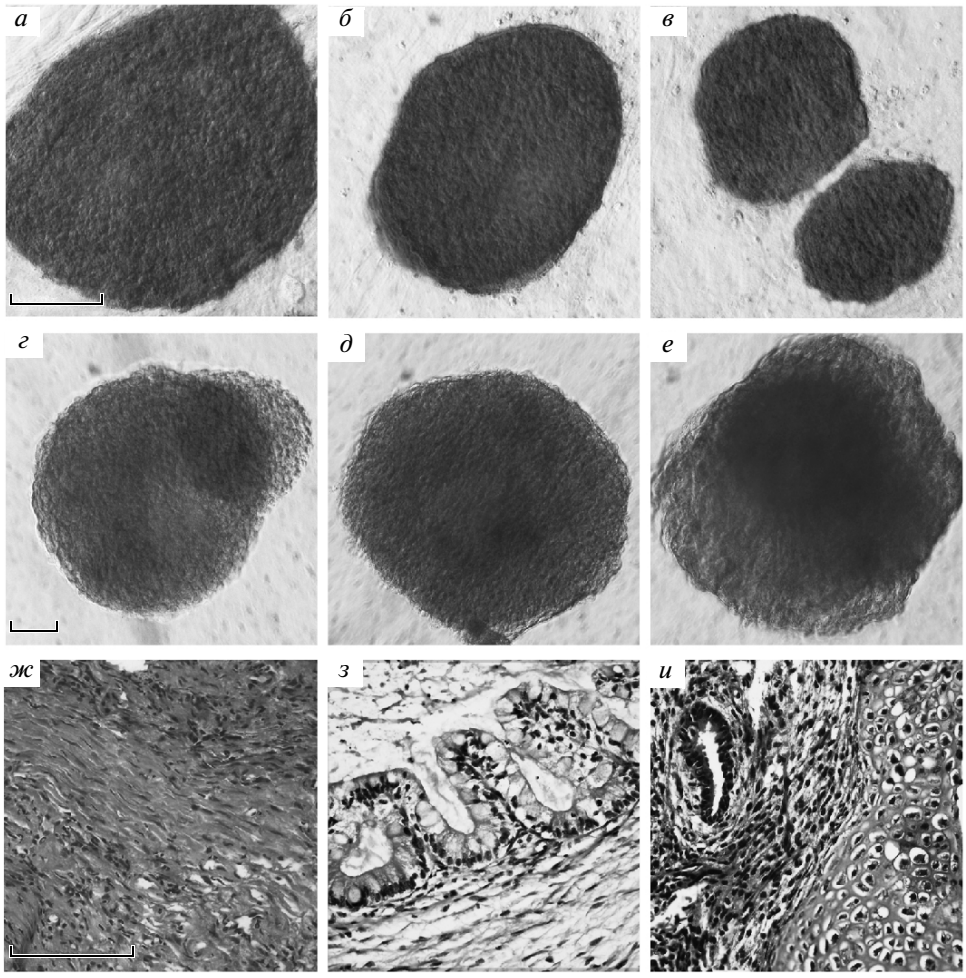


Рис. 6. Линии плюрипотентных ЭСК человека ESM01 (*а*, *г*) ESM02 (*б*, *д*) и ESM03 (*в*, *е*). Активность щелочной фосфатазы в недифференцированных клетках колоний (*а*–*в*) и эмбриоидных тел (*г*–*е*). Срезы тератом, сформированных клетками ESM01 (*ж*, *з*) и ESM02 (*и*). Масштаб здесь и на рис. 10, 11, 15, 16 – 100 мкм.

Как было отмечено выше, экспрессия гена *E-RAS* в линиях ЭСК человека резко отличалась от его экспрессии в линиях ЭСК мыши (рис. 4, 9): уровни экспрессии гена *E-RAS* в ЭСК человека были лишь в 40 и в 2 раза выше, чем в эмбриональных фибробластах и семеннике человека соответственно, тогда как в ЭСК мыши эти различия составляли 500 и 350 раз соответственно. На основании этих фактов можно предположить, что роль гена *E-RAS* в регуляции пролиферации ЭСК человека отличается от функции его гомолога в ЭСК мыши.

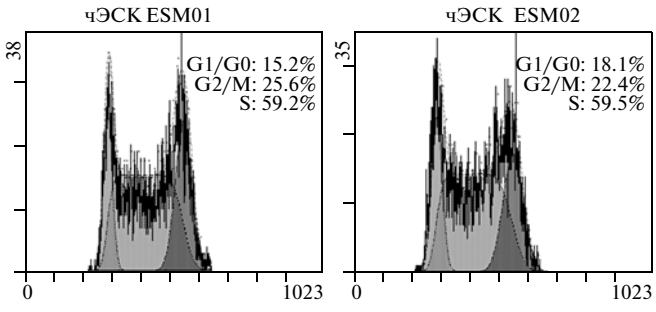


Рис. 7. Структура клеточного цикла ЭСК человека ESM01 и ESM02. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, по оси ординат – число клеток.

Интересно отметить, что в ЭТ5, сформированных клетками ESM01, ESM02 и ESM03, дифференцировка клеток внезародышевой энтодермы происходила значительно быстрее, чем в ЭТ5 мыши, о чем свидетельствует более резкое увеличение экспрессии гена *GATA4* в ЭТ по сравнению с недифференцированными клетками колоний (рис. 4, 9). Для ЭСК и ЭТ человека уровень экспрессии возрастал в 1000 раз, а для ЭСК и ЭТ мыши – в 150 раз. Полученные данные количественно подтверждают выводы многих исследователей о том, что уровень спонтанной дифференцировки в культурах ЭСК человека значительно выше, чем в ЭСК мыши. Такая усиленная способность к диф-

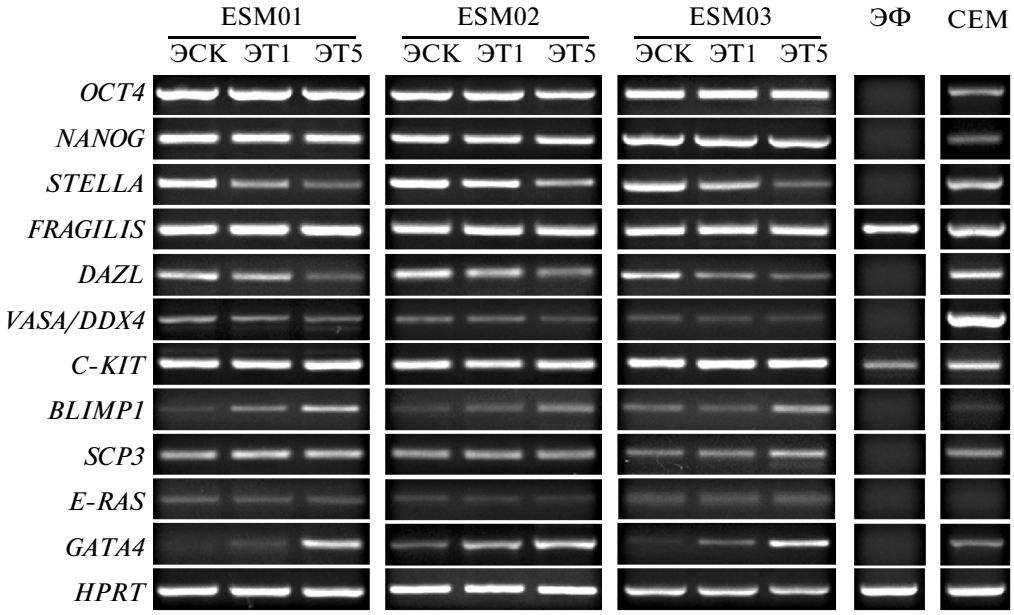


Рис. 8. Профили экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в ЭСК человека ESM01, ESM02 и ESM03. ЭТ1, ЭТ5 – эмбриоидные тела на 1-е и 5-е сут развития, ЭФ – эмбриональные фибробласты.

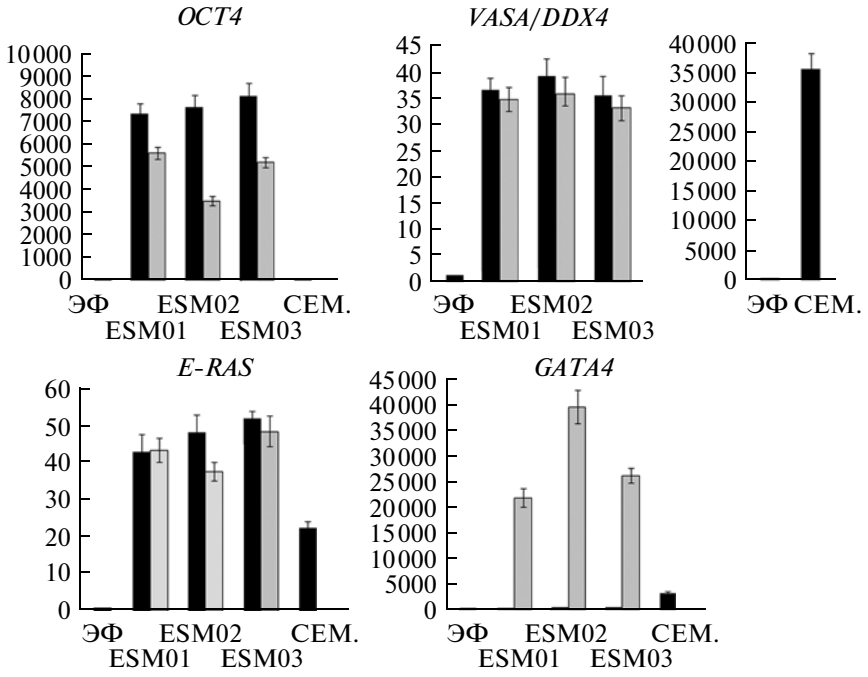


Рис. 9. ПЦР-анализ в реальном времени экспрессии генов *OCT4*, *VASA/DDX4*, *E-RAS* и *GATA4* в линиях ЭСК человека ESM01, ESM02 и ESM03. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *HPRT* (уровень экспрессии в ЭФ принят за 1 относительную единицу).
(■) – недифференцированные клетки; (■) – ЭТ5; Сем – семенник человека.

ференцировке у ЭСК человека, вероятно, является следствием более продвинутого статуса их плюрипотентности, по сравнению с ЭСК мыши. Таким образом, как показывает наш сравнительный анализ линий ЭСК человека и мыши, профили экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в значительной мере сходны, однако гены *VASA/DDX4* и *E-RAS* экспрессируются на значительно более низком уровне в ЭСК человека, чем в ЭСК мыши, что, вероятно, связано с различной

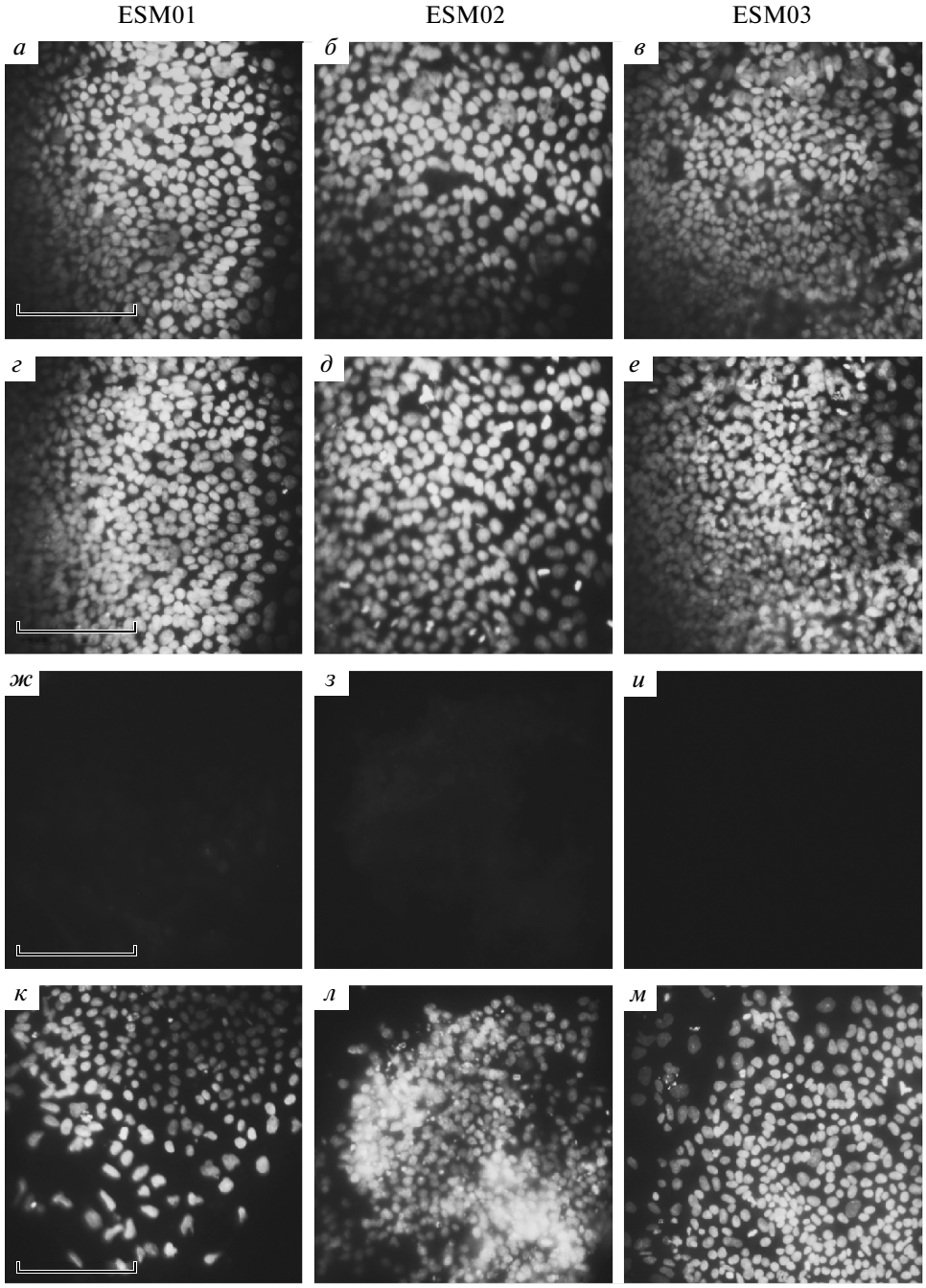


Рис. 10. Анализ экспрессии белков Oct4 (*а–в*) и Vasa (*ж–и*) в недифференцированных клетках линий ЭСК человека ESM01 (*а*, *г*, *ж*, *к*), ESM02 (*б*, *д*, *з*, *л*) и ESM03 (*в*, *е*, *и*, *м*). Ядра клеток на соответствующих препаратах докрашены DAPI (*г–е*; *к–м*).

ролью, которую играют эти гены в клетках, находящихся на разных фазах плюрипотентности.

Вариабельность экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в линиях ЭТК мыши и человека. Исследуя механизмы детерминации линии половых клеток у млекопитающих, мы использовали в качестве моделей не только нормальные плюрипотентные стволовые клетки, но также и линии ЭТК мыши и человека, которые принято рассматривать в качестве малигнизированных аналогов плюрипотентных клеток. Все используемые линии ЭТК мыши и человека не были способны к спонтанной дифференцировке *in vitro* (рис. 11). Только в ЭТ, формируемых линией F9, мы наблюдали единичные клетки, дифференцирующиеся в клетки внезародышевой энтодермы. Гистологический анализ тератокарцином, развившихся после трансплантации ЭТК иммунодефицитным мы-

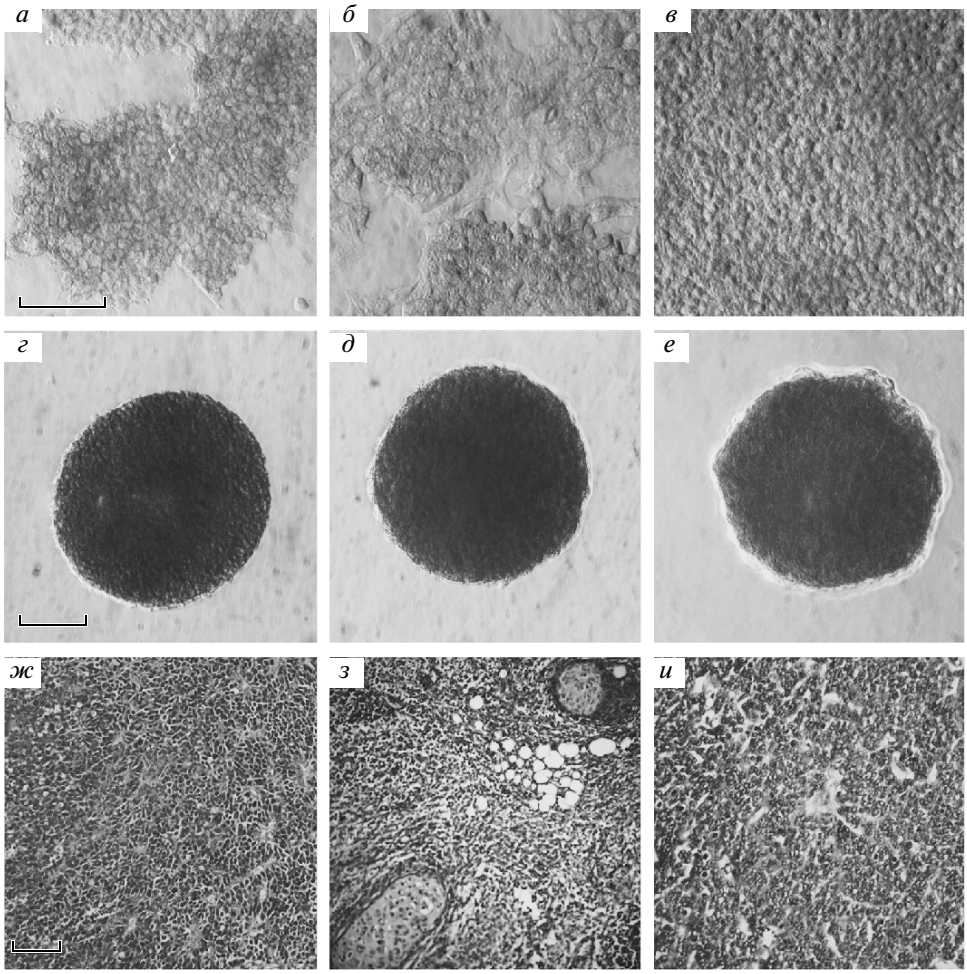


Рис. 11. Линии ЭТК мыши F9 (*а*, *г*, *ж*), P19 (*б*, *д*, *з*) и человека PA-1 (*в*, *е*, *и*). Активность щелочной фосфатазы в клетках колоний (*а–в*) и эмбриоидных тел (*г–е*), формируемых этими клеточными линиями. Срезы тератокарцином, развившихся после трансплантации клеток линий F9 (*ж*), P19 (*з*) и PA-1 (*и*) иммунодефицитным мышам.

шам, показал, что ЭТК F9 и PA-1 образовывали опухоли, состоящие только из недифференцированных клеток, тогда как в тератокарциномах, образованных ЭТК P19, наряду с недифференцированными опухолевыми клетками были обнаружены и зачатки хрящевых структур (рис. 11, *ж–и*). Эти данные свидетельствуют о том, что линии ЭТК F9 и PA-1 являются нуллипотентными тератокарциномными линиями.

Анализ клеточного цикла линий ЭТК выявил существенные различия в структуре для всех изученных линий (рис. 12). Так, митотический индекс (суммарное число клеток в S- и G2/M-фазах клеточного цикла) для клеток тератокарциномы человека PA-1 составлял 37, для ЭТК мыши P19 – 59.6, а для клеток F9 – 76.9%. Эти результаты показывают, что только линия F9 имеет структуру клеточного цикла, наиболее сходную с плюрипотентными стволовыми клетками. В то же время клеточный цикл линий P19 и PA-1 значительно отличается от типичного клеточного цикла плюрипотентных стволовых клеток более низким значением митотического индекса и более продолжительным *G1/G0*-периодом клеточного цикла.

Существенные различия между линиями ЭТК были выявлены и при исследовании профилей экспрессии генов, специфических для линии половых клеток (рис. 13). Большинство изучаемых генов экспрессировалось только в линии F9, тогда как в линиях P19 и PA-1 ген *Vasa/Ddx4/DDX4* экспрессировался на низком уровне. Кроме того, в линии PA-1 не была выявлена экспрессия генов *BLIMP1* и *SCP3* ни в монослойных культурах, ни в ЭТ. Детальный количественный анализ генной экспрессии (рис. 14) показал, что различия в уровнях экспрессии гена *Vasa/Ddx4* для линий F9 и P19 составляют около 40 раз, при этом по сравнению с ЭСК мыши уровень экспрессии в F9 был ниже в 2.5 раза, а в P19 – почти в 100 раз. Уровень экспрессии *VASA/DDX4* в ЭТК PA-1 был практически равен уровню в ЭФ человека и в 18 раз ниже, чем в ЭСК человека. Иммуногистохимический анализ экспрессии белка Vasa/Ddx4/DDX4 также подтвердил данные ПЦР-анализа (рис. 15). Наиболее

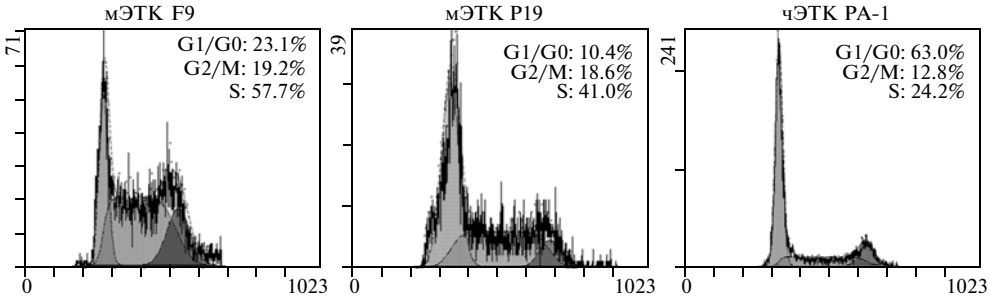


Рис. 12. Анализ клеточного цикла ЭТК мыши (F9, P19) и человека (PA-1). По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, по оси ординат – число клеток.

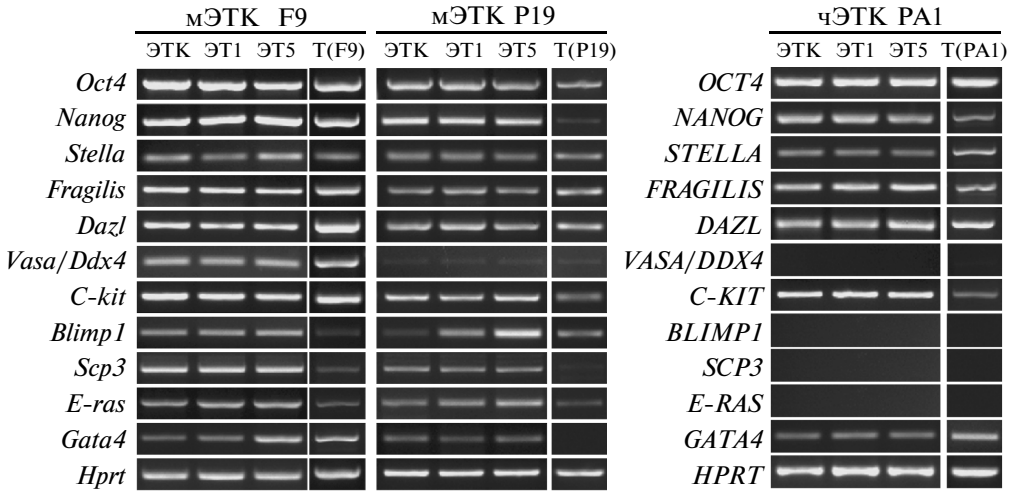


Рис. 13. Экспрессия генов, специфических для линии половых клеток, в линиях ЭТК мыши и человека. ЭТ1, ЭТ5 – эмбриоидные тела на 1-е и 5-е сут развития, Т(F9), Т(P19), Т(PA-1) – тератокациномы, сформированные линиями ЭТК *in vivo*.

неожиданные результаты дал анализ экспрессии гена *E-ras/E-RAS*. Так, в монослойных культурах линий F9 и P19 уровень его экспрессии был сопоставим с уровнями в ЭСК и ЭГК мыши, однако он почти вдвое возрастал в ЭТ5 по сравнению с монослойными культурами. Напротив, в ЭТК PA-1 уровень экспрессии гена E-RAS не изменялся и был в 3 раза ниже, чем в ЭСК человека (рис. 14).

Экспрессия гена *Gata4/GATA4* во всех линиях ЭТК была обнаружена на уровне, сходном с уровнем в недифференцированных ЭСК мыши и человека (рис. 14). Однако в отличие от плюрипотентных клеток его экспрессия в ЭТ, формируемых ЭТК, была значительно ниже, чем в ЭСК (для F9 – в 10 раз, для P19 – в 80 раз, для P19 – в 167 раз), а экспрессия белка не детектировалась иммуногистохимически (данные не приведены), кроме единичных клеток ЭТ F9 (см.: Гордеева и др., 2009).

В сумме полученные данные свидетельствуют о том, что тератокарциномные клетки используемых линий в большей или меньшей степени проявляют свойства, сходные с линиями плюрипотентных стволовых клеток. Наблюдаемые различия в структуре их клеточного цикла в значительной мере коррелируют с их паттерном экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в частности гена *Vasa/Ddx4/DDX4*. Однако данные об экспрессии изучаемых генов в ЭТК не дают возможность прогнозировать их потенциал к дифференцировке, а позволяют судить только о степени отклонения от их прототипа – плюрипотентных стволовых клеток. Такие отличия, вероятно, связаны со значительными перестройками в регуляторных сетях трансформированных опухолевых клеток.

Изменение экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, при культивировании плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток мыши в присутствии ингибиторов PD 98059 и BIO и фактора LIF (2i + LIF). Для того чтобы понять, возможно ли регулировать статус дифференцирующихся плюрипотентных стволовых клеток или тератокарциномных клеток *in vitro*, мы использовали систему культивирования, разработанную для репрограммирования первичных (primed) плюрипотентных стволовых клеток (ство-

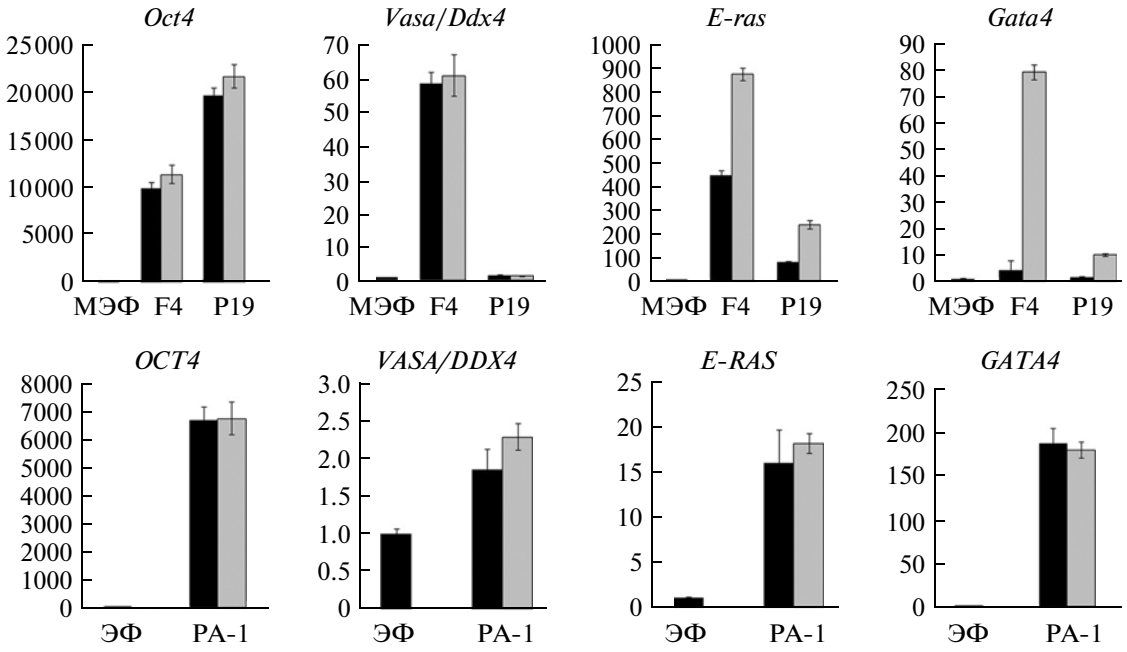


Рис. 14. Количественный ПЦР-анализ в реальном времени экспрессии генов *Oct4/OCT4*, *Vasa/Ddx4/DDX4*, *E-ras/E-RAS* и *Gata4/GATA4* в линиях ЭТК мыши и человека. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *Hprt/HPRT* (уровень экспрессии в МЭФ или ЭФ человека принят за 1 относительную единицу); обозначения см. на рис. 4.

ловых клеток эпибласта) к базовому статусу плюрипотентности (ground state). Монослойные культуры ЭТК F9 и P19, а также дифференцирующиеся ЭТ3, сформированные ЭСК R1 и ЭГК EG-12.5, культивировали в течение 48 ч в среде с ингибиторами PD 98059 и BIO и фактором LIF (2i + LIF условия) (рис. 16). После завершения эксперимента мы обнаружили существенные различия в морфологии экспериментальных и контрольных культур ЭТК. В обеих линиях клеточные кластеры становились многослойными и приобретали сходство с колониями недифференцированных ЭСК и ЭГК мыши. Кроме того, по сравнению с контрольными культурами, растущими в среде только с фактором LIF, в них значительно возрастала активность щелочной фосфатазы (рис. 16). В условиях 2i + LIF значительно снижалась адгезия ЭТ R1 и ЭТ EG-12.5 к субстрату и поддерживался их объемный рост (рис. 16). При этом не было выявлено значимых различий в скорости роста в контрольных и экспериментальных культурах для всех клеточных линий (рис. 17, *а*, *б*). Изучение распределения клеток по стадиям клеточного цикла показало, что в популяциях ЭСК и ЭГК, поддерживаемых в условиях 2i + LIF, число клеток уменьшается в *G1/G0*-фазе и возрастает в *S*-фазе по сравнению с контрольными культурами (+ LIF) (рис. 17, *в*). В то же время в линиях ЭТК не было выявлено существенных изменений (рис. 17, *в*). Необходимо отметить, что эффект условий культивирования 2 + LIF был полностью обратим после перемещения клеток в стандартные условия.

Количественный анализ генной экспрессии показал, что в условиях культивирования 2i + LIF происходит частичное восстановление экспрессии *Oct4*, *Vasa/Ddx4* и *Gata4* в ЭТ R1 и ЭТ EG-12.5 до уровня недифференцированных ЭСК и ЭГК (рис. 18). В ЭТК P19 экспрессия генов *Oct4* и *Gata4* не изменялась, а уровень экспрессии гена *Vasa/Ddx4* статистически достоверно возрастал ($p < 0.05$), но все равно не достигал значений, выявляемых в ЭСК и ЭГК мыши. В линии ЭТК F9 экспрессия этих генов оставалась без изменений ($p > 0.05$). Однако во всех изучаемых линиях, растущих в условиях культивирования 2i + LIF, мы наблюдали статистически достоверное снижение экспрессии гена *E-ras*. Причины снижения экспрессии гена *E-ras* в экспериментальных культурах сложно объяснить, учитывая что это снижение происходит на фоне высокого уровня экспрессии гена *Oct4* и отсутствия различий в скорости роста клеток в опыте и контроле. Полученный результат указывает на возможную негативную регуляцию экспрессии гена *E-ras* при ингибировании сигнального пути ERK/MAPK-киназ, активного в дифференцирующихся плюрипотентных стволовых клетках.

Таким образом, в условиях, способствующих переходу плюрипотентных стволовых клеток из первичного в базовый статус плюрипотентности, дифференцирующиеся клетки ЭСК и ЭГК мыши также способны к реверсии исходного статуса и усилению экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx4*. В линиях ЭТК мыши, растущих в данной системе культивирования, происходят лишь морфологиче-

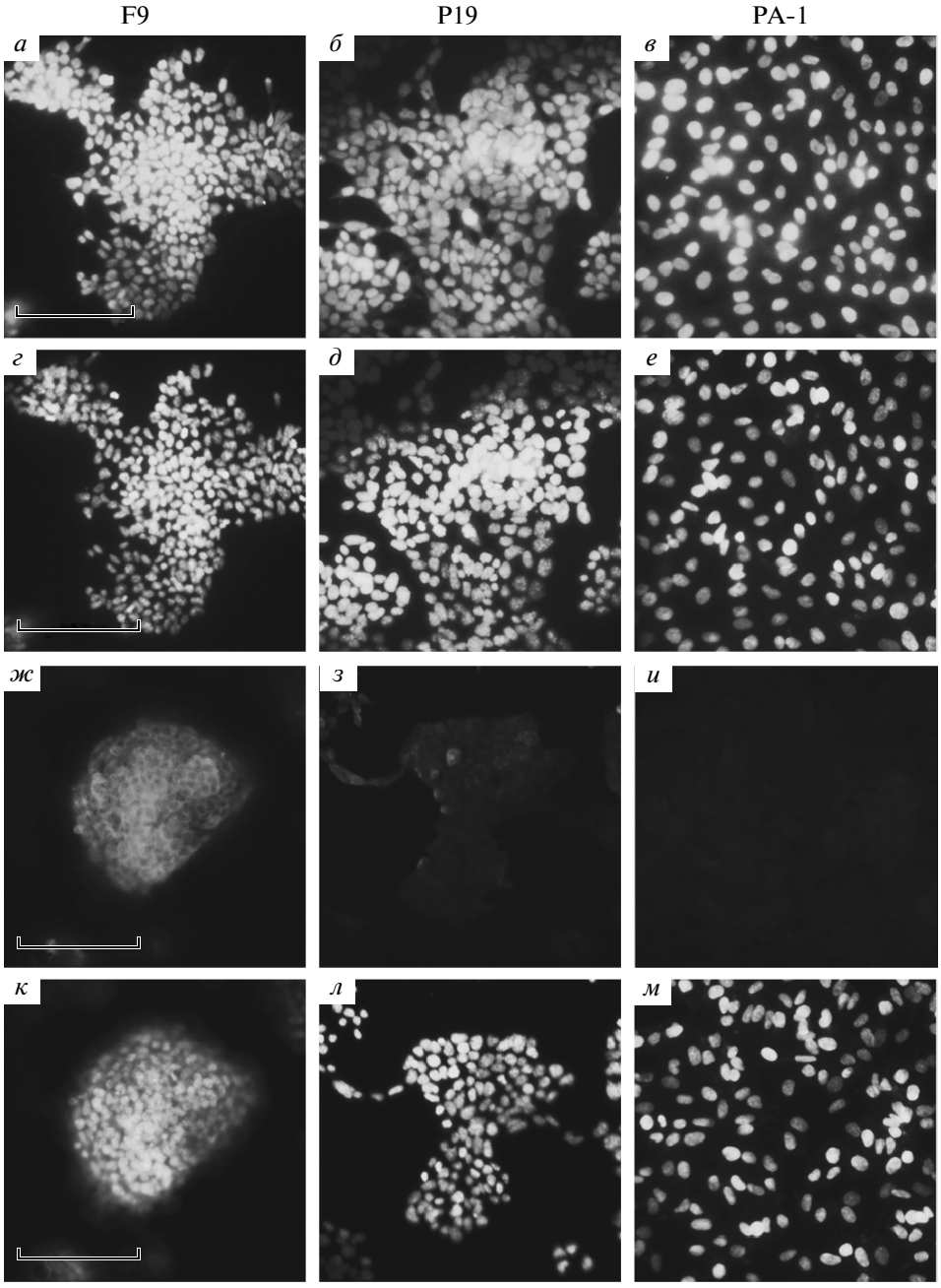


Рис. 15. Экспрессия белков Oct4 (*а–в*) и Vasa (*ж–и*) в ЭТК мыши и человека. Ядра клеток на соответствующих препаратах докрашены DAPI (*г–е*; *к–м*).

ские изменения без существенных изменений в экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx*, не приводящих к изменению статуса этих клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

В раннем предгаструляционном развитии млекопитающих происходит разграничение программ дифференцировки линий половых и соматических клеток. Как было показано, способность участвовать в развитии линии половых клеток является основным отличием клеток, находящихся в статусе базовой плюрипотентности (ground state), от клеток в фазе первичной плюрипотентности (primed state). Одним из регуляторов поддержания клеток в базовом статусе плюрипотентности является транскрипционный фактор Klf4 (Guo et al., 2009). Кроме того, ингибирование сигнального пути ERK/MAPK-киназ, а также стимуляция сигнальных путей Wnt и LIF/Stat3 препятствует утрате плюрипотентными клетками способности дифференцироваться в линию половых клеток (Silva

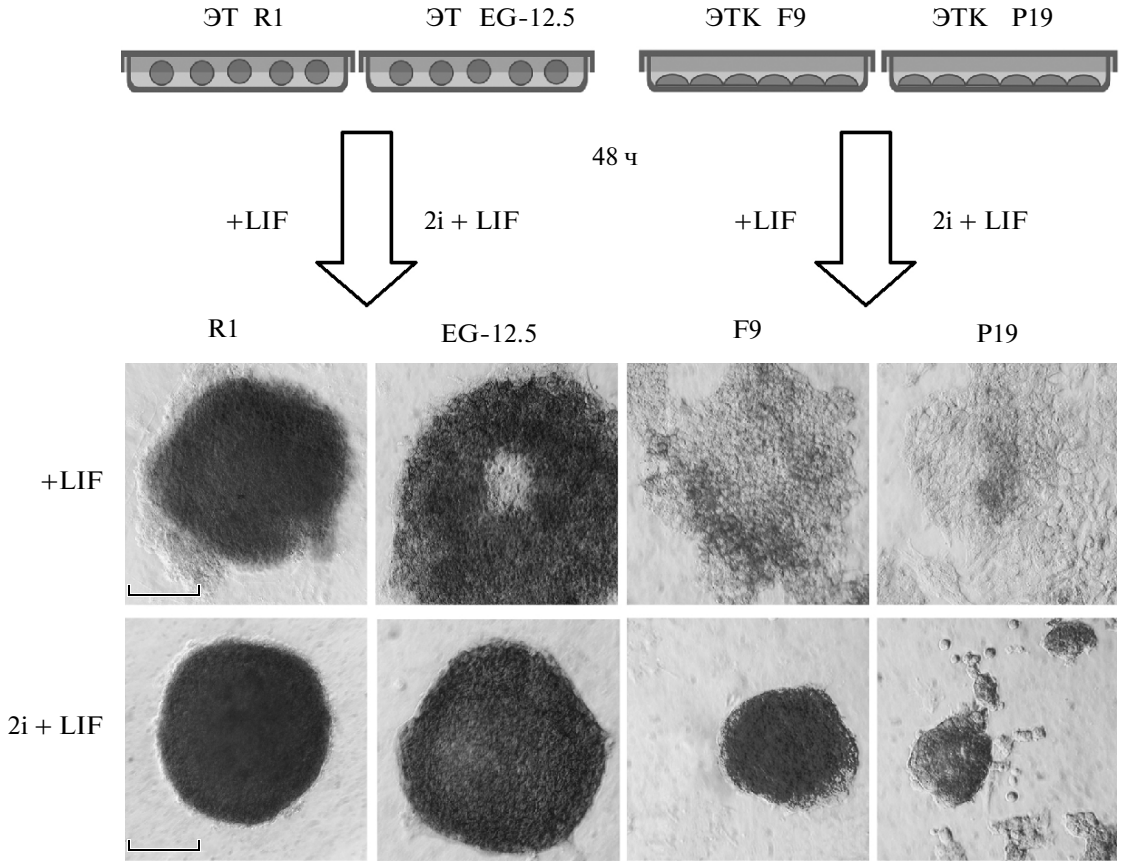


Рис. 16. Репрограммирование статуса дифференцирующихся ЭСК и ЭГК, а также ЭТК мыши в условиях культивирования с ингибиторами PD 98059 и BIO и фактором LIF (2i + LIF). Схема эксперимента. Морфология и активность щелочной фосфатазы в ЭТ R1 и EG-12.5 и ЭТК F9 и P19.

et al., 2008; Yang et al., 2010). Известно, что в регуляцию дифференцировки плюрипотентных клеток в линию половых клеток вовлечены и гены с материнским эффектом, которые экспрессируются как в половых клетках, так и в тотипотентных и плюрипотентных клетках ранних эмбрионов (Lacham-Kaplan, 2004).

Мы исследовали экспрессию генов, вовлеченных в развитие линии половых клеток, а также экспрессирующихся в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека. Результаты проведенных исследований показали, что клетки бластоцисты, гоноциты E13.5, ЭСК и ЭГК мыши имеют очень похожие профили экспрессии генов, специфических для линии половых клеток. Мы впервые обнаружили, что ген *Vasa/Ddx4* экспрессируется не только в мигрирующих половых клетках и гоноцитах, но и в клетках бластоцист мыши, причем уровни экспрессии этого гена в бластоцистах и гоноцитах были практически одинаковыми, тогда как в клетках эпибласта E6.5 его экспрессия была значительно ниже (в 267 раз). Нельзя исключить, что низкий уровень экспрессии гена *Vasa/Ddx4,* детектируемый в эпибласте и гоноцитах E10.5, может быть связан с малым количеством первичных половых клеток в этих зачатках по отношению к остальным клеткам. Интересно отметить, что недавно и в эпибласте мыши были обнаружены две субпопуляции, различающиеся по активности гена *Oct4* и способности участвовать в развитии химер (Han et al., 2010). Можно предположить, что субпопуляция, сохраняющая способность к формированию химер, представляет собой клетки самых ранних предшественников линии половых клеток. С другой стороны, обнаруженный нами низкий уровень экспрессии гена *VASA/DDX4* в ЭСК человека по сравнению с ЭСК мыши может свидетельствовать о сходстве ЭСК человека с клетками эпибласта мыши и о первичном статусе (primed state) плюрипотентности этих клеточных линий. В ряде работ было показано, что усиление экспрессии *VASA/DDX4* в ЭСК человека и мыши приводит к их дифференцировке в линию половых клеток и даже к формированию гаплоидных половых клеток (Hübner et al., 2003; Clark et al., 2004; Kee et al., 2006; Nayernia et al., 2006). Однако данные по экспрессии этого гена в ЭСК мыши и человека существенно различаются. Так, большинство авторов отмечают низкий уровень экспрессии *VASA/DDX4* в недифференцированных клетках

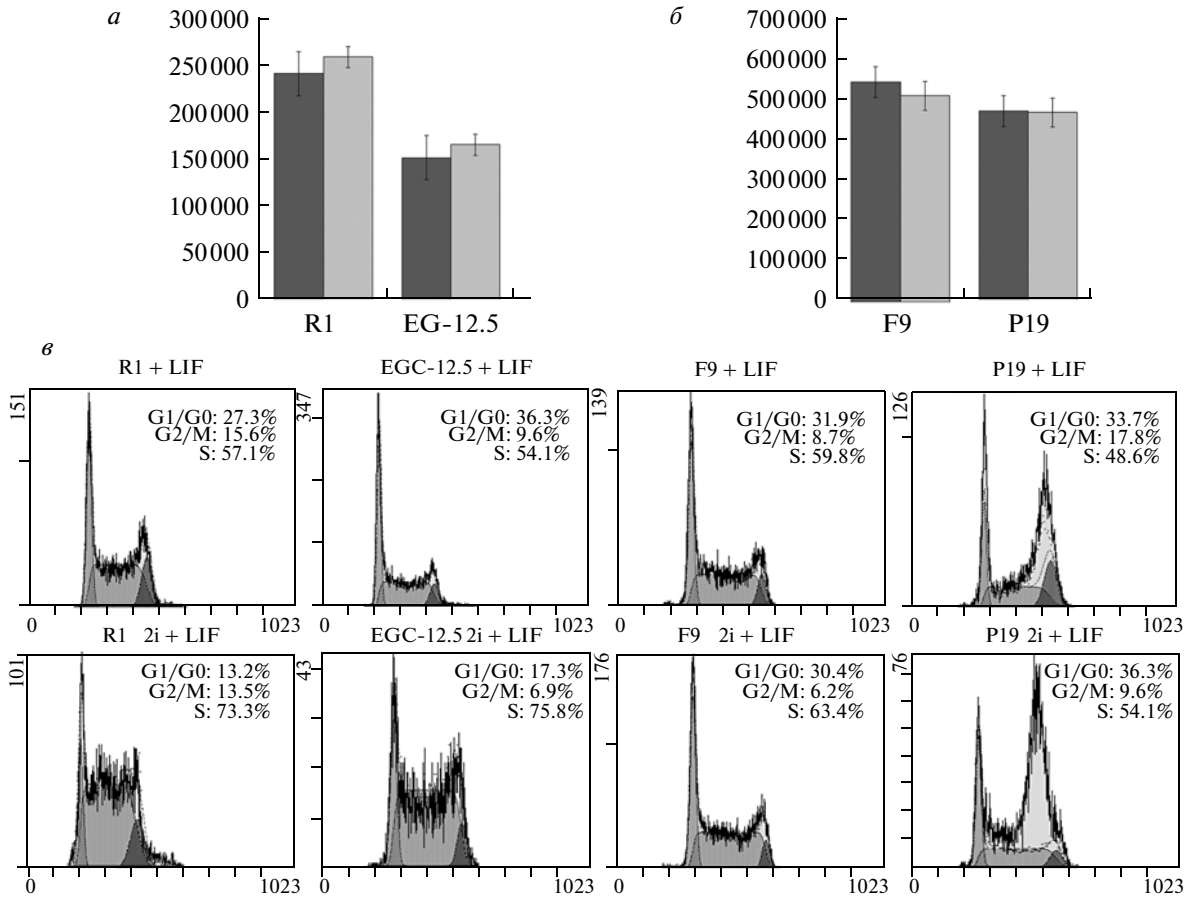


Рис. 17. Скорость роста клеток и структура клеточного цикла линий R1, EG-12.5, F9 и P19 в экспериментах с культивированием в условиях 2i + LIF. *а*, *б* – скорость роста линий R1, EG-12.5 (*а*), F9 и P19 (*б*) в условиях с LIF (■) и 2i + LIF (■); *в* – структура клеточного цикла линий R1, EG-12.5, F9 и P19 в контрольных и экспериментальных культурах. По оси абсцисс – клеточные линии, по оси оордината – число клеток в контрольных и экспериментальных культурах.

ЭСК человека, тогда как паттерн его экспрессии в ЭСК мыши очень варьирует (Hübner et al., 2003; Toyooka et al., 2003; Clark et al., 2004; Tilgner et al., 2008). В нашей работе экспрессия мРНК и белка Vasa/Ddx4 была обнаружена в недифференцированных ЭСК и ЭГК мыши, хотя уровень экспрессии мРНК был ниже, чем в клетках бластоцисты и гоноцитов E13.5. При этом экспрессия этого гена в ЭСК мыши была значительно выше, чем в ЭСК человека.

В контексте этих данных, относительно легкую конверсию первичных половых клеток в плюрипотентные стволовые клетки *in vitro* можно объяснить сходными паттернами экспрессии генов, специфических для линии половых клеток и, в частности, ключевого гена *Vasa/Ddx4*, в клетках бластоцисты и гоноцитов мыши. Полученные результаты об экспрессии гена *Vasa/Ddx4* в линиях ЭСК и ЭГК мыши также свидетельствуют о сходстве их статусов с клетками внутренней клеточной массы бластоцисты (ground state). Таким образом, мы полагаем, что паттерн экспрессии гена *Vasa/Ddx4/DDX4* можно рассматривать как еще один молекулярный детерминант базового статуса плюрипотентности (ground state). Все эти факты свидетельствуют о том, что паттерн экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, может быть ассоциирован с различными фазами плюрипотентности. Кроме того, нельзя исключить, что он предетерминирован в плюрипотентных клетках для сохранения их потенциала к формированию линии половых клеток.

Несмотря на значительное сходство плюрипотентных и первичных половых клеток в развивающемся зародыше и линий ЭСК и ЭГК, тем не менее полученные нами данные об уровнях экспрессии генов *Oct4* и *E-ras* в этих клетках наглядно демонстрируют различия в механизмах поддержания плюрипотентного статуса *in vivo* и *in vitro*. Резкое возрастание экспрессии *Oct4* и *E-ras* в ЭСК и ЭГК мыши, вероятно, необходимо для поддержания очень высокой скорости самообновления плюрипотентных клеток в условиях *in vitro* в течение длительного периода культивирования. С другой стороны, роль гена *E-RAS* в регуляции пролиферации ЭСК человека (primed state) и мыши

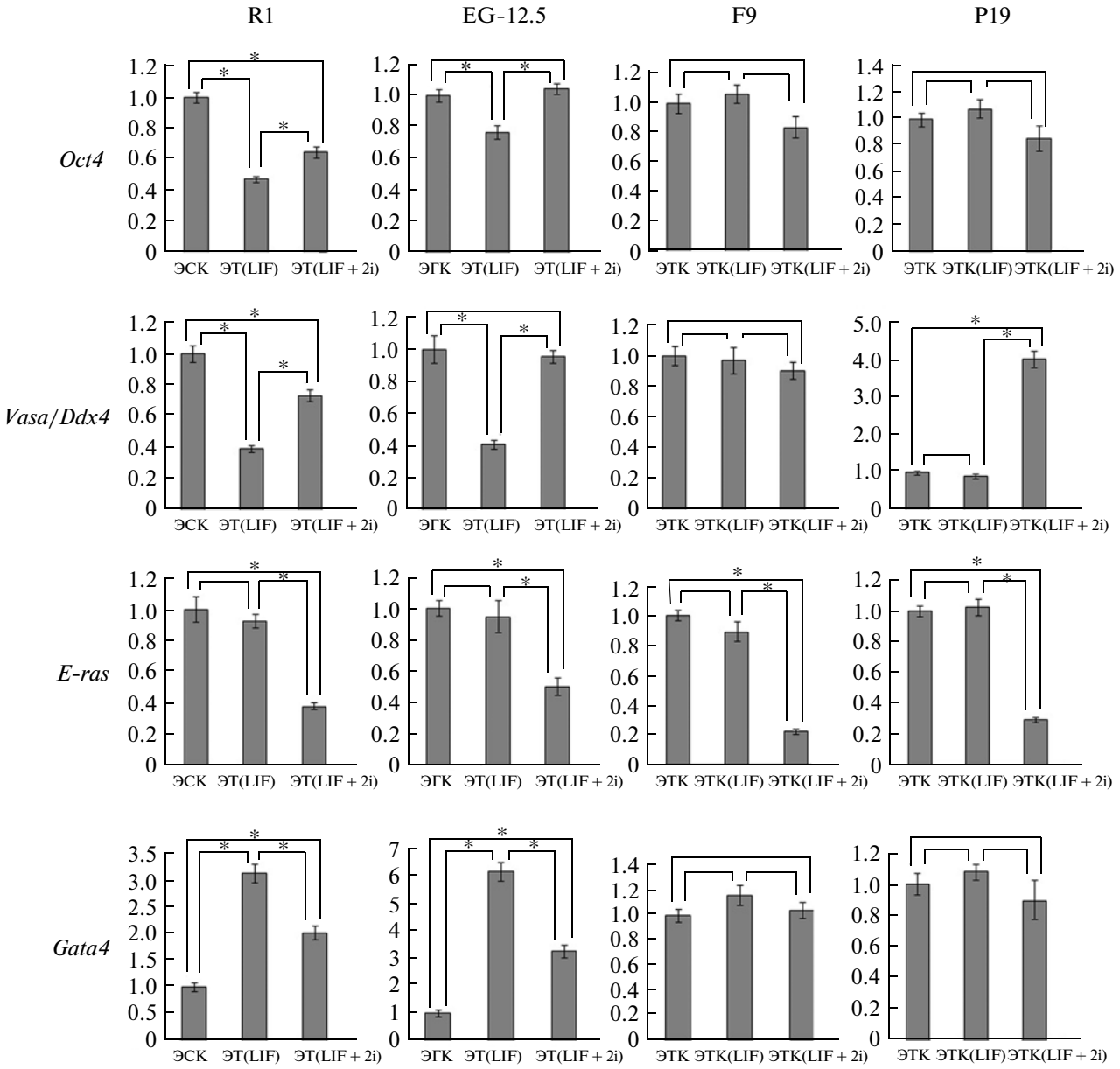


Рис. 18. Количественный ПЦР-анализ в реальном времени экспрессии генов *Oct4*, *Vasa/Ddx4*, *E-ras* и *Gata4* в линиях R1, EG-12.5, F9 и P19 в экспериментах с культивированием в условиях 2i + LIF. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованный к уровню экспрессии гена *Hprt* (уровень экспрессии в недифференцированных клетках (ЭСК, ЭГК, ЭТК), растущих в стандартных условиях (см. "Материал и методику"), принят за 1 относительную единицу).

ЭТ(LIF), ЭТК(LIF) – контрольные клеточные культуры, растущие в среде с фактором LIF; ЭТ(2i + LIF), ЭТК(2i + LIF) – клеточные культуры, растущие в условиях эксперимента в среде с ингибиторами и фактором LIF.

(ground state) может существенно различаться, так как уровни его экспрессии существенно различаются в этих клетках.

Поддержание регуляторного баланса пролиферативных и антипролиферативных сигналов является основой гомеостаза стволовых клеток, в том числе и плюрипотентных. Нарушение этого баланса в трансформированных опухолевых клетках приводит к снижению их потенциала к дифференцировке и усилению пролиферации. Изучение линий ЭТК мыши и человека показало, что профили экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, значительно варьируют в разных линиях и в большей или меньшей степени сходны с профилями соответствующих линий ЭСК мыши и человека. В линиях P19 и PA-1 экспрессия гена *Vasa/Ddx4/DDX4* была значительно ниже, чем в ЭСК, тогда как в линии F9 эти различия были не столь существенны. Кроме того, в клетках ЭТК имела место и несбалансированная экспрессия ге-

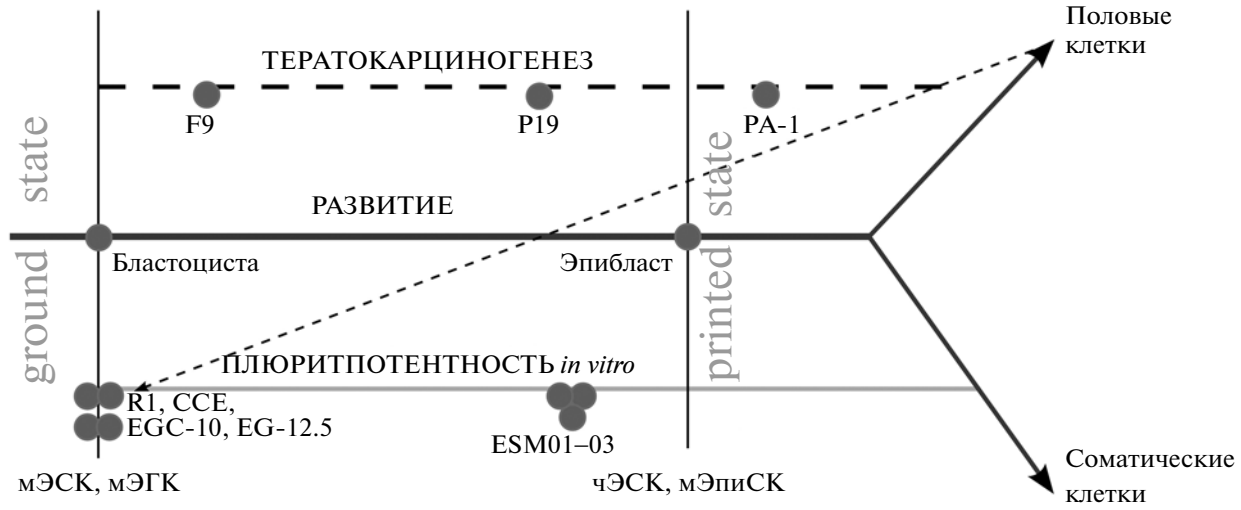


Рис. 19. Изменение статусов плюрипотентных стволовых клеток в развитии, при адаптации и поддержании *in vitro* и в процессе тератоканцерогенеза. Линии плюрипотентных стволовых клеток в процессе адаптации *in vitro* переходят в метастабильное состояние. Статус каждой линии может быть определен в пределах двух фаз плюрипотентности (ground state и primed state). Определенные соотношения уровней экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx4* могут служить индикаторами удаленности от ground state. Статусы клеток тератокарцином представляют собой неопределенные устойчивые состояния с частичной аналогией статусам плюрипотентных клеток.

нов *E-ras/E-RAS* и *Gata4/GATA4*. На основании полученных результатов можно говорить лишь о сходстве или различиях клеток этих линий с их нормальными клетками-прототипами, но в отличие от плюрипотентных стволовых клеток невозможно определить их статус в рамках двух фаз плюрипотентности (рис. 19).

Интересно отметить, что плюрипотентные стволовые клетки, поддерживаемые *in vitro* в течение длительного времени, способны интегрироваться в эмбрион на стадии бластоцисты и участвовать в развитии всех типов клеток, включая линию половых клеток (Nagy et al., 1993). Таким образом, линии плюрипотентных стволовых клеток сохраняют способность восстанавливать экспрессию генов до соответствующих уровней в плюрипотентных клетках бластоцисты. Интересно, что снижение экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx4* наблюдается на ранних стадиях дифференцировки ЭТ, однако уровень экспрессии гена *E-ras* практически не изменяется на этих стадиях. В наших экспериментах с культивированием ЭСК, ЭГК и ЭТК мыши в условиях 2i + LIF мы обнаружили, что дифференцирующиеся ЭТ, формируемые ЭСК и ЭГК, способны восстанавливать экспрессию генов *Oct4*, *Vasa/Ddx4* и *Gata4* практически до их уровня в недифференцированных клетках. В отличие от нормальных клеток в линиях ЭТК не было выявлено значимых изменений в экспрессии этих генов. Обнаруженное снижение уровня экспрессии гена *E-ras* во всех линиях, растущих в условиях 2i + LIF, пока не находит своего объяснения, тем более что оно происходит на фоне подъема экспрессии *Oct4* и *Vasa/Ddx4* в плюрипотентных клетках.

Недавно было обнаружено, что флуктуации уровней экспрессии генов *Oct4, Nanog* и *Sox2* в индивидуальных плюрипотентных стволовых клетках мыши, поддерживаемых *in vitro*, могут достигать 10 раз (Tang et al., 2010). Такие флуктуации генной экспрессии рассматриваются авторами как молекулярная основа инициации разных типов дифференцировки плюрипотентных клеток. Конкурентный выбор клеточной судьбы на начальных стадиях дифференцировки плюрипотентных клеток осуществляется на основе сочетания определенных уровней экспрессии регуляторных факторов в индивидуальных клетках. Высказана новая точка зрения о том, что детерминация различных эмбриональных линий в популяции плюрипотентных клеток определяется флуктуациями в экспрессии факторов Oct4, Sox2, Nanog, Esrrb и Tbx3, экспрессирующихся на высоком уровне в недифференцированных плюрипотентных клетках и традиционно считающихся репрессорами их дифференцировки (Loh, Lim, 2011). Эти данные убедительно демонстрируют, что флуктуации генной экспрессии являются обязательным свойством плюрипотентных клеток, находящихся в метастабильном состоянии. Вероятно, при трансформации плюрипотентных клеток они могут его утрачивать и переходить в стабильное недифференцированное состояние, как например, линии ЭТК.

В заключение необходимо отметить, что в соответствии с принятыми на сегодняшний день представлениями линии плюрипотентных стволовых клеток составляют группу сходных клеточных ли-

ний различного происхождения, которые в процессе адаптации *in vitro* переходят в метастабильное состояние. Статус каждой клеточной линии может быть определен в пределах двух фаз плюрипотентности (ground state и primed state). Поддержание базового статуса плюрипотентности (ground state), включающего способность клеток данной линии участвовать в развитии половых клеток, может быть ассоциировано с экспрессией генов, специфических для линии половых клеток. Как показывают наши результаты, определенные соотношения уровней экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx4* могут служить молекулярными детерминантами базового и первичного статуса плюрипотентности. Статусы клеток тератокарцином представляют собой неопределенные устойчивые состояния с частичной аналогией статусам плюрипотентных клеток.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 11-04-0037-а). Авторы благодарны Т.М. Никоновой за помощь в подготовке гистологических срезов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Никонова Т.М. Регуляция *in vitro* и *in vivo* дифференцировки эмбриональных стволовых, эмбриональных герминативных и тератокарциномных клеток мыши факторами семейства TGFβ // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 6. С. 403–418.

Adewumi O., Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L. et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative // Nat. Biotechnol. 2007. V. 25. P. 803–816.

Brons I.G.M., Smithers L.E., Trotter M.W.B. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // Nature. 2007. V. 448. P. 191–195.

Cauffman G., Van de Velde H., Liebaers I. et al. DAZL expression in human oocytes, preimplantation embryos and embryonic stem cells // Mol. Hum. Reprod. 2005. V. 11. P. 405–411.

Chin M.H., Pellegrini M., Plath K. et al. Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. P. 263–269.

Clark A.T., Bodnar M.S., Fox M. et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro* // Hum. Mol. Genet. 2004. V. 13. P. 727–739.

Durcova-Hills G., Wianny F., Merriman J. et al. Developmental fate of embryonic germ cells (EGCs), *in vivo* and *in vitro* // Differentiation. 2003. V. 71. P. 135–141.

Gordeeva O.F. Normal and Pathological Development of Pluripotent Stem Cells // Pluripotent stem cellsю. Eds. Rosales D.W., Mullen Q.N. N.Y: Nova Sci. Publ. Ink., 2010. P. 1–45.

Guenther M.G., Frampton G.M., Soldner F. et al. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. P. 249–257.

Guo G., Yang J., Nichols J. et al. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency // Development. 2009. V. 136. P. 1063–1069.

Han D.W., Tapia N., Joo J.Y. et al. Epiblast stem cell subpopulations represent mouse embryos of distinct pregastrulation stages // Cell. 2010. V. 143. P. 617–627.

Hayashi K., Surani M.A. Resetting the epigenome beyond pluripotency in the germline // Cell Stem Cell. 2009. V. 4. P. 493–498.

Hovatta O., Jaconi M., Töhönen V. et al. A teratocarcinoma-like human embryonic stem cell (hESC) line and four hESC lines reveal potentially oncogenic genomic changes // PLoS ONE. 2010. V. 5. P. e10263.

Hübner K., Fuhrmann G., Christenson L.K. et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells // Science. 2003. V. 300. P. 1251–1256.

Kee K., Gonsalves J.M., Clark A.T. et al. Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells // Stem Cells Devel. 2006. V. 15. P. 831–837.

Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B. et al. Oct4 is required for primordial germ cell survival // EMBO Rep. 2004. V. 5. P. 1078–1083.

Kleinsmith L.J., Pierce G.B. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells // Cancer Res. 1964. V. 24. P. 1544–1551.

Lacham-Kaplan O. In vivo and *in vitro* differentiation of male germ cells in the mouse // Reproduction. 2004. V. 128. P. 147–152.

Laurent L.C., Ulitsky I., Slavin I. et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture // Cell Stem Cell. 2011. V. 8. P. 106–118.

Loh K.M., Lim B. A precarious balance: pluripotency factors as lineage specifiers // Ibid. 2011. V. 8. P. 363–369.

Mayshar Y., Ben-David U., Lavon N. et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells // Ibid. 2010. V. 7. P. 521–531.

McLaren A., Durcova-Hills G. Germ cells and pluripotent stem cells in the mouse // Reprod. Fertil. Devel. 2001. V. 13. P. 661–664.

Nagy A., Rossant J., Nagy R. et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 8424–8428.

Nayernia K., Nolte J., Michelmann H.W. et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice // Devel. Cell. 2006. V. 11. P. 125–132.

Nichols J.,Smith A. Naive and primed pluripotent states // Cell Stem Cell. 2009. V. 4. P. 487–492.

Ohinata Y., Payer B., O'Carroll D. et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice // Nature. 2005. V. 436. P. 207–213.

Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells // Ibid. 2007. V. 448. P. 313–317.

Pesce M., Schöler H.R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development // Stem Cells. 2001. V. 19. P. 271–278.

Resnick J.L., Bixler L.S., Cheng L. et al. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture // Nature. 1992. V. 359. P. 550–551.

Reynolds N., Cooke H.J. Role of the DAZ genes in male fertility // Reprod. Biomed. Online. 2005. V. 10. P. 72–80.

Reynolds N., Collier B., Maratou K. et al. Dazl binds in vivo to specific transcripts and can regulate the pre-meiotic translation of Mvh in germ cells // Hum. Mol. Genet. 2005. V. 14. P. 3899–3909.

Reynolds N., Collier B., Bingham V. et al. Translation of the synaptonemal complex component Sycp3 is enhanced *in vivo* by the germ cell specific regulator Dazl // RNA. 2007. V. 13. P. 974–981.

Rilianawati, Speed R., Taggart M. et al. Spermatogenesis in testes of Dazl null mice after transplantation of wild-type germ cells // Reproduction. 2003. V. 126. P. 599–604.

Saitou M., Barton S.C., Surani M.A. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice // Nature. 2002. V. 418. P. 293–300.

Saitou M., Payer B., O'Carroll D. et al. Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse // Cell Cycle. 2005. V. 4. P. 1736–1740.

Sharova L.V., Sharov A.A., Piao Y. et al. Global gene expression profiling reveals similarities and differences among mouse pluripotent stem cells of different origins and strains // Devel. Biol. 2007. V. 307. P. 446–459.

Silva J., Barrandon O., Nichols J. et al. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition // PLoS Biol. 2008. V. 6. P. e253.

Stewart C.L., Gadi I., Bhatt H. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line // Devel. Biol. 1994. V. 161. P. 626–628.

Takahashi K., Mitsui K., Yamanaka S. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells // Nature. 2003. V. 423. P. 541–545.

Tanaka S.S., Toyooka Y., Akasu R. et al. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells // Genes Devel. 2000. V. 14. P. 841–853.

Tang F., Barbacioru C., Bao S. et al. Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis // Cell Stem Cell. 2010. V. 6. P. 468–478.

Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells // Nature. 2007. V. 448. P. 196–199.

Tilgner K., Atkinson S.P., Golebiewska A. et al. Isolation of primordial germ cells from differentiating human embryonic stem cells // Stem Cells. 2008. V. 26. P. 3075–3085.

Toyooka Y., Tsunekawa N., Takahashi Y. et al. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development // Mech. Devel. 2000. V. 93. P. 139–149.

Toyooka Y., Tsunekawa N., Akasu R. et al. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 11457–11462.

Wood S.A., Pascoe W.S., Schmidt C. et al. Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture // Ibid. 1993. V. 90. P. 4582–4585.

Yang J., van Oosten A.L., Theunissen T.W. et al. Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. P. 319–328.

Ying Q., Wray J., Nichols J. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal // Nature. 2008. V. 453. P. 519–523.

Zhang C., Ye X., Zhang H. et al. GATA factors induce mouse embryonic stem cell differentiation toward extraembryonic endoderm // Stem Cells Devel. 2007. V. 16. P. 605–613.

Expression Patterns of Germ Line Specific Genes in Mouse and Human Pluripotent Stem Cells are Associated with Regulation of Ground and Primed State of Pluripotency

O. F. Gordeeva[a], N. V. Lifantseva[a], and S. V. Khaidukov[b]

[a] *Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

[b] *Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Makali 16/10, Moscow, 117997 Russia*

e-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Abstract—One of the main criteria of pluripotent cell lines is their ability to differentiate into the germ cell line. Lines of pluripotent stem cells with ground state of pluripotency are different from the lines with a primed state by ability to supply development of full gametes. To determine molecular mechanisms involved in regulation of different states of pluripotency, we investigated the expression patterns of genes involved in regulation of development of germ cell lines in different type pluripotent stem cells and the cells of mouse and human embryonal teratocarcinoma. We determined that pluripotent stem cells in vitro, cells of blastocyst, and gonocytes at stage E13.5 possess similar expression patterns in contrast to the ectoblast cells at stage E6.5. Quantitative real time PCR analysis showed that expression of gene *Vasa/Ddx4* in mouse and human embryonal stem cells is lower than in blastocyst and gonocytes. In addition, expression level of genes *Vasa/Ddx4* and *E-ras* is significantly higher in mouse embryonal stem cells than in human embryonal stem cells. We determined during cultivation of differentiating embryonal stem cells, embryonal germ mouse cells, and embryonal teratocarcinoma of mouse in the cultivation system promoting reprogramming the cells from primed to ground state of pluripotency (2i+LIF) that only pluripotent cells are able to regulate the expression level of genes *Oct4* and *Vasa/Ddx4* reducing initial state, while the expression level in the cells of embryonal teratocarcinomas remains unchanged. We suppose that gene expression patterns specific for germ cell lines in particular of *Vasa/Ddx4* gene can be involved in regulation of ground and primed states of pluripotency.

Keywords: pluripotent cells, embryonal stem cells, teratocarcinoma, germ cell line, blastocyst, ground state, *Vasa*, *Oct*, *E-ras*

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 6, с. 425–438

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

УДК 575.1/2: 577.1/2

ВЛИЯНИЕ ОКСИДА АЗОТА НА ЭКСПРЕССИЮ АПОПТОЗНЫХ ГЕНОВ И HSP70 У ДРОЗОФИЛЫ

© 2011 г. Л. Б. Джансугурова

Институт общей генетики и цитологии
050060 Алматы, пр. аль-Фараби, д. 75А
E-mail: leylad@mail.ru

Поступила в редакцию 20.08.2010 г.
Окончательный вариант получен 10.12.2010 г.

Данные об участии оксида азота в апоптозе противоречивы. Баланс между анти- и проапоптотическим действием оксида азота зависит от многих факторов, включая его концентрацию в ткани и взаимодействия с другими регуляторами апоптоза. В работе представлены результаты серии экспериментов по изучению влияния доноров и ингибиторов оксида азота, *dNOS1*- и *dNOS4*-трансгенов на апоптоз $Lobe^{RSV}$-мутантных линий дрозофилы и дикой линии *Oregon R*. Выявлено, что высокое содержание в клетках оксида азота способно подавлять антиапоптотическое действие HSP70 и стимулировать апоптоз, возможно через *grim*-опосредованный путь. Причем длительное воздействие высокой концентрации оксида азота в течение всего развития более эффективно сказывается на стимуляции проапоптотических генов, чем кратковременное действие этого агента.

Ключевые слова: оксид азота, апоптоз, тепловой шок, дрозофила

Изучение мессенджерных молекул, опосредующих огромное многообразие клеточных сигналов и регулирующих физиологические и патологические процессы, привлекает на сегодняшний день пристальное внимание исследователей во всем мире. В этой связи особый интерес вызывает уникальная сигнальная молекула оксид азота (NO). Оксид азота – двухатомный свободный радикал, содержащий неспаренный электрон с очень коротким периодом полураспада (2–10 сек). Уникальность оксида азота заключается в том, что, в отличие от других известных на сегодняшний день сигнальных молекул, NO, благодаря чрезвычайно малым размером, обладает способностью легко диффундировать сквозь клеточные мембраны и свободно проникать в межклеточное пространство сквозь плотные клеточные слои, действуя на соседние мишени. NO не только опосредует клеточные сигналы, но и является составной частью внутриклеточных эффекторных систем.

Оксид азота эндогенно вырабатывается в клетках с помощью фермента синтазы оксида азота (NOS), катализирующего образование NO и L-цитруллина из L-аргинина. К настоящему времени у млекопитающих идентифицированы 3 изоформы NOS, каждая из которых кодируется собственным геном, и различающихся по клеточной специфичности и механизмам регуляции: нейрональная, эндотелиальная и макрофагальная NOS. У дрозофилы NOS ген кодирует 10 различных транскриптов, которые могут образовывать, по крайней мере, 7 протеинов, только один из которых (DNOS1) в димерной форме ферментативно активен (Stasiv et al., 2004; Кузин и Слезингер, 2005).

Диапазон проявлений биологической активности NO огромен. Известно, что оксид азота регулирует тонус гладкой мускулатуры сосудов, бронхов, пищеварительной, мочеполовой и других систем. Передача нервных импульсов осуществляется с помощью NO. Предполагается, что NO является медиатором функции памяти и болевой рецепции. Широко обсуждается участие этой сигнальной молекулы в механизмах иммунной защиты. У *Drosophila* оксид азота принимает участие в развитии зрительной системы, в регуляции иммунитета и поведения, в осморегуляции и регуляции клеточного цикла и процессов дифференцировки в период раннего эмбриогенеза и метаморфоза (Kuzin et al., 1996; Кузин и Слезингер, 2005, 2009).

Данные об участии оксида азота в апоптозе противоречивы. Баланс между анти- и проапоптотическим действием оксида азота зависит от многих факторов, включая его концентрацию в ткани и взаимодействия с другими регуляторами апоптоза (Kim et al., 2001).

Реализация апоптоза у *Drosophila melanogaster* требует активности действующих в комплексе специфических генов: *rpr*, *hid* и *grim* (Song et al., 2000; Kim et al., 2001; Richardson and Kumar, 2002). Существуют также данные, что эти гены способны ин-

дуцировать апоптоз самостоятельно, независимо транскрибируясь под действием различных апоптоз-индуцирующих стимулов (Bangs et al., 2000). Достаточно много аспектов функционирования этих генов и белок-белковых взаимодействий с другими компонентами апоптозного механизма остаются неясными. Особенно далека от разрешения роль гена *grim*.

Во многих работах показано участие белка теплового шока (Hsp70) в регуляции апоптоза (Sreedhar and Csermely, 2004; Beere, 2005; Arya et al., 2007). Семейство Hsp70 высококонсервативно, разнообразно и включает как конститутивные, так и стресс-индуцибельные формы. Накапливающиеся данные позволяют предположить, что белки теплового шока каким-то образом блокируют пути активации апоптоза и стабилизируют клеточные структуры или взаимодействуют с антиапоптотическими белками, усиливая их эффект. Несмотря на убедительные доказательства антиапоптотической роли белков теплового шока, точные механизмы супрессии апоптоза с их помощью пока не ясны. Кроме того, известно, что суперэкспрессия Hsp70 может определяться действием оксида азота (Bangs et al., 2000).

В настоящей работе предпринята попытка выяснить характер действия оксида азота на апоптоз и определить возможное участие в этом взаимодействии белка теплового шока Hsp70.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования служили следующие линии мух *Drosophila melanogaster*:

1) *Oregon R* – дикая линия;

2) *Df* (*Lobe*) – *Bl Df* (*2R*)/L^{+R48}/*CyO* – делеция по локусу *Lobe*;

3) Серия онковирус-индуцированных аллельных мутаций по локусу Lobe (2-72.0) (Габитова и др., 1991; Nabirochkin et al., 1998):

–$L^{R,RSV(Er)}$ – доминантный аллель; фасеточное поле редуцировано на 80–95%, у 10% мух дуплицированы вибриссы. Пенетрантность 100% (25°C);

–$L^{R,RSV(Fes)}$ – доминантный аллель; фасеточное поле редуцировано на 5–10%; у 10% мух дуплицированы вибриссы. Пенетрантность 100% (25°C);

–$L^{r,RSV(ad)}$ – рецессивный аллель; фасеточное поле редуцировано на 15–20%; у 30–90% мух дуплицированы антенны; у 70–80% – вибриссы. Пенетрантность 81% (25°C);

–$L^{r,RSV(fem)}$ – рецессивный аллель; фасеточное поле редуцировано на 5–10%; у 70–80% мух дуплицированы вибриссы. Пенетрантность 60% (25°C).

4) Трансгенные линии, содержащие дополнительные копии кДНК *DNOS* гена (линии были любезно предоставлены Б.А. Кузиным):

HS dNOS1 – содержит в Х-хромосоме копию кДНК *DNOS* под HS-промотором, транскрибирующуюся в полноразмерный функциональный транскрипт, маркирована мутациями *y* и w^a;

–*HS dNOS4* – в III хромосоме несет копию кДНК *DNOS* под HS-промотором, транскрибирующуюся в усеченный, нефункциональный транскрипт, маркирована мутациями *y* и w^a;

–*HS dNOS1 Flag* – содержит в Х-хромосоме Flag-вектор с кДНК *DNOS* под HS-промотором, транскрибирующуюся в полноразмерный функциональный транскрипт, маркирована мутациями *y* и w^a;

–*wGMR dNOS4*; *sp/CyO*; *Sb/TM3* – содержит в Х-хромосоме копию кДНК *DNOS* под GMR-промотором, транскрибирующуюся в усеченный, нефункциональный транскрипт, маркирована мутациями *Cy* и *Sb*.

Мух содержали на стандартной питательной среде при 25°C.

Синхронизация культур. Для получения синхронизированных кладок эмбрионов за день до сбора половозрелых самок отсаживали от самцов для сброса яиц. На второй день самок скрещивали с самцами и 1 час выдерживали на голоде для стимуляции спаривания. После чего мух помещали в специальные стаканчики, съемное дно которых заполнено питательной средой, обогащенной дрожжами и агар-агаром, поверхность корма предварительно смазывали винным уксусом. Далее кисточкой собирали синхронизированные 2-часовые кладки эмбрионов. Для получения культур личинок эмбрионы помещали в термостат на 25°C. Личинок выращивали до III-го возраста (96 часов развития).

Обработка донорами и ингибиторами оксида азота. В работе использовали 0.001 М концентрации растворов доноров (*S-nitroso-N-acethyl-penicillamine* (SNAP) и *lipopolysacharide* (LPS)) и ингибиторов (N^{ω}*-nitro-L-arginine* (LNNA) и *S-methyl-L-tiocitrulline-acetate* (Ltc)) оксида азота.

Для морфологического анализа проводили микроинъекции растворов доноров (SNAP и LPS) и ингибиторов (LNNA и Ltc) оксида азота в область развивающихся глазо-антенных дисков синхронизированных культур личинок дрозофилы III-го возраста (96 ч развития). Для микроинъекций использовали ручной микроманипулятор *FemtoJet* (Eppendorf, Germany). Количество инъецированного материала – 1 μl.

Для цитогенетического анализа применяли 5-минутную обработку изолированных слюнных желез указанными растворами данных веществ.

Для иммуноцитохимического анализа личинок III-го возраста в течение 5-ти мин обрабатывали растворами доноров и ингибиторов NO, после получасовой инкубации в физиологическом раство-

ре (1xPBS) личинок фиксировали, далее готовили гистологические препараты.

Индукция теплового шока. Индукцию теплового шока проводили помещением пробирок, содержащих культуры личинок, в водяной термостат при 37°C на 1 ч. После чего отбирали личинок в следующих временных интервалах: непосредственно после теплового шока, 5, 20, 30 мин, 2–3 и 5–6 ч после индукции теплового шока.

Приготовление постоянных препаратов политенных хромосом. Слюнные железы выделяли из личинок III-го возраста (96 ч развития) в физиологическом растворе PBS (130 мМ NaCl, 7 мМ Na_2HPO_4, 3 мМ NaH_2PO_4, pH 7.0). Железы помещали в каплю 45%-ной уксусной кислоты и готовили давленый препарат, накрыв покровным стеклом. Приготовленный препарат помещали в камеру с жидким азотом на 20 мин, после чего покровное стекло скалывали лезвием. Для удаления остатков уксусной кислоты проводили обезвоживание препарата в 2-х сменах 96% этанола в течение 15 мин. Препарат сушили на воздухе и окрашивали 2% раствором ацетоорсеина в течение 5 мин. Препараты анализировали при помощи микроскопа *Leica DM LB* в проходящем свете при увеличениях 10 × 40 и 10 × 100.

Приготовление гистологических препаратов. Гистологические препараты готовили по стандартной методике с небольшими модификациями. Личинок III-го возраста фиксировали раствором Буэна в течение 1–3 сут. После фиксации объекты отмывали от фиксатора в 70% этаноле в течение 1 сут. Затем проводили обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации, выдерживали в смеси 100% спирта и хлороформа (1 : 1) и в чистом хлороформе. Парафинизацию проводили с предварительной проводкой объектов через хлороформно-парафиновую кашу (37°C) и две смены парафина (56°C). Заливку в парафин проводили на часовом стекле, смазанном глицерином. Готовили срезы толщиной 5–7 микрон.

Иммуногистохимический анализ. Иммуногистохимию проводили на неокрашенных гистологических препаратах с использованием моноклональных антител (anti iNOS, anti dHSP70), полученных С.Г. Георгиевой и Б.А. Кузиным в Институте биологии гена РАН (г. Москва, Россия). Методика Roche Molecular Biochemicals (kit: Cat.No. 1089153 Immunotech) была модифицирована для использования гистологических препаратов дрозофилы. После депарафинизации в двух сменах ксилола денатурацию осуществляли путем кипячения стекол в цитратном буфере (Citric acid 0.1 M, Sodium citrate 0.1 M) в течение 4 мин под давлением с использованием микроволновой печи при мощности 750 Вт. Далее стекла споласкивали в растворе 1xTBS (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5). Препараты фиксировали ацетоном при 20°C в течение 10 мин. Отмывали в растворе TBSTB (TBSx1, BSA 1%, Tween 20 0.1%) в течение 15 мин, 25°C. Первичное антитело anti iNOS наносили в разведении 1 : 500, anti dHSP70 – в разведении 1 : 2000 (согласно протоколам производителя антител – лаборатории нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена РАН). Для ровного распределения антитела и во избежание его испарения предметное стекло накрывали покровным и закрывали парафильмом (PARAFILM "M", LABORATORY FILM, American National Can™, Chicago, IL. 60631), после чего проводили инкубацию во влажной камере при 25°C в течение 2 ч. Образцы отмывали в TBSTB 2 раза по 10 мин. В качестве вторичного антитела использовали ассоциированные с пероксидазой хрена биотинизированный крысиный IgG1 (разведение 1 : 1000, Immunotech, France) для anti iNOS, и мышиный IgG1 (разведение 1 : 1000, Immunotech, France) для anti dHSP70. Инкубацию проводили при 25°C в течение 1 ч во влажной камере. Визуализацию связывания антител осуществляли при помощи DAB-реакции. Для этого на каждое стекло наносили водные растворы DAB (Diaminobenzidine 0.7 mg/ml и H_2O_2/Urea 0.6 mg/ml), инкубировали 10 мин. После реакции насыщения реакцию останавливали ополаскиванием образцов в TBSTB. Окрашивание препаратов осуществляли по методу Романовского-Гимза, после чего заключали в Tris-glycerol mountant (глицерин 90%, Tris HCl pH 8.0 0.1 M). Препараты анализировали при помощи микроскопа Leica DM LB в проходящем свете при увеличениях 10 × 10, 10 × 20, 10 × 40, 10 × 63 и 10 × 100.

Определение апоптоза методом прижизненной окраски акридин-оранжевым. Выделение органов и имагинальных дисков из личинок и куколок проводили под бинокуляром на предметном стекле в капле фосфатного физиологического буфера *PBS* (*130 мМ NaCl, 7 мМ Na_2HPO_4, 3 мМ NaH_2PO_4, pH 7.0*). Выделенные органы помещали на чистое предметное стекло, окрашивали акридин-оранжевым красителем в концентрации 5 мкг/мл (pH 7.2) в течение 5 мин и осторожно (без раздавливания) покрывали предметным стеклом. Препараты анализировали под флуоресцентным микроскопом в области зеленого, $\lambda = 530–570$ нм, и красного свечения, $\lambda = 620–750$ нм. Были использованы фильтры green N 2.1 (Illumination path – BP 515-560, Dichronic mirror (reflector) – 580, Observation path – LP 590) и blue N 1.3 (Illumination path – BP 450-490, Dichronic mirror (reflector) – 510, Observation path – LP 515).

Определение апоптоза TUNEL-методом. Для TUNEL-метода использовали неокрашенные гистологические препараты личинок III-го возраста. Гистологические препараты депарафинизировали в двух сменах ксилола, регидратацию осуществляли последовательной проводкой по спиртам пони-

жающейся концентрации. Далее препараты обрабатывали протеиназой К. Инактивацию эндогенных пероксидаз проводили 3% раствором перекиси водорода в метаноле. Для мечения ДНК-фрагментов использовали набор реактивов "*The TdT FragEL™kit*" (Sigma, США), с использованием меченых биотином dDNTP и *Klenow*-фрагмента DNA-*polymerase I*. Детекцию проводили при помощи стрептавидин-пероксидазного конъюгата и диаминобензидина в качестве субстрата. В качестве позитивного и негативного контроля использовали HL60 клетки промиелоцитной лейкемии и HL60 клетки, инкубированные с 0.5 μg/ml актиномицином в течение 19 ч для индукции апоптоза. После дополнительной окраски 2% красителем Гимза в течение 5 мин препараты анализировали при помощи микроскопа Leica DM LB в проходящем свете при увеличениях 10 × 10, 10 × 20, 10 × 40, 10 × 63 и 10 × 100.

Выделение РНК и синтез кДНК. Экстракцию мРНК осуществляли из личинок III-го возраста с использованием RNA STAT-60 набора реагентов (Tel-Test Inc., TX, USA) согласно протоколу компании-производителя. Концентрации РНК определяли спектрофотометрически (λ = 260, 280 и 320 нм). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов компании Sileks (Россия) согласно инструкциям производителя. Реакция осуществлялась в 25 μl реакционной смеси, содержащей 2 μg тотальной мРНК.

RT-PCR analysis. Реакцию проводили в 20 μl реакционной смеси, содержащей по 0.3 μM каждого праймера и 0.5 μl кДНК. Условия ПЦР: 1) для *hsp70* гена (s 5'-CTG CGA GTC GTT GAA GTA CG-3' и as 5'-TCG GTA TTG ATC TGG GAA CC-3'): 94°C – 2 мин 30 сек, далее 35 циклов: 94°C – 45 сек, 56°C – 45 сек, 72°C – 1 мин. Реакцию останавливали при 72°C в течение 10 мин; 2) для *dNOS1* гена (s 5'-TTG TTG TGG CCT CCA CCT TT-3' и as 5'-CAA TCC ATG CTC GGA AGA CTC-3'): 94°C – 2 мин, далее 40 циклов: 94°C – 15 сек, 60°C – 1 мин. Реакцию останавливали при 60°C в течение 30 сек; 3) для гена *grim* (s 5'-ATG AGG ACG ACG TTA CC-3' и as 5'-TTC TTG TTG CTG CGG TTG-3'): 95°C – 30 сек, 53°C – 30 сек, 72°C – 40 сек. Реакцию останавливали при 72°C в течение 7 мин. Амплификацию фрагментов гена β-actin (s 5'-CGT CGA CAA TGG ATC TGG AA-3' и as 5'-CGA CCA TCA CAC CCT GAT GA-3') применяли в качестве внутреннего контроля реакции. Для визуализации ПЦР продуктов использовали 2% агарозный гель.

Western-blot анализ. 20 μg белкового экстракта на основе гомогената ткани личинок III-го возраста в разделяли с помощью 8% SDS-PAGE гель-электрофореза при 100 V и 4°C. Осуществляли перенос полипептидов на PVDF мембрану (Immobilon™-P transfer membrane, Millipore Corporation) в течение 1.5 ч при 200 мА и 4°C. После блокирования свободных мест связывания буфером А (5%-ное обезжиренное молоко, 10 мМ Трис-HCl, pH 7.5; 100 мМ NaCl и 0.1% Твин-20) в течение 1 ч при комнатной температуре блоты инкубировали с моноклональными антителами к индуцибельной синтазе окиси азота (iNOS) в разведении 1 : 250. Первичные антитела к HSP-70 (SantaCruz, CA, USA) использовали в разведении 1 : 4000. Связывание с первичными антителами выявляли путем инкубации блотов с мышиным иммуноглобулином IgG, меченым пероксидазой хрена. Проявление проводили с помощью реагентов для усиленной хемилюминесценции согласно инструкции фирмы-производителя (*Amersham International*, UK).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания модельной системы изучения регуляции апоптоза у дрозофилы мы использовали серию онковирусиндуцированных аллельных мутантных линий $Lobe^{RSV}$, связанных с нарушениями развития глазо-антенных дисков. Как известно, при нормальном развитии во время метаморфоза не происходит апоптоза имагинальных дисков дрозофилы. Однако $Lobe^{RSV}$-мутанты имеют нарушения в развитии глазо-антенных дисков, связанные с редукцией числа фасеток глаза и дупликациями некоторых головных структур. Определение роли апоптоза в формировании мутантного фенотипа у *Lobe*-аллелей *Drosophila melanogaster* показало, что в отличие от нормы у мутантов в ходе метаморфоза происходит апоптотическая гибель клеток в имагинальных глазо-антенных дисках. Причем интенсивность апоптоза коррелирует с числом фасеток у имаго: чем меньшее число фасеток характерно для взрослых особей данной линии, тем активнее протекает апоптоз в имагинальных дисках во время метаморфоза (Мить и др., 2004; Толебаева и др., 2009). Были изучены временны́е интервалы индукции апоптоза в глазо-антенных имагинальных дисках синхронизированных культур личинок и куколок мутантных аллелей локуса *Lobe* (таблица 1). Однако интенсивность апоптотических изменений на разных стадиях развития для этих мутаций носит индивидуальный характер. На рисунке 1 представлен глазо-антенный комплекс $Lobe^{r,RSV(ad)}$-мутанта. В качестве отрицательно контроля использовали личинок линии *Oregon R*, в качестве отрицательного – личинок линии с делецией по локусу *Lobe* – $BlDf(2R)/L^{+R48}/CyO$.

Таким образом, фенотипы мутантных аллелей $Lobe^{RSV}$-группы, выражающиеся в различной степени редукции фасеточного поля и дупликациях кутикулярных структур у имаго, могут служить хорошими маркерами апоптоза в глазо-антенных имагинальных дисках во время метаморфоза.

Таблица 1. Время возникновения апоптотических изменений в глазо-антенных дисках $Lobe^{RSV}$-аллелей дрозофилы

Линия мух	Часы развития							
	90–91	92–94	95	96–98	105–109	110	111–112	113–115
$L^{R,RSV(Er)}$	–	+	+	+	+	+	+	+
$L^{R,RSV(Fes)}$	–	+	+	+	+	–	–	–
$L^{r,RSV(ad)}$	–	–	+	+	+	+	–	–
$L^{r,RSV(fem)}$	–	–	–	+	+	+	–	–
$BlDf\,(2R)/L^{+R48}/CyO$	–	–	–	–	+	+	+	–
Oregon R	–	–	–	–	–	–	–	–

Эксперименты по изучению влияния доноров (SNAP и LPS) и ингибиторов (LNNA и Ltc) NO, введенных в развивающиеся глазо-антенные диски с помощью метода микроинъекций, показали, что повышение концентрации NO ведет к усилению интенсивности апоптоза, а понижение синтеза эндогенной оксида азота ведет к супрессии апоптоза.

Повышение концентрации NO в развивающихся имагинальных дисках мутантов $Lobe^{RSV}$-группы ведет к уменьшению числа оптических фасеток вплоть до полной редукции глаза, недоразвитию головных структур, а также к гипотрофии грудных структур (рисунок 2).

Причем эффект LPS выражен сильнее, чем у SNAP. Липополисахариды являются известными сигналами, стимулирующими специфическую индукцию экспрессии гена *dNOS* в макрофагах. Нитрозосоединение SNAP при попадании в организм распадается с образованием большого количества окиси азота (Nagy et al., 2005). Надо отметить, что эффект SNAP является кратковременным, так как молекула NO живет всего около 5 сек. Действие LPS будет более длительным, поскольку он стимулирует экспрессию *dNOS* гена. Способностью NO легко диффундировать через плотные клеточные слои и распространяться через лимфу можно объяснить то, что фенотипические эффекты действия доноров проявляются не только на глазо-антенных структурах, но и на развитии других головных и грудных сегментов.

Мы считаем, что фенотипическое действие доноров NO на редукцию фасеток глаза происходит за счет усиления интенсивности апоптоза в глазо-антенных имагинальных дисках. Тот факт, что при использовании личинок дикой линии *Oregon R* (позитивный контроль) также происходит редукция фасеточного поля, свидетельствует о том, что NO способен индуцировать апоптоз *de novo*. Это же подтверждается гипотрофией других головных и грудных структур (ротовой аппарат, ноги, крылья, грудные сегменты) у *Lobe*-мутантов, особей *Oregon R* и *Df(Lobe)*.

Анализируя фенотипы имаго в результате применения ингибиторов фермента синтазы оксида азота (LNNA и Ltc), можно сделать вывод, что понижение синтеза эндогенного NO имеет противо-

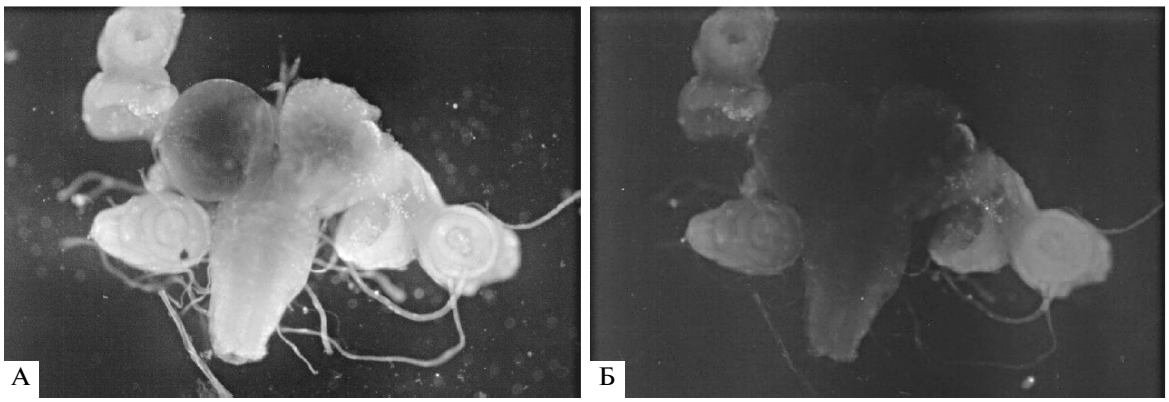


Рис. 1. Прижизненная окраска акридин-оранжевым красителем глазо-антенного комплекса личинок III-го возраста $Lobe^{r,RSV(ad)}$-мутанта. А – фильтр blue N 1.3; Б – фильтр green N 2.1.

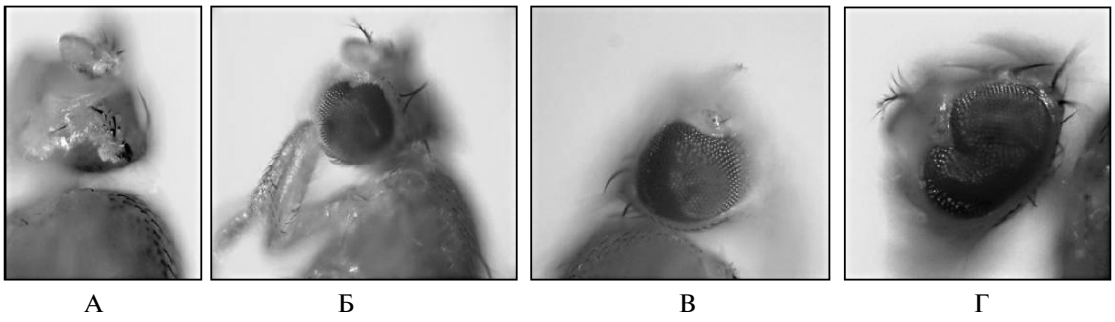


Рис. 2. Действие доноров NO на фенотипы $Lobe^{RSV}$-мутантов. А – $L^{R,RSV(Er)}$ – полная редукция глаза, действие LPS; Б – $L^{R,RSV(Fes)}$ – 5% редукция глаза, ротовой аппарат редуцирован, недоразвитие ног, действие LPS; В – $L^{r,RSV(fem)}$ – 5% редукция глаза, кутикулярный вырост, действие SNAP; Г – $L^{R,RSV(Fes)}$ – 5% редукция глаза, кутикулярные выросты на месте вырезки, действие SNAP.

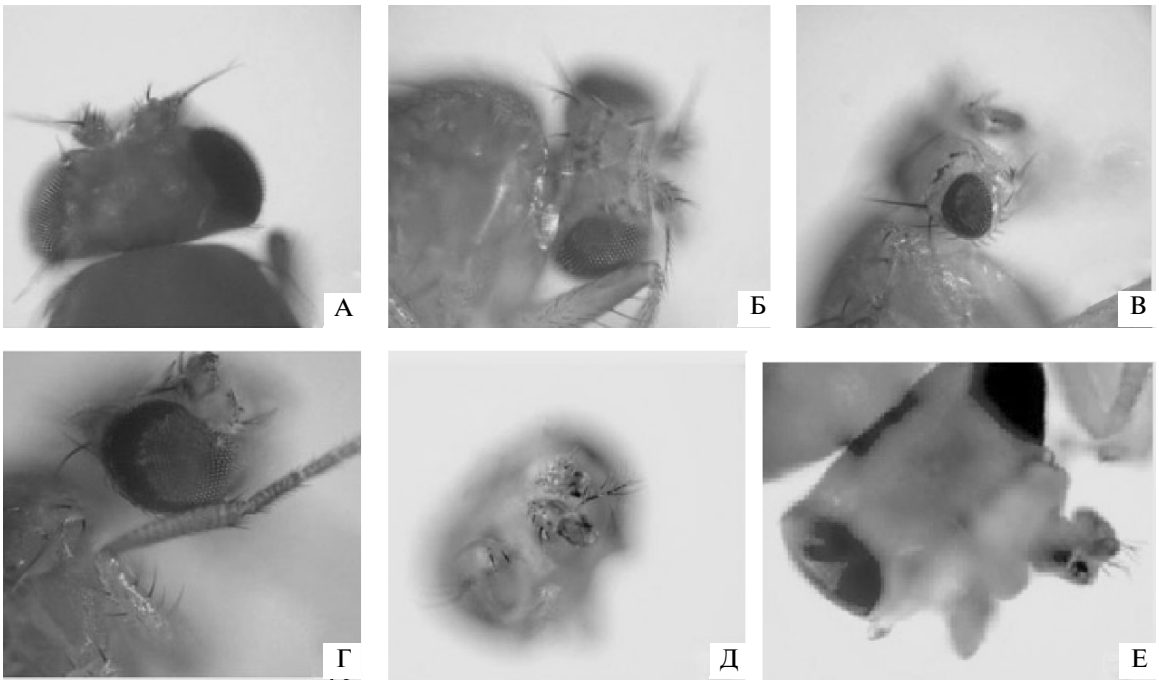


Рис. 3. Действие ингибиторов NO на фенотипы $Lobe^{RSV}$-мутантов. А – *Oregon R* – 5% гипертрофия правого глаза, действие L-тиоцитрулина, действие LNNA; Б – *Oregon R* – 2% гипертрофия глаза, гипертрофия ног; В – $L^{R,RSV(Er)}$ редукция числа фасеток глаза на 30% (вместо 95%), действие L-тиоцитрулина; Г – $L^{r,RSV(fem)}$ – редукция 4–5% (вместо 40%), кутикулярный вырост, гипертрофия ног, действие L-тиоцитрулина; Д – $L^{r,RSV(ad)}$ – дупликация антенн и увеличение их размеров, действие L-тиоцитрулина; Е – $L^{r,RSV(ad)}$ – розетковидная антенна, действие LNNA.

положный действию доноров NO эффект (рис. 3). Так, в случае мутантов локуса *Lobe* происходит увеличение числа фасеток глаза по сравнению с фенотипом каждого конкретного мутантного аллеля. Появление дупликаций антеннальных структур и кутикулярных выростов у *Lobe*-мутантов, гипертрофированных сегментов грудного щитка, крыльев и ног у *Lobe*-мутантов, а также в случаях позитивного (линия *Oregon R*) и негативного (линия *Df(L)*) контроля, вероятно, происходит за счет угнетения процесса апоптоза в развивающихся имагинальных дисках.

Эффект действия доноров и ингибиторов NO на пролиферативные процессы был ранее отмечен Б. Кузиным с соавторами: ингибиторы NO стимулировали пролиферативные процессы в развивающихся имагинальных дисках, а доноры NO ускоряли процесс дифференциации в имагинальных дисках. Авторы сделали вывод, что NO действует в качестве антипролиферативного агента в развитии дрозофилы, контролируя баланс между клеточной

пролиферацией и клеточной дифференцировкой (Kuzin et al., 1996). Возможно, нарушения развития глазо-антенного комплекса опосредованы взаимодействием NO с ретинобластома (*Rb*) – зависимой регуляцией клеточного цикла (Kuzin et al., 2000).

Эксперименты с использованием трансгенных линий дрозофилы, несущих функциональные (*dNOS1*) и нефункциональные (*dNOS4*) копии *dNOS*-гена (Stasiv et al., 2004), показали сходный фенотипический эффект действия NO. *Lobe*-мутантов мы скрещивали с трансгенными линиями в обоих направлениях (прямое и обратное скрещивание), в качестве позитивного контроля использовали скрещивания трансгенных линий с мухами *Oregon R*, в качестве негативного – с мухами, несущими делецию по локусу *Lobe*. Развивающихся гибридных личинок F_1 и F_2 стрессировали при 37°C в течение 1 ч для стимуляции HS-промотора. Фенотипические изменения наблюдали у имаго.

dNOS1-трансген, кодирующий образование полноразмерного пептида, оказывал фенотипическое действие, ранее отмеченное нами после применения доноров NO: увеличение редукции числа фасеток глаза, недоразвитие головных и грудных структур. *dNOS4*-трансген, кодирующий образование усеченного полипептида, оказывал гипертрофическое действие на развитие глазных и грудных структур имаго: у всех мутантов $Lobe^{RSV}$-группы редукция глаза была выражена слабее, чем это характерно для проявления аллеля, в отдельных случаях восстанавливалось нормальное число фасеток глаза и были случаи гипертрофии до 105%.

Следует отметить, что регулирующий апоптоз эффект NO обнаружен нами только в тех органах, в развитии которых апоптоз был замечен ранее. Так, у использованных нами в качестве негативного контроля мутантов *Df(Lobe)* число фасеток глаза не изменялось, однако регистрировались крыловые и ножные изменения.

Наличие апоптозных изменений регистрировали TUNEL-методом. На рисунках 4 и 5 представлены данные использования TUNEL-метода для определения зон апоптоза при нормальном метаморфозе и при использовании доноров и ингибиторов NO.

Эксперименты по влиянию NO на изменение пуффинга политенных хромосом проводили на мухах дикого типа *Oregon R* как с использованием микроинъекций доноров и ингибиторов оксида азота, так и с использованием трансгенных линий – у гибридных личинок после индукции теплового шока.

Во всех вариантах эксперимента проведено картирование районов локализации про- и антиапоптотических генов дрозофилы. В табл. 2 представлены сводные данные цитогенетического анализа. Поскольку для индукции экспрессии трансгена использовали температурную обработку, то определяли также характерный для теплового шока специфический пуффинг.

Установлено, что при действии донора оксида азота SNAP и *dNOS1*-трансгена определяется специфический пуффинг в районе локализации основных генов апоптоза дрозофилы *rpr*, *hid* и *grim* (3L, 75C-D), активируется экспрессия других индукторов апоптоза – генов *dmp53* (3R, 94D – пуф или междиск) и *dFadd* (3R, 94A1 – пуф), происходит инактивация работы ингибиторов апоптоза, генов *Diap1* (3L, 72D – пуф) и *dBcl* (2R, 42C – диск) (рис. 6). Активация генов, кодирующих инициаторы и эффекторы каспаз (*Strica*, *Damm*, *Dcp-1*, *Dronc*, *Decay*, *Drice*), свидетельствует о раннем начале апоптотических событий в линиях с повышенным содержанием оксида азота. Действие донора эндогенного оксида азота LPS на индукцию апоптоза было не столь очевидно.

При действии ингибиторов оксида азота и *dNOS4*-трансгена наблюдается эухроматизация в районе локализации антиапоптотического гена *Diap2* (2R, 52D – междиск), снижение экспрессии проапоптотического гена *dmp53* (3R, 94D – диск или междиск) и выключение работы гена *Dcp-1* (2R, 59E – диск), кодирующего эффектор каспаз (рис. 6). Вероятно, в линиях с пониженным содержанием оксида азота помимо общего механизма подавления апоптоза до наступления метаморфоза, связанного с ингибированием экдизонзависимого рецепторного пути апоптоза, действуют дополнительные факторы, сдерживающие запуск программированной клеточной гибели. Следует отметить, что эффект *dNOS*-трансгенов был выражен сильнее действия доноров и ингибиторов NO. По-видимому, это связано с тем, что действие трансгенов более продолжительно.

Отмечено, что при действии доноров оксида азота наблюдается гетерохроматизация в районе локализации гена *hsp-70* (3R, 87C). По данным SDS-электрофореза белковых экстрактов слюнных желез личинок, обработанных SNAP, наблюдается заметное снижение концентрации полипептидов с молекулярной массой 70 кDa (масса Hsp-70). Возможно, это является результатом снижения транскрипционной активности гена *hsp-70*.

Для наблюдения действия дополнительных копий *dNOS1*-гена в динамике (различное время после индукции теплового стресса) мы применили RT-PCR с использованием специфических праймеров к кДНК мРНК генов *dNOS1*, *hsp70* и *grim*. Было показано, что непосредственно после индукции теплового стресса дополнительные копии *dNOS1* гена в трансгенных линиях *HS dNOS1* и *HS dNOS1 Flag* экспрессируются на высоком уровне в течение 2–3 ч. Затем уровень экспрессии *dNOS1* уменьшается, но остается заметным вплоть до 5–6 ч после индукции стресса (рис. 7). Это под-

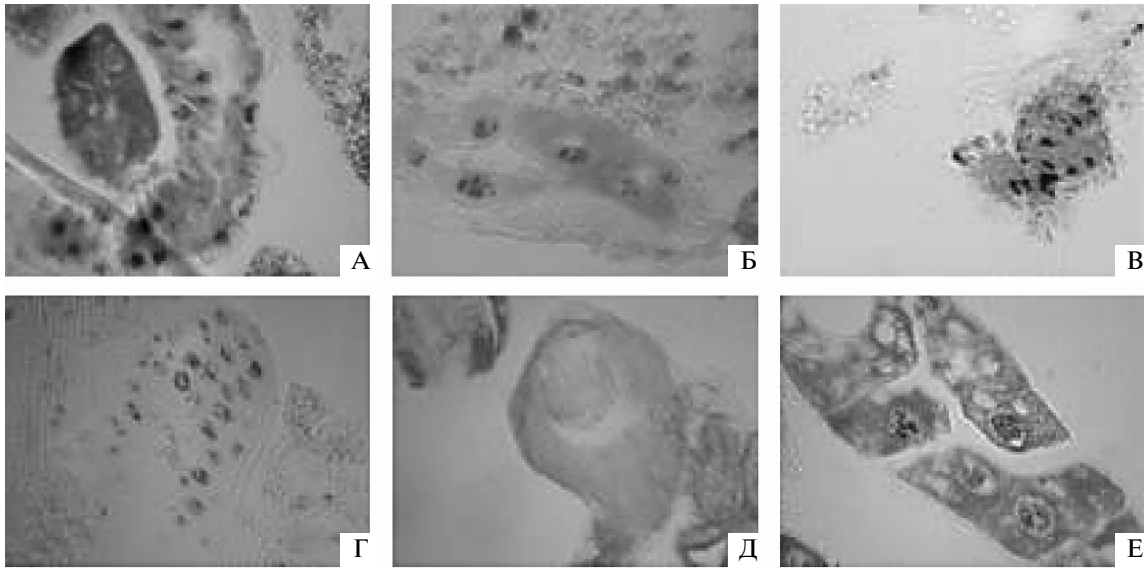


Рис. 4. Идентификация апоптоза TUNEL-методом при метаморфозе *Drosophila melanogaster* в норме. А – средний отдел кишечника, линия *Oregon R*, 10 × 40; Б – мальпигиевый сосуд, линия *Oregon R*, 10 × 40; В – жировое тело, линия *Oregon R*, 10 × 40; Г – слюнные железы, линия *Oregon R*, 10 × 40; Д – крыловой имагинальный диск, линия *Oregon R*, 10 × 40; Е – клетки пищевода на начальных стадиях апоптоза, линия *Oregon R*, 10 × 40.

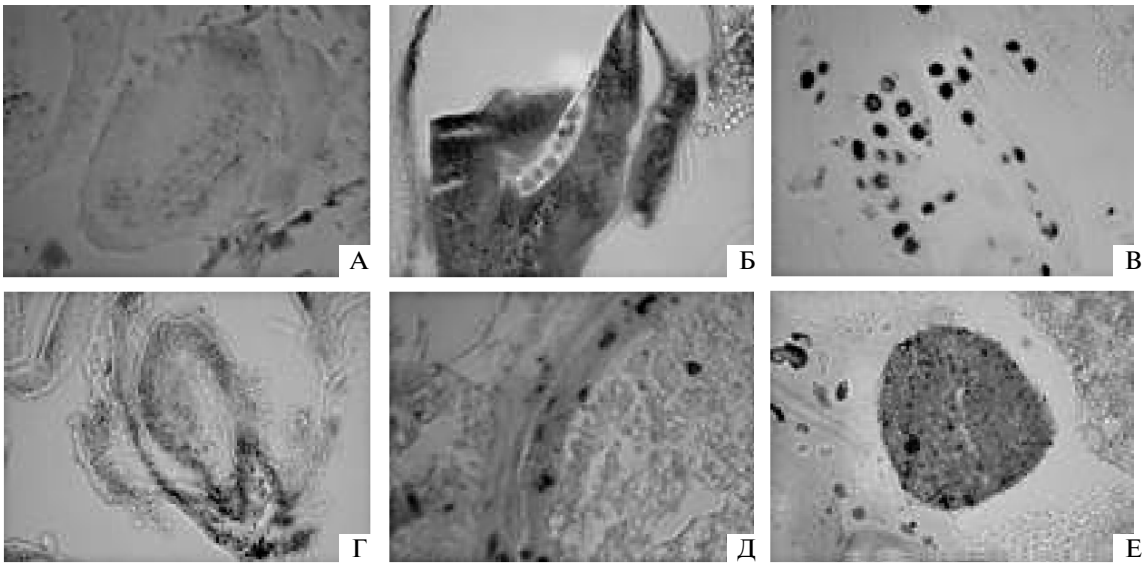


Рис. 5. Апоптоз при действии доноров и ингибиторов оксида азота. А – глазо-антенный диск, линия $Lobe^{RSV,ad}$, действие LPS, 10 × 63; Б – слюнные железы, линия $Lobe^{RSV,Er}$, действие LPS, 10 × 63; В – жировое тело, линия $Lobe^{RSV,fem}$, действие SNAP, 10 × 63; Г – крыловой диск, линия $Lobe^{RSV,Fes}$, действие SNAP, 10 × 63; Д – средний отдел кишечника, линия *Oregon R*, действие LNNA, 10 × 63; Е – глазо-антенный диск, линия $Lobe^{RSV,Er}$, действие Ltc, 10 × 40.

тверждается также иммуногистохимически (рис. 8): в интактном контроле DNOS белок определяется в небольшом количестве в покровных тканях, в линии *HS dNOS1* его много как в покровных тканях, так и в жировом теле, мальпигиевых сосудах, стенках кишечника.

RT-PCR с использованием специфических праймеров к кДНК мРНК *hsp70* гена также выявляет резкое увеличение экспрессии *hsp70* непосредственно после индукции теплового стресса, наблюдаемое как в линии *Oregon R*, так и в *dNOS1*-трансгенных линиях (рис. 9). Экспрессия *hsp70* гена остается на высоком уровне в течение 2–3 ч, значительное уменьшение экспрессии наблюдается по истечении 5–6 ч. Результаты RT-PCR подтверждаются Western-блот анализом (рис. 10) и

Таблица 2. Пуффинг в политенных хромосомах слюнных желез дрозофилы при действии оксида азота

Цитогенетическая локализация	Гены и кодируемые протеины	Контроль (линия *Oregon R*)	Действие доноров NO		Действие ингибиторов NO		Действие *dNOS1* трансгена		Действие *dNOS4* трансгена	
			SNAP	LPS	LNNA	Ltc	*HS dNOS1*	*HS dNOS1 Flag*	*HSdNOS4*	*wGMR dNOS4; sp/CyO; Sb/TM3*
X(1B)	Dredd – инициатор каспаз	МД	МД	МД	МД	МД	**МД//П**	МД	МД	МД
2L (32B)	dNOS – полипептид синтазы оксида азота	МД	МД	**П**	МД	МД	МД	МД	Д//МД	МД
2R (42A)	Strica(dream) – инициатор каспаз	Д//МД	Д	Д	Д	Д	МД	**МД//П**	МД//Д	МД//Д
2R (42C)	dBcl – белок митохондрий, ингибитор апоптоза	Д//МД	МД	Д	**П**	МД	**Д**	**Д**	Д//МД	МД//Д
2R (48C5)	Damm – эффектор каспаз	Д	МД	Д	**МД**	Д	**Д//МД**	Д	Д	Д
2R (52D2)	Diap2 (Iap2) – ингибитор апоптоза	Д	Д	Д	**П**	Д	Д//МД	Д	**МД**	**МД**
2R (59E3)	Dcp-1 – эффектор каспаз	МД	МД	МД	П//МД	МД	МД	**П**	**Д//МД**	**Д**
3L (67D2)	Dronc (Nc) – инициатор каспаз	Д	**П**	МД	Д	Д	Д/МД	**МД**	Д	Д
3L (72D1)	Diapl (Thread) – ингибитор апоптоза	П	Д	Д	МД	П	**МД//П**	**Д//МД**	П	П
3L (75C1)	hid (wrinkled) – митох. белок, проапоптотический белок	Д//МД	**П**	Д	Д	Д//МД	**П**	**МД**	Д	Д
3L (75C4)	grim – проапоптотический белок	Д	**П**	МД	Д	Д	**П**	**П**	Д	Д
3L (75C6)	rpr (reaper) – проапоптотический белок	Д	**П**	МД	Д	Д	**П**	**П**	Д	Д
3R (89B18)	decay – эффектор каспаз	Д//МД	**МД//П**	МД	Д//МД	**Д**	**МД//П**	**МД//П**	Д	Д
3R (94A1)	dFadd (BG4) – индуктор апоптоза	Д	МД	Д	Д	Д	**П**	**П**	Д	Д
3R (94D10)	Dmp53 – регулятор клет. цикла, активатор проапопт. генов	МД	**МД//П**	МД	**Д//МД**	**Д//МД**	**П**	**П//МД**	**МД//Д**	**Д//МД**
3R (99C1)	Drice (Ice) – эффектор каспаз	Д	МД//П	МД	Д	Д	**МД//П**	**МД**	Д//МД	Д

Примечание: Д – диск; МД – междиск; П – пуф. Выделено и подчеркнуто значимое изменение экспрессии гена.

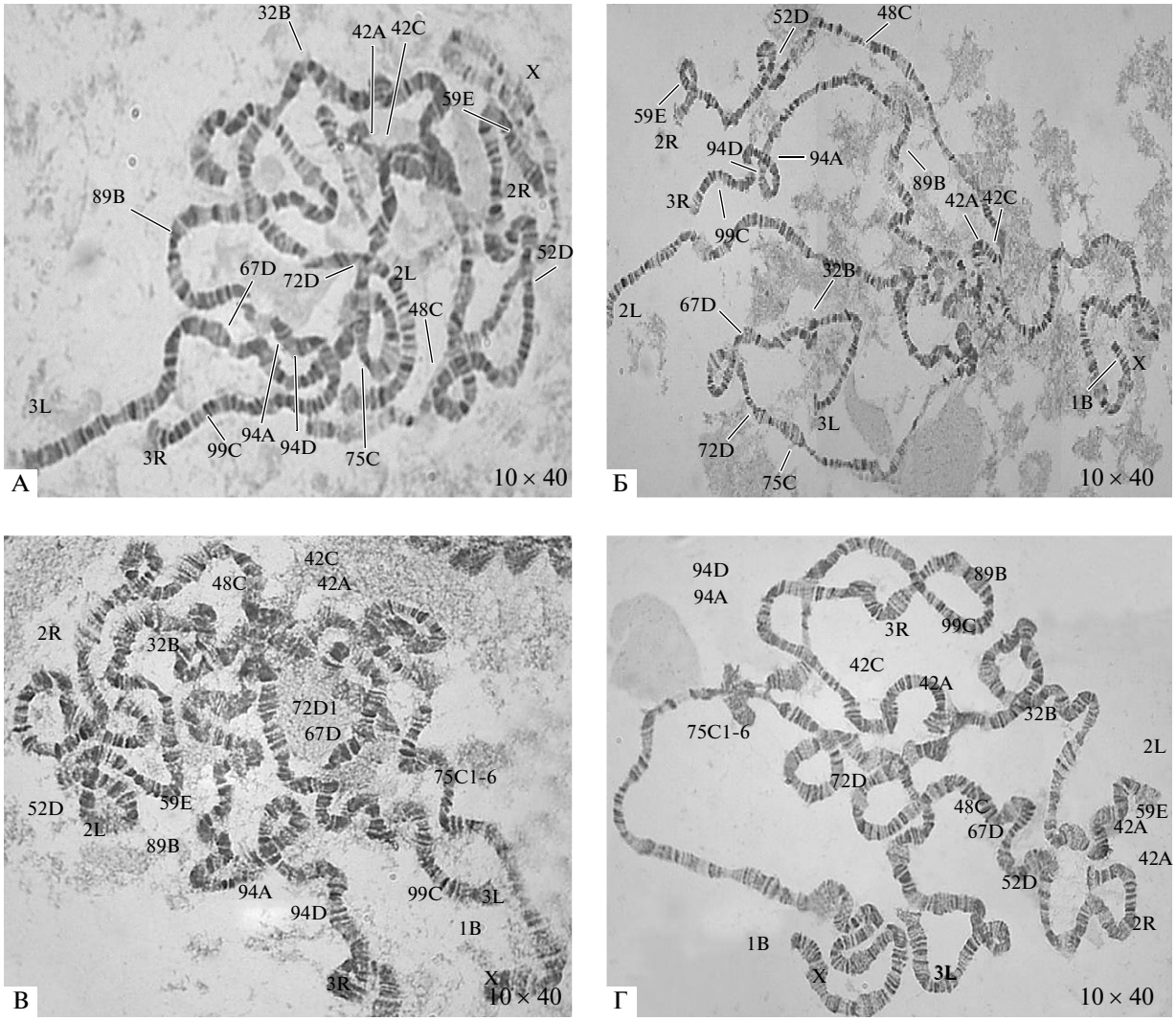


Рис. 6. Картирование районов локализации генов апоптоза в политенных хромосомах. А – интактные личинки *Oregon R*; Б – действие SNAP на личинки *Oregon R*; В – гибриды F_1 от скрещивания *Oregon R* × *HS dNOS1*; Г – гибриды F_1 от скрещивания *Oregon R* × *HS dNOS4*.

иммуногистохимией. Похоже, что экспрессия гена *hsp70* контролируется на уровне постранскрипционной регуляции. Так, в линии *Oregon R* у интактных личинок отмечается наличие мРНК (рис. 9), однако белкового продукта не обнаружено (рис. 10).

Хорошо известно, что эктопическая экспрессия, по крайней мере, одного из ключевых регуляторов апоптоза (*rpr*, *hid* или *grim*) достаточна для запуска программы апоптоза. Активность каждого гена регулируется различными регуляторными сигналами. В то время как регуляция экспрессии *rpr* и *hid* активно изучалась при действии различных стимулов, о факторах регуляции экспрессии *grim* гена почти ничего не известно (Bangs et al., 2000).

RT-PCR-анализ с использованием специфических праймеров к кДНК мРНК *grim* (рис. 11) выявил слабую экспрессию этого гена в интактной линии *Oregon R*, ассоциирующуюся с естественным началом метаморфоза. Непосредственно после индукции теплового шока уровень экспрессии *grim* в линии *Oregon R* не меняется, незначительное усиление сигнала наблюдается по прошествии 2–3 ч после стресса, которое возвращается к прежнему уровню через 5–6 ч. Однако наблюдается заметная разница в уровне экспрессии этого гена между контрольной линией и *dNOS1*-трансгенными линиями, продуцирующими большое количество NO после индукции стрессом HS-промотора трансгена. Так, непосредственно после индукции теплового шока наблюдается высокий уровень экспрессии гена *grim* в обеих использованных трансгенных линиях. В линии *HS dNOS1 Flag* по прошествии 2–3 ч *grim* экспрессируется слабее и

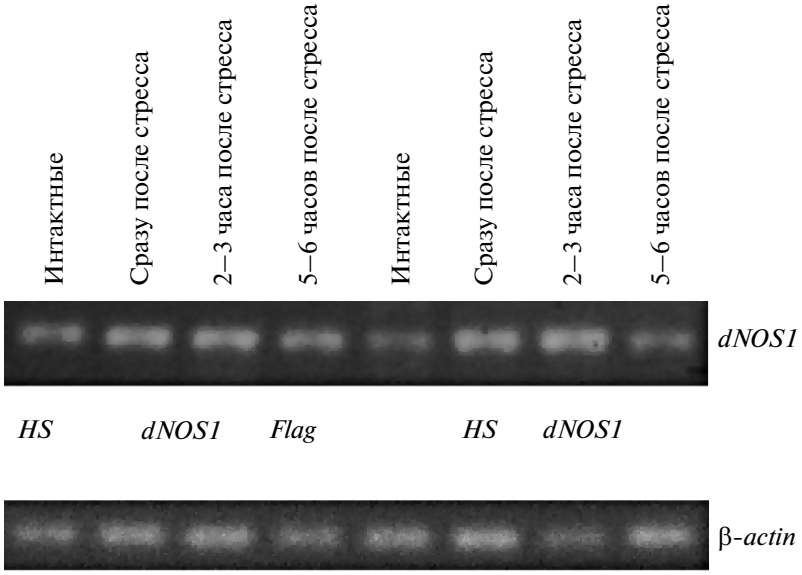


Рис. 7. Экспрессия мРНК *dNOS* у интактных и стрессированных личинок (37°С) *dNOS1*-трансгенных линий (RT-PCR).

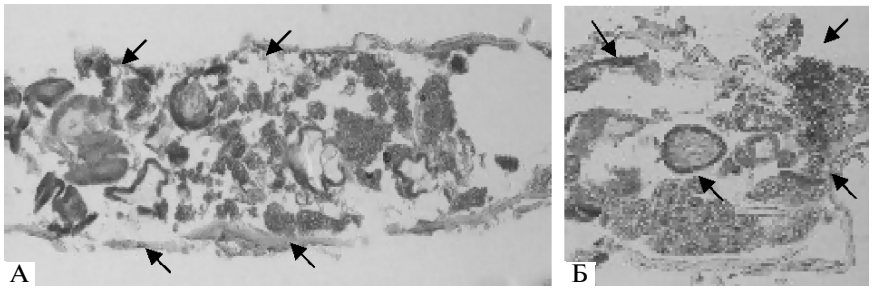


Рис. 8. Иммуногистохимическая локализация DNOS белка в дикой линии *Oregon R* (А) и в линии *HS dNOS1* (Б).

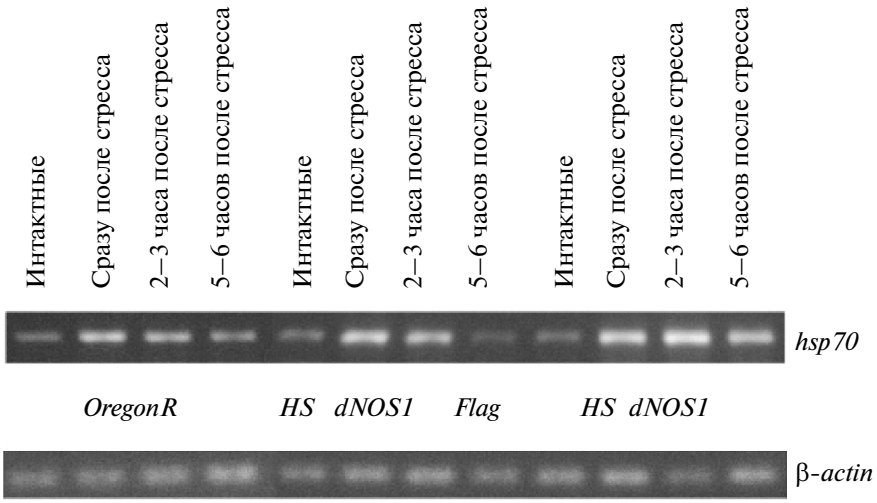


Рис. 9. Экспрессия мРНК *hsp70* у интактных и стрессированных личинок (37°С) дикой линии *Oregon R* и *dNOS1*-трансгенных линий (RT-PCR).

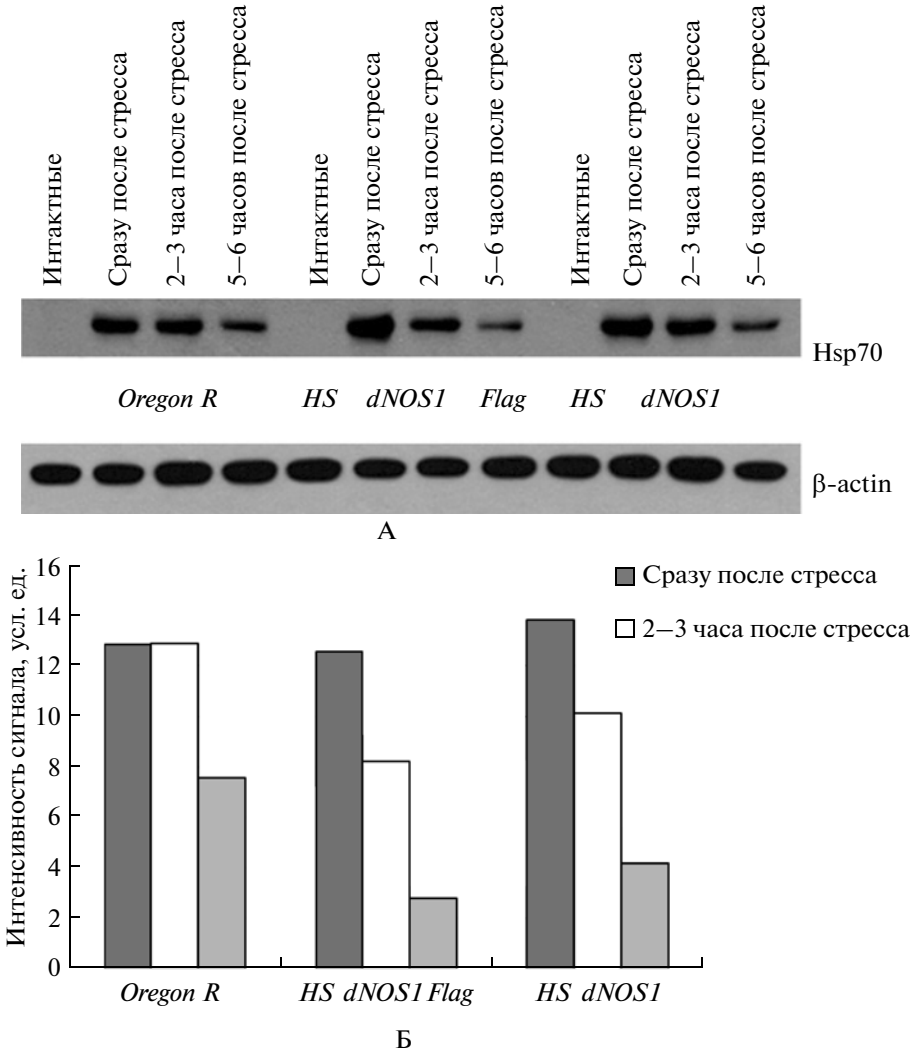


Рис. 10. Полуколичественный анализ содержания белка Hsp70 у интактных и стрессированных личинок (37°C) дикой линии *Oregon R* и *dNOS1*-трансгенных линий. *Oregon R* и *dNOS1*-трансгенных линий. А – Western-blot анализ, В – денситометрическое сканирование Western-blot имиджа.

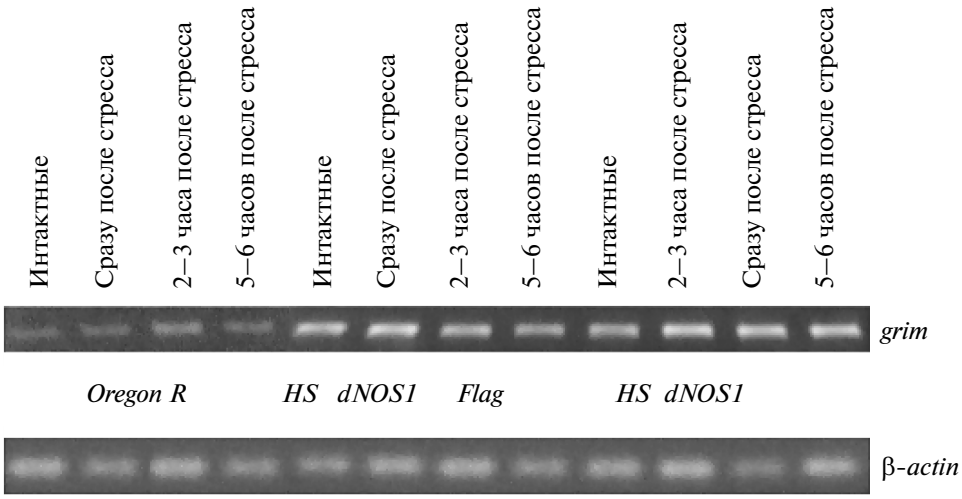


Рис. 11. Экспрессия мРНК *grim* у интактных и стрессированных личинок (37°C) дикой линии *Oregon R* и *dNOS1*-трансгенных линий (RT-PCR).

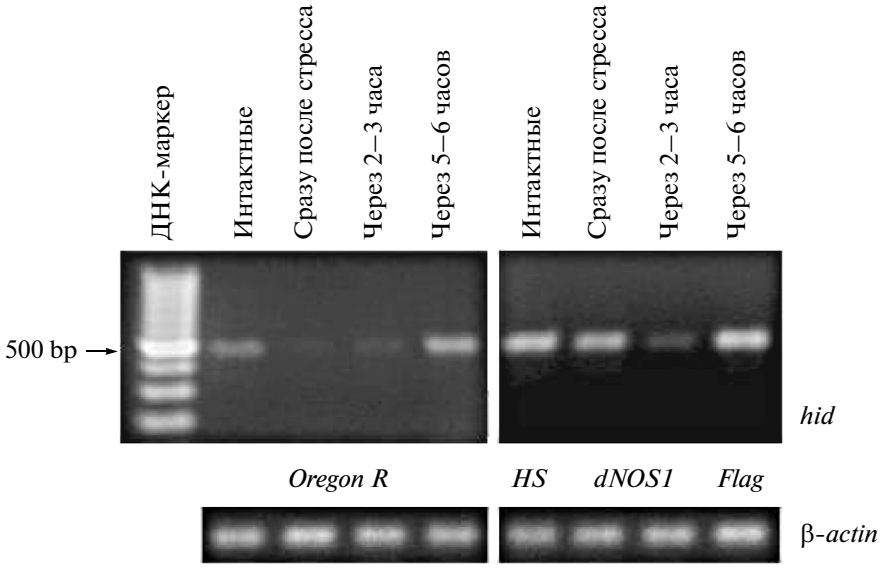


Рис. 12. Экспрессия мРНК *hid* у интактных и стрессированных личинок (37°С) дикой линии *Oregon R* и трансгенной линии *HSdNOS1Flag* (RT-PCR).

через 5–6 ч возвращается к исходному уровню экспрессии. В трансгенной линии *HS dNOS1* уровень экспрессии через 2–3 ч снижается незначительно, но остается высоким вплоть до 5–6 ч после индукции стресса.

Анализируя эффект действия *hsp70* гена с экспрессией гена *grim*, можно отметить антиапоптотическое действие белка теплового шока. После того, как уровень экспрессии *hsp70* в линии *Oregon R* снижается (2–3 ч после стресса), клетки реанимируют апоптозную машину. Если полагать, что уровень экспрессии *hsp70* в обоих трансгенных линиях был сходен, то различия в уровне экспрессии гена-регулятора апоптоза *grim* могут быть связаны с различной производительностью в отношении оксида азота. Несмотря на то, что наличие HSP70 белка резко возрастает после индукции теплового стресса, повышенное содержание NO нейтрализует апоптоз-подавляющее действие HSP70 и стимулирует *grim*-опосредованный путь апоптоза. Однако ввиду короткой жизни NO его концентрации в клетке становятся меньше, тогда как белок HSP70 еще остается на высоком уровне (2–3 ч после индукции стресса). Это является причиной снижения интенсивности апоптоза до прежнего уровня.

Антиапоптозное действие HSP70 проявляется также на снижении экспрессии гена *hid* у *Drosophila melanogaster*, этот эффект отмечен как в линии дикого типа *Oregon R*, так и в трансгенных линиях после индукции теплового шока (рис. 12). Обнаружено, что повышенный уровень оксида азота в *dNOS1*-трансгенных линиях сразу после теплового стресса поддерживает экспрессию гена *hid* на интактном уровне, однако через 2–3 ч наблюдается заметное снижение экспрессии *hid*, и к 5–6 ч после индукции стресса уровень экспрессии *hid* возвращается на прежний уровень. В то время как в линии Oregon R уровень экспрессии гена *hid* значительно снижается и остается низким вплоть до 5–6 ч.

Сравнивая характер экспрессии апоптотических индукторов *grim* и *hid* в контроле и у *dNOS1*-трансгенных линий после индукции температурного стресса, можно отметить одинаковое снижение экспрессии *grim* и *hid* после индукции теплового шока в линии *Oregon R* и сохранение уровня экспрессии регуляторов апоптоза *grim* и *hid* в трансгенных линиях с повышенным выработкой оксида азота. Интересен тот факт, что при сохранении высокого уровня содержания белка HSP70, экспрессия гена *grim* в *dNOS1*-трансгенных линиях через 2–3 ч после индукции стресса остается на очень высоком уровне, а гена *hid* – на низком. TUNEL-метод через 2–3 ч после индукции теплового шока регистрирует высокую интенсивность апоптоза в разных тканях *dNOS1*-трансгенных линий, но не в линии *Oregon R*. Совокупность этих данных позволяет сделать несколько предположений: оксид азота способен подавлять антиапоптотическое действие белка HSP70, по-видимому, не являющееся специфичным; апоптозстимулирующее действие NO имеет выраженный эффект поддержания высокого уровня экспрессии гена *grim*, но не *hid*.

Серия проведенных экспериментов дает основание считать, что повышение содержания NO, введенного как экзогенно, так и опосредованного его эндогенным синтезом, может индуцировать или ускорять процессы апоптоза, а понижение содержания NO ведет к супрессии апоптоза. Относи-

тельно роли HSP70 можно отметить, что высокое содержание в клетках оксида азота способно подавлять антиапоптотическое действие HSP70 и стимулировать апоптоз, возможно, через *grim*-опосредованный путь. Причем, как показали опыты с использованием экзогенных доноров оксида азота и *dNOS1*-трансгенных линий, длительное воздействие высокой концентрации NO в течение всего развития более эффективно сказывается на стимуляции проапоптотических генов, чем кратковременное действие этого агента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Габитова Л.Б., Набирочкин С.Д., Бегетова Т.В., Газарян К.Г. Индукция нестабильных мутаций у *Drosophila melanogaster* микроинъекцией ДНК онкогенных вирусов в полярную плазму эмбрионов. Продленная генетическая нестабильность мутаций в локусе *Lobe* // Генетика. 1991. Т. 27. № 4. С. 617–624.

Кузин Б.А., Слезингер М.С. Регуляция мультимерного строения NO-синтазы как новый фактор органогенеза // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 5. С. 285–291.

Кузин Б.А., Слезингер М.С. NO-синтаза участвует в регуляции поляризации и движения клеток в морфогенезе *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 1. С. 31–37.

Мить Н.В., Джансугурова Л.Б., Бекманов Б.О. и др. Генетическая нестабильность и апоптоз у онковирусиндуцированных мутантов *Drosophila melanogaster* // Материалы Третьего Съезда ВОГиС "Генетика в XXI век: современное состояние и перспективы развития". Москва, 2004. С. 418.

Толебаева А.Д., Амиргалиева А.С., Мить Н.В. и др. Создание модельной системы регуляции апоптоза с NO с использованием онковирусиндуцированных *Lobe*-мутантов *Drosophila melanogaster* // Фундаментальные исследования в биологии и медицине: Сборник научных трудов. Вып. 6. Ставрополь: Изд-во СевКавГТУ, 2009. С. 160–163.

Arya R., Mallik M., Lakhotia S.C. Heat shock genes–integrating cell survival and death // J. Biosci. 2007. V. 32. № 3. P. 595–610.

Bangs P., Franc N., White K. Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila* // Cell Death Differ. 2000. V. 7. № 11. P. 1027–1034.

Beere H.M. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways // J. Clin. Invest. 2005. V. 115. № 10. P. 2633–2639.

Kornbluth S., White K. Apoptosis in drosophila: neither fish nor fowl (nor man, nor worm) // J. Cell Sci. 2005. V. 118. № 9. P. 1779–1787.

Kuzin B., Roberts I., Peunova N., Enicolopov G. Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development // Cell. 1996. V. 87. P. 639–649.

Kuzin B., Regulski M., Stasiv Y. et al. Nitric oxide interacts with the retinoblastoma pathway to control eye development in *Drosophila* // Curr. Biol. 2000. V. 10. P. 459–462.

Kim P.K., Zamora R., Petrosko P., Billiar T.R. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis // Int. Immunopharmacol. 2001. V. 1. № 8. P. 1421–1441.

Nabirochkin S.D., Gabitova L.B., Soldatov A., Osokina M. Oncoviral DNAs induse transpositions of endogenous mobile elements in the genome of *Drosophila melanogaster* // Mutation Research. 1998. V. 403. № 1–2. P. 127–136.

Nagy G., Milosevic I., Fasshauer D. et al. Alternative splicing of snap regulates secretion through nonconservative substitutions in the SNARE domain // Mol. Biol. Cell. 2005. V. 29. P. 4485–4496.

Richardson H., Kumar S. Death to f lies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death // J. Immunol. Methods. 2002. V. 265. № 1–2. P. 21–38.

Song Z., Guan B., Bergman A. et al. Biochemical and genetic interactions between *Drosophila* caspases and the proapoptotic genes *rpr, hid,* and *grim* // Mol. Cel. Biol. 2000. V. 20. № 8. P. 2907–2914.

Sreedhar A. S., Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review // Pharmacol. Ther. 2004. V. 101. № 3. P. 227–257.

Stasiv Y., Kuzin B., Regulski M. et al. Regulation of multimers via truncated isoforms: a novel mechanism to control nitric-oxide signaling // Genes Dev. 2004. V. 18. № 15. P. 1812–1823.

Effect of Nitric Oxide on Expression of Apoptotic Genes and HSP70 in Drosophila

L. B. Dzhansugurova

Institute of General Genetics and Cytology, pr. Al'-Farabi 75A, Almaty, 050060 Kazakhstan

e-mail: leylad@mail.ru

Abstract—Data on involvement of nitric oxide in apoptosis are contradictory. The balance between anti- and proapoptotic activities of nitric oxide depends on many factors, including its concentration in a tissue and interactions with other regulators of apoptosis. This paper describes the results of a series of experiments on the effect of nitric oxide donors and inhibitors as well as *dNOS1* and *dNOS4* transgenes on the apoptosis on drosophila $Lobe^{RSV}$ mutant strain and wild-type strain *Oregon R*. It has been shown that a high nitric oxide content in cells is able to inhibit antiapoptotic effect of HSP70 and stimulate apoptosis, possibly, via the *grim*-mediated apoptotic pathway. Moreover, long-term action of a high nitric oxide concentration during the entire development more efficiently stimulates the proapoptotic genes as compared with short-term action of this agent.

Keywords: nitric oxide, apoptosis, heat shock, drosophila

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 6, с. 439–446

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 576:35 . 612.017

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА НА МИГРАЦИЮ НЕЙРОНОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ГОНАДОТРОПИН-РИЛИЗИНГ ГОРМОН, В ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ КРЫС[1]

© 2011 г. В. С. Шарова, М. С. Извольская, С. Н. Воронова, Л. А. Захарова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
119991 ГСП-1, Москва, ул. Вавилова, д. 26
E-mail:zakharova-l@mail.ru

Поступила в редакцию 26.06.10 г.
Окончательный вариант получен 15.02.11 г.

Исследовали влияние бактериального эндотоксина липополисахарида (ЛПС), активатора иммунной системы на выход в дифференцировку нейронов, продуцирующих гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ), и их миграцию в эмбриональном развитии крыс. Внутрибрюшинное введение ЛПС (18 мкг/кг веса) беременным самкам на 12-е сут эмбрионального развития, в период их образования, приводило к снижению общего количества ГРГ-нейронов в переднем мозгу 17-дневных плодов на 50% и 19-дневных плодов – на 17%. В то же время, в назальной области головы количество нейронов у 17- и Э19-дневных плодов увеличивалось на 40 и 50% соответственно, а в области обонятельных луковиц увеличивалось у 17-дневных плодов на 20% и практически не менялось у 19-дневных плодов. Введение ЛПС беременным самкам на 15-е сут эмбрионального развития не вызывало изменений ни общего количества нейронов, ни их распределения по областям миграции. После введения ЛПС у плодов было отмечено одиночное расположение нейронов, продуцирующих ГРГ, в переднем мозгу, в то время как в ростральных отделах они располагались группами по 3–4 нейрона. Таким образом, на ранних сроках беременности ЛПС подавляет начальные этапы дифференцировки и миграцию нейронов, продуцирующих ГРГ. Наблюдаемые эффекты могут быть опосредованы провоспалительными цитокинами, продукция которых усиливается под действием ЛПС.

Ключевые слова: нейрогенез, ГРГ-нейроны, обонятельные плакоды, передний мозг, бактериальный эндотоксин ЛПС, плоды крыс, иммуногистохимия.

Характерной особенностью нейронов, продуцирующих гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ), является их небольшая численность (800–2000), диффузное расположение в септо-преоптической области гипоталамуса и внемозговое онтогенетическое происхождение. ГРГ-нейроны млекопитающих образуются в эпителии обонятельных плакод на 12–14-е сут эмбрионального развития у крыс и затем мигрируют к переднему мозгу в составе прорастающих на данном этапе развития обонятельных, терминальных и вомероназальных нервов (Schwanzel-Fukuda et al., 1985, 1989; Wray et al., 1989). После проникновения в мозг через решетчатую пластинку решетчатой кости ГРГ-нейроны продолжают мигрировать к септо-преоптической области переднего мозга по траектории вентро-каудального ответвления вомероназального нерва (Yoshida et al., 1999).

ГРГ необходим для обеспечения репродуктивных ритмов и функций, является нейромодулятором полового поведения (Wray, 2002). Немаловажную роль ГРГ играет также в развитии и функционировании иммунной системы в пре- и постнатальный периоды онтогенеза (Morale et al., 1991; Zakharova et al., 2005; Извольская и др., 2010). ГРГ-система, в свою очередь, находится под контролем нейроэндокринной и иммунной систем. Многие нейротрансмиттеры, участвующие в регуляции функций ГРГ-системы половозрелых особей, в период развития способны влиять на миграцию ГРГ-нейронов в зависимости от их пространственного или временного расположения (Simonian, Herbison, 2001; Pronina et al., 2003; Giacobini et al., 2004). Через ГРГ-нейроны различные нейротрансмиттеры и нейропептиды: моноамины, гамма-аминомасляная кислота, нейропептид Y, опиоиды, а также цитокины передают сигналы внешних стимулов, влияющих на состояние репродуктивной системы (Ciechanowska et al., 2007; Kalra et al., 1998). В то же время, исследования влияния иммунной системы на функционирование ГРГ-системы единичны. Показано, в частности, что стимуляция иммунной системы половозрелых особей бактериальным эндотоксином липополисахаридом (ЛПС), индуцирующего синтез провос-

[1] Работа поддержана Российским Фондом фундаментальных исследований (проект № 10-04-01101-а).

палительных цитокинов, вызывает снижение секреции ГРГ в гипоталамусе и лютеинизирующего гормона в гипофизе (Watanobe, Hayakawa, 2003). Воспаление, вызванное ЛПС у матери, изменяет уровень провоспалительных цитокинов в различных органах плода (Liverman et al., 2006). Мы предполагаем, что ЛПС может оказывать воздействие не только на функционирование, но и на развитие ГРГ-системы: деление предшественников, миграцию ГРГ-нейронов, прорастание волокон в срединное возвышение. К настоящему времени существуют данные о неблагоприятном влиянии ЛПС на организм на ранних этапах жизни. Введение ЛПС новорожденным крысам вызывает в гипоталамо-гипофизо-надпочечниковой системе повышенную секрецию гормонов стресса, снижение отрицательной обратной связи, чувствительной к глюкокортикоидам, и усиление реакции ГРГ-системы на стресс (Li et al., 2007).

Цель нашей работы – исследование влияния ЛПС на выход ГРГ-нейронов в дифференцировку и их миграцию из обонятельных плакод в передний мозг в онтогенезе крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Условия эксперимента. В качестве экспериментальной модели были использованы беременные крысы Вистар (16 самок) (Питомник "Столбовая", РАН). Беременных самок содержали в стандартных лабораторных условиях с контролируемыми режимами температуры (20°С) и освещения (в течение 12 ч) и со свободным доступом к воде и пище. Для получения датированной беременности самцов подсаживали на ночь к самкам, при обнаружении сперматозоидов во влагалищных мазках этот день считали первым днем беременности. Беременным самкам (4 группы, по 4 самки в опытной и контрольной группах) внутрибрюшинно вводили ЛПС *E. coli* (10000 ед/кг или 18 мкг/кг веса в 0.5 мл 0.9%-ного раствора NaCl, pH 7.2; "Sigma", США) на 12-е или 15-е сут эмбрионального развития (Э12, Э15). Контрольной группе животных на Э12 или Э15 вводили 0.9%-ный раствор NaCl. Доза вводимого ЛПС была выбрана в соответствии с литературными данными и вызывала смертность не более 25–30% плодов (Ling et al., 2002).

Фиксация и иммуногистохимия. На 17-е и 19-е сут беременности у двух самок из каждой группы под пентобарбиталовым наркозом (100 мг/кг веса) извлекали плоды. Пол плодов не определяли. Плоды перфузировали через сердце сначала 0.02 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ, 0.02 М фосфатный буфер с 0.9%-ным NaCl, pH 7.4) в течение 1 мин, а затем 4%-ным раствором параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере в течение 5 мин. Далее животных декапитировали, головы дофиксировали в 4%-ном параформальдегиде при 4°С в течение ночи, после чего отмывали в 0.02 М ФСБ в течение 30 мин и помещали на 36 ч в 25%-ный раствор сахарозы в 0.02 М ФСБ для криопротекции. Головы замораживали в изопентане при –40°С и хранили при –80°С. Далее приготавливали сагиттальные серийные срезы толщиной 14 мкм на криостате "Leica" (Германия).

Для иммуногистохимической реакции каждый второй срез опытных и контрольных групп инкубировали во влажной камере последовательно в 0.02 М ФСБ с: 1) 0.1%-ной перекисью водорода и 0.3%-ным тритоном X-100 ("Sigma", США), 20 мин при комнатной температуре; 2) первичными кроличьими антителами против синтетического ГРГ (1 : 5000), при 4°С с 1%-ной нормальной сывороткой козы и 0.3%-ным тритоном X-100, 48 ч; 3) вторичными козьими биотинилированными антителами против иммуноглобулинов кролика (1 : 200) ("Vector Laboratories", BIOSYS, США), 2 ч при комнатной температуре; 4) авидин-биотин-пероксидазным комплексом ("Vector Laboratories", BIOSYS, США), 1 ч при комнатной температуре. Срезы промывали в ФСБ после каждой инкубации. Специфичность первых антител проверяли ранее (Beauvillain, Tramu, 1980). На последнем этапе срезы промывали 0.05 М трис-буфером (pH 7.6), пероксидазную реакцию выявляли в том же буфере, содержащем 0.03% 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорида ("Sigma", США) и 0.01% перекиси водорода. Затем срезы обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в пермаунт.

Анализ результатов. Серии срезов (каждая из пяти анализированных серий содержала срезы голов плодов контрольной и опытной группы) просматривали и на каждом срезе подсчитывали все ГРГ- иммунореактивные (ГРГ-ир) нейроны. Данные пяти анализируемых серий объединяли, учитывая анатомические макроориентиры. Для этого были выделены следующие зоны вдоль пути миграции ГРГ-ир нейронов: 1) назальная область головы от ростральной части вомероназального органа до рострального окончания обонятельных луковиц; 2) область обонятельных луковиц, в которой располагался также хрящевой зачаток решетчатой пластинки решетчатой кости; 3) область переднего мозга от каудальной части обонятельных луковиц до переднего гипоталамуса (рис. 1). Поправки двойного подсчета нейронов не вводили, так как основной задачей нашей работы являлось сравнение полученного количества нейронов у животных различных групп, а не точное определение общего количества ГРГ-ир нейронов.

Статистическая обработка. Для данных по количеству нейронов подсчитывали стандартную ошибку среднего значения. Для определения достоверности различий между опытом и контролем использовали непараметрический двусторонний критерий Манна-Уитни (*U*-тест).

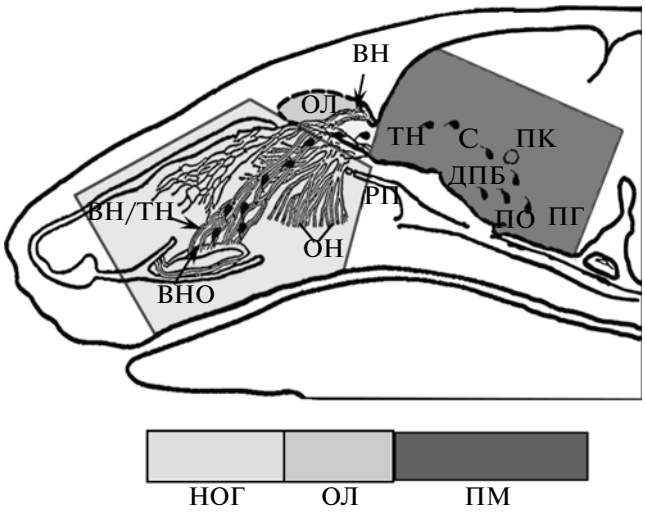


Рис. 1. Участки миграции ГРГ-нейронов у крыс, соотнесенные с макрогистологическими ориентирами.

ВН – вомероназальный нерв, ВНО – вомероназальный орган, ДПБ – диагональный пучок Брока, НОГ – назальная область головы, ОН – обонятельный нерв, ОЛ – обонятельные луковицы, ПГ – передний гипоталамус, ПК – передняя комиссура, ПМ – передний мозг, ПО – преоптическая область, РП – решетчатая пластинка решетчатой кости, С – септум, ТН – терминальный нерв.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение ГРГ-ир нейронов на Э17. У плодов контрольной группы животных на Э17 большая часть ГРГ-ир нейронов была веретеновидной формы и располагалась в переднем мозгу: в септуме, диагональном пучке Брока и преоптической области. Небольшое количество ГРГ-ир нейронов обнаруживали в назальной области головы, между вомероназальным органом и обонятельными луковицами, а также в области самих обонятельных луковиц (рис. 3).

После введения ЛПС беременным самкам на Э12 общее количество ГРГ-ир нейронов у плодов достоверно снижалось (рис. 2). В то же время, количество ГРГ-ир нейронов в назальной области головы и области обонятельных луковиц увеличивалось на 40 и 20% соответственно, а в области переднего мозга их количество достоверно снижалось (рис. 3). У животных опытной группы было отмечено одиночное расположение ГРГ-ир нейронов в переднем мозгу, в то время как в ростральных отделах они располагались группами по 3–4 нейрона (рис. 4).

Распределение ГРГ-ир нейронов на Э19. Общее количество ГРГ-ир нейронов у плодов контрольной группы на Э19 возрастало по сравнению с Э17 (рис. 2). Нейроны были веретеновидной формы, с крупным неокрашенным ядром, расположенным в центре тела нейрона подобно Э17. Наибольшее количество ГРГ-ир нейронов было обнаружено в переднем мозгу. На Э19 ГРГ-ир нейроны выявлены также в области переднего гипоталамуса, их волокна прорастали до срединного возвышения.

После введения ЛПС беременным самкам на Э12 общее количество ГРГ-ир нейронов у плодов на Э19 достоверно не изменялось (рис. 2). Наблюдалось увеличение их количества в назальной области головы на 50% по сравнению с контролем (рис. 5, 6). В области переднего мозга количество ГРГ-ир нейронов достоверно снижалось.

Распределение ГРГ-ир нейронов после введения ЛПС на Э15. После введения ЛПС беременным

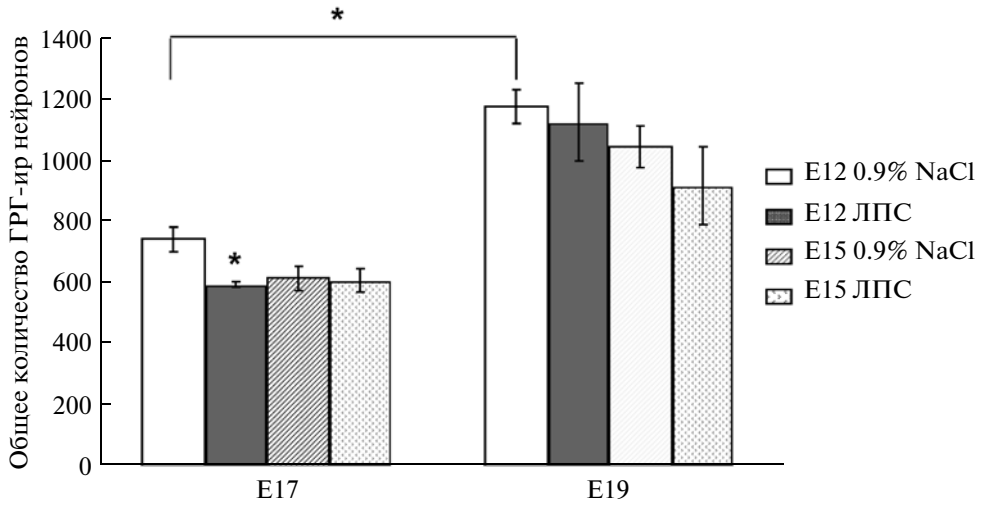


Рис. 2. Общее количество ГРГ-иммунореактивных нейронов у плодов крыс на 17-е (Э17) и 19-е (Э19) сут эмбрионального развития после введения ЛПС или 0.9% раствора NaCl на Э12 и Э15. По оси абсцисс – возраст плодов, по оси ординат – общее количество нейронов. Число плодов в каждой группе на Э12 $n = 6$, на Э15 $n = 3$; общее число плодов 36. Достоверность различия между опытной и контрольной группами: M ± SEM; * $p < 0.05$.

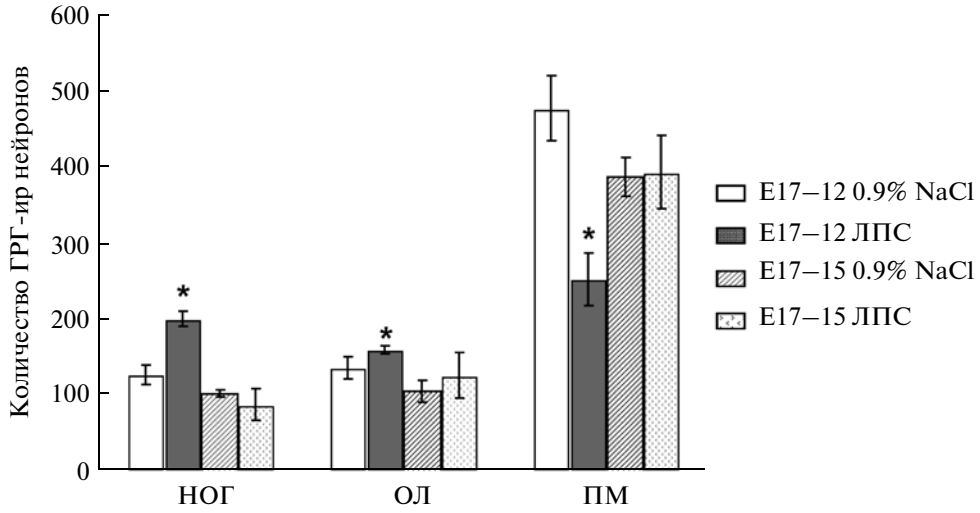


Рис. 3. Содержание ГРГ-иммунореактивных нейронов в различных зонах миграции у плодов крыс на 17-е (Э17) сут эмбрионального развития после введения ЛПС или 0.9% раствора NaCl на Э12 и Э15. По оси абсцисс – области миграции: НОГ – назальная область головы, ОЛ – обонятельные луковицы, ПМ – передний мозг; по оси ординат – количество нейронов. Число плодов в каждой группе на Э12 $n = 6$, на Э15 $n = 3$; общее число плодов 36.

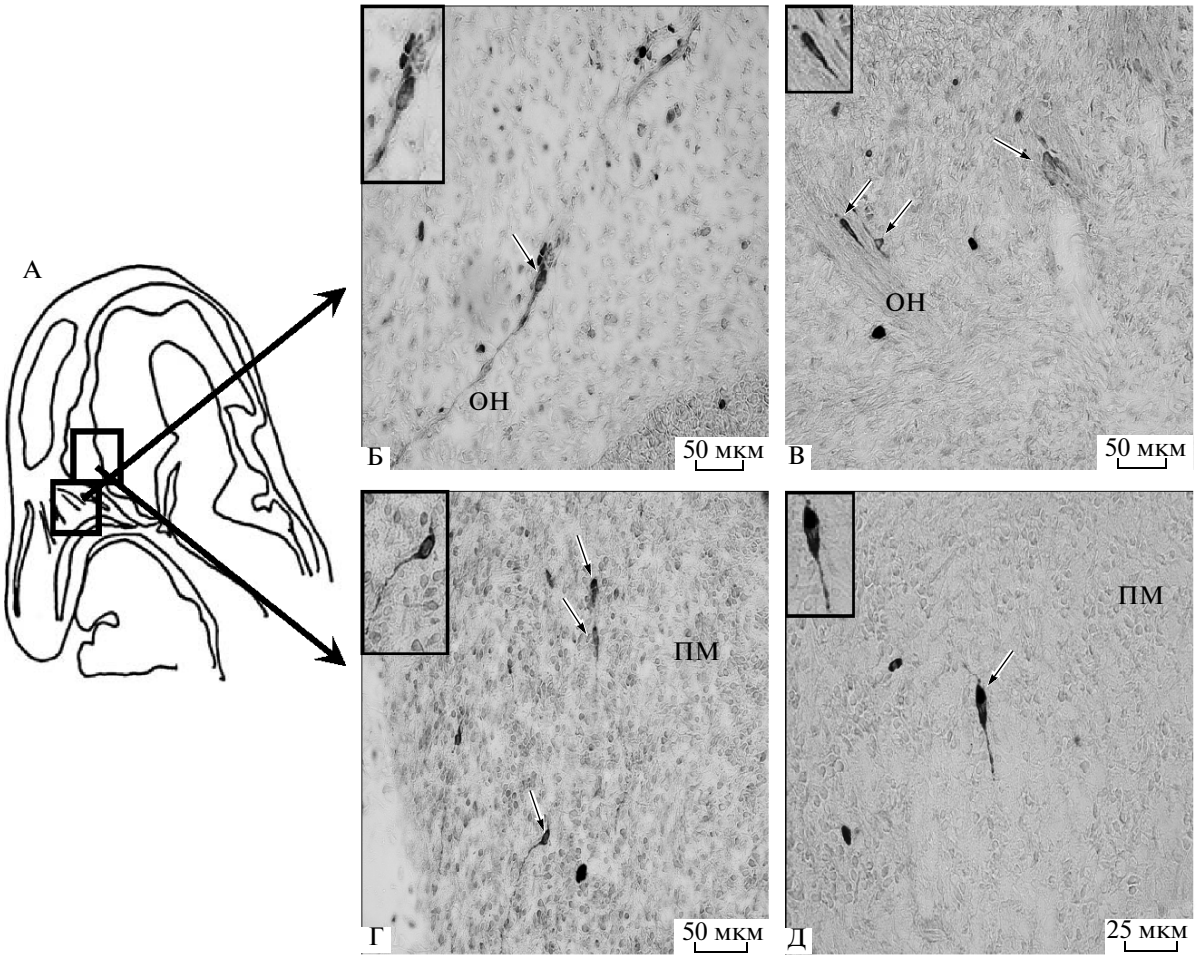


Рис. 4. ГРГ-иммунореактивные нейроны в назальной области головы и в переднем мозгу у плодов крыс на Э17 после введения ЛПС на Э12 в контрольной (Б, Г) и опытной группах (В, Д). А – Схематическое изображение сагиттального среза головы плода крысы на Э17. Сокращения: ОН – обонятельный нерв, ПМ – передний мозг.

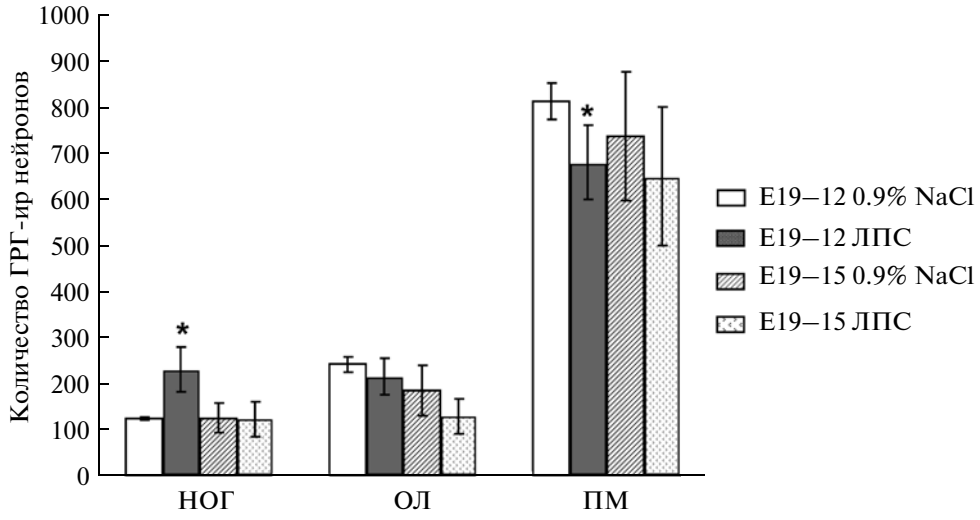


Рис. 5. Содержание ГРГ-иммунореактивных нейронов в различных зонах миграции у плодов крыс на 19-е (Э19) сут эмбрионального развития после введения ЛПС или 0.9% NaCl на Э12 и Э15. По оси абсцисс – области миграции: НОГ – назальная область головы, ОЛ – обонятельные луковицы, ПМ – передний мозг; по оси ординат – количество нейронов. Число плодов в каждой группе на Э12 $n = 6$, на Э15 $n = 3$; общее число плодов 36.

самкам на Э15 у плодов достоверных различий как по общему количеству ГРГ-ир нейронов, так и по их количеству в исследуемых областях миграции на Э17 и Э19 не наблюдалось по сравнению с контрольной группой животных (рис. 2, 3, 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальный эндотоксин ЛПС является основным компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Его часто применяют в лабораторных исследованиях для активации иммунной системы животных без заражения организма потенциально опасными бактериальными инфекциями (Bennett, Beeson, 1950). Внутрибрюшинное введение ЛПС беременным самкам вызывает нарушения развития плодов вплоть до полной остановки их развития и преждевременных родов (Fidel et al., 1994; Kaga et al., 1996). Большинство авторов придерживается мнения, что эти нарушения у плода связаны с развитием иммунного ответа на бактериальную инфекцию у матери (Cai et al., 2000; Kohmura et al., 2000; Grigsby et al., 2003; Simamura et al., 2010). Вопрос о возможности проникновения ЛПС через плаценту матери к плоду остается открытым, поскольку имеющиеся к настоящему времени данные противоречивы (Cai et al., 2000; Ashdown et al., 2006). Структура ЛПС не позволяет ему проникать через плаценту, нет также и экспериментальных данных, подтверждающих его трансмембранный транспорт (Zaga et al., 2004).

Влияние ЛПС на развитие плода может осуществляться, по-видимому, за счет изменений метаболизма различных сигнальных молекул. Показано, что введение ЛПС беременной самке вызывает у нее повышение уровня провоспалительных цитокинов в крови, которые, наряду с ЛПС, также стимулируют секрецию провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли (ФНОα), интерлейкина 1 (ИЛ-1β) и лейкемия ингибирующего фактора (ЛИФ) плодной частью плаценты (Thiex et al., 2009; Simamura et al., 2010). Введение ЛПС беременным мышам приводит к повышенной экспрессии ФНОα, ИЛ-1β и белка хемотаксиса моноцитов (MCP-1) у плодов (Liverman et al., 2006). В мозгу плодов крысы экспрессия ФНОα наблюдается уже через 1 ч после введения, и в течение 24 ч его уровень не изменяется, тогда как уровень ИЛ-1β снижается (Cai et al., 2000).

В наших исследованиях доза ЛПС была выбрана как минимальная толерантная доза, вызывающая повышение температуры тела (Miller et al., 1997) и 25–30%-ную гибель плодов (Ling et al., 2002). Согласно полученным нами данным, разовое введение ЛПС беременным самкам на Э12 приводит к снижению общего количества ГРГ-ир нейронов у плодов на Э17, а к Э19 их количество возрастает до уровня контрольной группы животных (рис. 2). Выявленный эффект на Э17 можно объяснить либо общим снижением синтеза ГРГ в нейронах, либо их более поздним выходом в дифференцировку. ГРГ-нейроны у крыс начинают синтезировать ГРГ с Э15, то есть через 1–2 сут после их образования (Schwanzel-Fukuda et al., 1985). Как было показано ранее, повышенное содержание цитокинов в крови беременной самки и тканях плода наблюдается только в течение 24 ч после введения ЛПС, позже они возвращаются к прежнему уровню (Cai et al., 2000; Liverman et al., 2006). Таким образом, наблюдаемый нами сниженный уровень

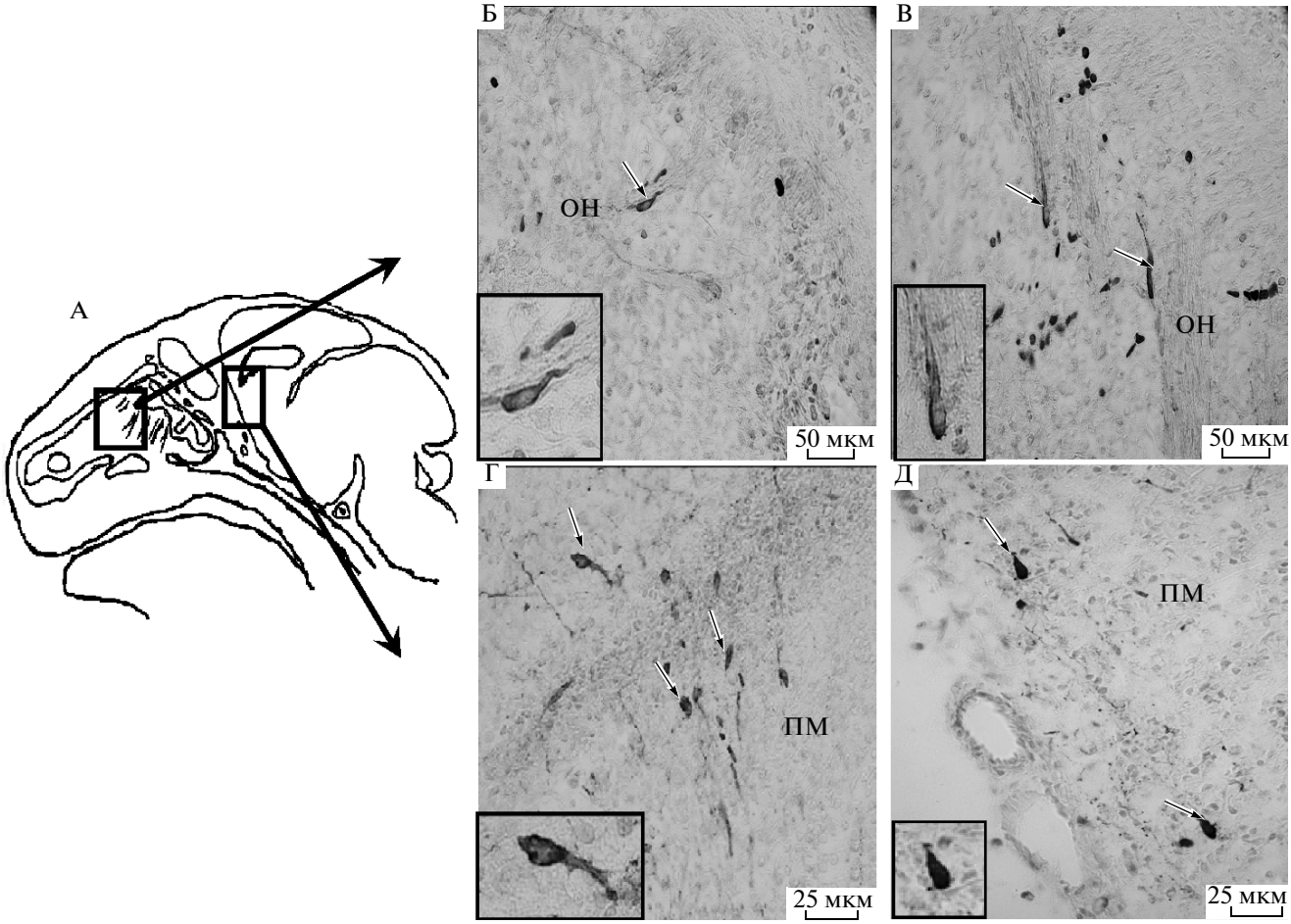


Рис. 6. ГРГ-иммунореактивные нейроны в назальной области головы и в переднем мозгу у плодов крыс на Э19 после введения ЛПС на Э12 в контрольной (Б, Г) и опытной группах (В, Д). А – Схематическое изображение сагиттального среза головы плода крысы на Э19. Сокращения: ОН – обонятельный нерв, ПМ – передний мозг.

ГРГ-нейронов через 5 сут после введения ЛПС матери не связан, по-видимому, с прямым действием провоспалительных цитокинов на синтез ГРГ в нейронах. Однако нельзя исключить опосредованное влияние ЛПС и индуцированных им цитокинов. Показано, что у половозрелых животных ИЛ-1α и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор блокируют выделение ГРГ из аксонов ГРГ-нейронов в результате подавления активности NO-синтазы (Rettori et al., 1994). Подавление секреции ГРГ после введения ЛПС может быть опосредовано также опиоидами (He et al., 2003).

На основании полученных данных мы предполагаем, что ЛПС подавляет выход предшественников ГРГ-нейронов в дифференцировку. После введения ЛПС беременным самкам на Э15 снижения общего количества ГРГ-ир нейронов не наблюдается как на Э17, так и Э19 (рис. 2). Эти данные подтверждают наше предположение о том, что введение ЛПС на Э12, в период массового выхода ГРГ-нейронов в дифференцировку, препятствует их образованию.

Следует отметить, что к рождению общее количество ГРГ-нейронов восстанавливается, что не исключает, однако, возникновения нарушений в функционировании ГРГ-системы в отдаленные периоды жизни. Так, пренатальное инфицирование плода ЛПС приводит к снижению количества моноаминэргических нейронов и повышению содержания ФНОα в черной субстанции у потомков иммунизированных крыс в постнатальном периоде (Zhu et al., 2007; Wang et al., 2009).

Наряду с провоспалительными цитокинами, ЛПС индуцирует синтез и других сигнальных молекул (Cai et al., 2000; Gilmore et al., 2003; Liverman et al., 2006). Снижение количества ГРГ-ир нейронов в пренатальный период может быть связано также с нарушениями синтеза у плодов факторов дифференцировки ГРГ-нейронов, в частности, фактора стромального происхождения (SDF-1), нейротропного фактора мозга (Gilmore et al., 2003;

Cronin et al., 2004; Toba et al., 2008) и ряда других факторов (Извольская и др., 2010).

Стимуляция иммунной системы беременных самок ЛПС на Э12 вызывает также замедление миграции ГРГ-нейронов у плодов, что выражается в расположении большего количества ГРГ-ир нейронов в ростральных областях, по сравнению с контролем (рис. 3). Однако введение ЛПС на Э15 не приводит к перераспределению ГРГ-ир нейронов вдоль траектории их миграции на Э17 и Э19. Эти данные говорят о том, что замедление выхода в дифференцировку ГРГ-нейронов приводит к смещению времени начала их миграции на более поздние сроки и замедлению темпов интрамезенхимной (интраназальной) миграции ГРГ-нейронов. В то же время, на более поздних сроках: в момент пересечения ГРГ-нейронами решетчатой пластинки решетчатой кости и миграции в переднем мозгу, вызванное ЛПС воспаление не оказывает влияния на скорость их миграции. Как было показано ранее, именно во время интрамезенхимной миграции ГРГ-нейроны экспрессируют рецепторы к цитокинам, и прежде всего, к ИЛ-6 и ЛИФ (Giacobini et al., 2007; Dozio et al., 2009). Внутримозговая миграция ГРГ-нейронов регулируется, по-видимому, другими механизмами.

Таким образом, введение ЛПС на Э12, имитирующее заражение матери во время беременности различного рода инфекциями, приводит к замедлению выхода в дифференцировку и замедлению темпов интрамезенхимной миграции ГРГ-нейронов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Извольская М.С., Шарова В.С., Захарова Л.А. Механизмы регуляции гипоталамо-гипофизарной и иммунной систем: роль гонадотропин-рилизинг гормона и иммуномедиаторов // Известия РАН. Серия Биологическая. 2010. № 4. С. 451–461.

Ashdown H., Dumont Y., Ng M. et al. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia // Mol. Psychiatry. 2006. V. 11. № 1. P. 47–55.

Beauvillain J.C., Tramu G. Immunocytochemical demonstration of LHRH, somatostatin, and ACTH-like peptide in osmium-postfixed, resin-embedded median eminence // J. Histochem. Cytochem. 1980. V. 28. № 9. P. 1014–1017.

Bennett I.L. Jr., Beeson P.B. The properties and biologic effects of bacterial pyrogens // Medicine. 1950. V. 29. P. 365–400.

Cai Z., Pan Z.L., Pang Y. et al. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration // Pediatr. Res. 2000. V. 47. № 1. P. 64–72.

Ciechanowska M., Lapot M., Malewski T. et al. Effect of stress on the expression of GnRH and GnRH receptor (GnRH-R) genes in the preoptic area-hypothalamus and GnRH-R gene in the stalk/median eminence and anterior pituitary gland in ewes during follicular phase of the estrous cycle // Acta Neurobiol. Exp. (Wars.). 2007. V. 67. P. 1–12.

Cronin A.S., Horan T.L., Spergel D.J. et al. Neurotrophic effects of BDNF on embryonic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons // Eur. J. Neurosci. 2004. V. 20. № 2. P. 338–344.

Dozio E., Ruscica M., Galliera E. et al. Leptin, ciliary neurotrophic factor, leukemia inhibitory factor and interleukin-6: class-I cytokines involved in the neuroendocrine regulation of the reproductive function // Curr. Protein Pept. Sci. 2009. V. 10. № 6. P. 577–584.

Fidel P.L., Jr., Romero R., Wolf N. et al. Systemic and local cytokine profiles in endotoxininduced preterm parturition in mice // Am. J. Obstet. Gynecol. 1994. V. 170. № 5. P. 1467–1475.

Giacobini P., Kopin A.S., Beart P.M. et al. Cholecystokinin modulates migration of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 20. P. 4737–4748.

Giacobini P., Messina A., Wray S. et al. Hepatocyte growth factor acts as a motogen and guidance signal for gonadotropin hormone-releasing hormone-1 neuronal migration // J. Neurosci. 2007. V. 27. № 2. P. 431–445.

Gilmore J.H., Jarskog L.F., Vadlamudi S. Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat // J. Neuroimmunol. 2003. V. 138. № 1–2. P. 49–55.

Grigsby P.L., Hirst J.J., Scheerlinck J.P. et al. Fetal responses to maternal and intra-amniotic lipopolysaccharide administration in sheep // Biol. Reprod. 2003. V. 68. № 5. P. 1695–1702.

He D., Sato I., Kimura F. et al. Lipopolysaccharide inhibits luteinizing hormone release through interaction with opioid and excitatory amino acid inputs to gonadotropin-releasing hormone neurones in female rats: possible evidence for a common mechanism involved in infection and immobilization stress // Neuroendocrinol. 2003. V. 15. № 6. P. 559–563.

Kaga N., Katsuki Y., Obata M. et al. Repeated administration of low-dose lipopolysaccharide induces preterm delivery in mice: a model for human preterm parturition and for assessment of the therapeutic ability of drugs against preterm delivery // Am. J. Obstet. Gynecol. 1996. V. 174. № 2. P. 754–759.

Kalra P.S., Edwards T.G., Xu B. et al. The anti-gonadotropic effects of cytokines: the role of neuropeptides // Domest. Anim. Endocrinol. 1998. V. 15. P. 321–332.

Kohmura Y., Kirikae T., Kirikae F. et al. Lipopolysaccharide (LPS)-induced intra-uterine fetal death (IUFD) in mice is principally due to maternal cause but not fetal sensitivity to LPS // Microbiol. Immunol. 2000. V. 44. № 11. P. 897–904.

Li X.F., Kinsey-Jones J.S., Knox A.M. et al. Neonatal lipopolysaccharide exposure exacerbates stress-induced suppression of luteinizing hormone pulse frequency in adulthood // Endocrinology. 2007. V. 148. № 12. P. 5984–5990.

Ling Z., Gayle D.A., Ma S.Y. et al. In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain // Mov. Disord. 2002. V. 17. № 1. P. 116–124.

Liverman C.S., Kaftan H.A., Cui L. et al. Altered expression of pro-inflammatory and developmental genes in the fetal

brain in a mouse model of maternal infection // Neurosci. Lett. 2006. V. 399. № 3. P. 220–225.

Miller A.J., Luheshi G.N., Rothwell N.J. et al. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response // Am. J. Physiol. 1997. V. 272. P. 857–861.

Morale M.C., Batticane N., Bartoloni G. Blocade of central and peripheral luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors in neonatal rats with a potent LHRH-antagonist inhibits the morphofunctional development of the thymus and maturation of the cell-mediated and humoral immune responses // Endocrinology. 1991. V. 128. P. 1073–1085.

Pronina T., Ugrumov M., Adamskaya E. et al. Influence of serotonin on the development and migration of gonadotropin-releasing hormone neurones in rat fetuses // J. Neuroendocrinol. 2003. V. 15. № 6. P. 549–558.

Rettori V., Belova N., Kamat A. et al. Blockade by interleukin-1-alpha of nitricoxidergic control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro // Neuroimmunomodulation. 1994. V. 1. № 1. P. 86–91.

Schwanzel-Fukuda M., Morrell G., Pfaff D.W. Ontogenesis of neurons producing luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the nervus terminalis of the rat // J. comparative neurology. 1985. V. 238. № 3. P. 348–364.

Schwanzel-Fukuda M., Pfaff D.W. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons // Nature. 1989. V. 338. P. 161–164.

Simamura E., Shimada H., Higashi N. et al. Maternal leukemia inhibitory factor (LIF) promotes fetal neurogenesis via a LIF-ACTH-LIF signaling relay pathway // Endocrinology. 2010. V. 151. № 4. P. 1853–1862.

Simonian S.X., Herbison A.E. Differing, spatially restricted roles of ionotropic glutamate receptors in regulating the migration of GnRH neurons during embryogenesis // J. Neurosci. 2001. V. 21. № 3. P. 934–943.

Thiex N.W., Chames M.C., Loch-Caruso R.K. Tissue-specific cytokine release from human extra-placental membranes stimulated by lipopolysaccharide in a two-compartment tissue culture system // Reprod. Biol. Endocrinol. 2009. V. 7. P. 117.

Toba Y., Tiong J.D., Ma Q. et al. CXCR4/SDF-1 system modulates development of GnRH-1 neurons and the olfactory system // Dev. Neurobiol. 2008. V. 68. № 4. P. 487–503.

Wang S., Yan J.Y., Lo Y.K. et al. Dopaminergic and serotoninergic deficiencies in young adult rats prenatally exposed to the bacterial lipopolysaccharide // Brain Res. 2009. V. 1265. P. 196–204.

Watanobe H., Hayakawa Y. Hypothalamic Interleukin-1 and tumor necrosis factor, but not Interleukin-6, mediate the endotoxin-induced suppression of the reproductive axis in rats // Endocrinology. 2003. V. 144. № 11. P. 4868–4875.

Wray S. Development of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons // Front. Neuroendocrinol. 2002. V. 23. P. 292–316.

Wray S., Grant P., Gainer H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 20. P. 8132–8136.

Yoshida K., Rutishauser U., Crandall J.E. et al. Polysialic acid facilitates migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons on vomeronasal axons // J. Neurosci. 1999. V. 19. P. 794–801.

Zaga V., Estrada-Gutierrez G., Beltran-Montoya J. et al. Secretions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or choriodecidua with lipopolysaccharides or group B streptococci // Biol. Reprod. 2004. V. 71. № 4. P. 1296–1302.

Zakharova L., Ermilova I.Y., Melnikova V. et al. Hypothalamic control of the cell-mediated immunity and of the Luteinizing Hormone-Releasing Hormone level in thymus and peripheral blood of rat fetuses // Neuroimmunomodulation. 2005. V. 12. № 2. P. 85–91.

Zhu Y., Carvey P.M., Ling Z. Altered glutathione homeostasis in animals prenatally exposed to lipopolysaccharide // Neurochem. Int. 2007. V. 50. № 4. P. 671–680.

Effect of Bacterial Endotoxin on Migration of Gonadotropin-Releasing, Hormone Producing Neurons in Rat Embryogenesis

V. S. Sharova, M. S. Izvol'skaya, S. N. Voronova, and L. A. Zakharova

Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia
e-mail: zakharova-l@mail.ru

Abstract—The effect of bacterial lipopolysaccharide endotoxin (LPS), immune system activator, on differentiation and migration of gonadotropin-releasing, hormone producing neurons in rat embryogenesis has been studied. Intraperitoneal introduction of LPS (18 μg/kg) to pregnant rats on the 12th day of pregnancy led to 50% decrease in total number of GRH-neurons in the forebrain of 17-day-old embryos and 17% decrease in 19-day-old embryos. At the same time, the number of GRH-neurons in the nasal area of the head of 17- and 19-day-old embryos increased by 40 and 50%, respectively, whereas it increased by 20% in olfactory bulbs of 17-day-old embryos and did not changed in olfactory bulbs of 19-day-old embryos. Neither the total number of neurons nor their distribution patterns were affected by the introduction of LPS into pregnant rats on the 15th day of pregnancy. Singular localization of GRH-neurons in embryo forebrain was observed after LPS administration, whereas the neurons were located by groups of 3–4 cells in rostral areas. Therefore, at the early stages of pregnancy, LPS was shown to suppress initial stages of differentiation and migration of GRH producing neurons. The effects observed in our study may be mediated by LPS-induced, proinflammatory cytokines.

Keywords: neurogenesis, GRH-neurons, olfactory placodes, forebrain, LPS bacterial endotoxin, rat embryos, immunohistochemistry

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 6, с. 447–452

МЕДИЦИНСКАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ

УДК 576.3

ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА В СПЕРМАТОЗОИДАХ ЧЕЛОВЕКА КОРРЕЛИРУЕТ СО СНИЖЕНИЕМ ЧАСТОТЫ ФОРМИРОВАНИЯ БЛАСТОЦИСТ И ЧАСТОТЫ ИМПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ ПРИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОМ ОПЛОДОТВОРЕНИИ

© 2011 г. А. С. Цибизов, А. Г. Абдулмеджидова, К. В. Краснопольская*, З. С. Гаджиева, А. А. Кущ

ФГУ "НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского" Минздравсоцразвития РФ
123098 Москва, ул. Гамалеи, д. 16
**Отделение репродукции ГУЗ МОНИИАГ*
125101 Москва, 2-ой Боткинский проезд, д. 5, корп. 5
E-mail: anisat2011@gmail.com

Поступила в редакцию 14.02.11 г.
Окончательный вариант получен 11.04.11 г.

Проведен сравнительный анализ развивающихся эмбрионов человека при лечении бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в двух группах пациентов: в группе I ($n = 28$) у мужского партнера во фракции подвижных сперматозоидов был обнаружен вирус простого герпеса (ВПГ), в группе II ($n = 103$) – ВПГ в сперматозоидах не был обнаружен. Оценивали количество оплодотворенных яйцеклеток, дробящихся эмбрионов и бластоцист, а также показатели частоты имплантации эмбрионов и частоты наступления беременности в циклах ЭКО. Установлено, что присутствие ВПГ в сперматозоидах не влияло на эффективность оплодотворения и дробления зигот. В то же время при инфицировании вирусом мужских гамет частота формирования бластоцист была снижена в 2 раза ($p = 0.015$), частота имплантации эмбрионов и частота наступления беременности – в среднем, в 5 раз ($p = 0.01$ и $p = 0.016$ соответственно). На основании полученных данных сделан вывод о негативном влиянии ВПГ-инфекции мужских гамет на ранние стадии развития эмбрионов и наступление беременности при использовании методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Ключевые слова: сперматозоиды человека, эмбрионы человека, вирус простого герпеса, экстракорпоральное оплодотворение, имплантация, наступление беременности.

Одна из первых работ, свидетельствующих о присутствии вируса простого герпеса (ВПГ) в клетках мужской репродуктивной системы, была опубликована более 30 лет назад (Deture et al., 1976). В экспериментах *in vitro* было установлено, что ВПГ способен инфицировать и реплицироваться в тестикулярных клетках (Csata, Kulcsar, 1991). Присутствие вируса в различных фракциях эякулята мужчин, в том числе и в сперматозоидах, позже было подтверждено культуральным методом, иммуноцитохимически, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и методами гибридизации *in situ* и ПЦР *in situ* (Moore et al., 1989; Kotronias, Kapranos, 1998; Wald et al., 1999; Dejucq, Jegou, 2001; Брагина и др., 2000; Бочарова и др., 2003; Bezold et al., 2007; Климова и др., 2010). Получены данные о повышенной частоте определения ВПГ в мужских половых клетках при спонтанных абортах у жен и в случаях невынашивания беременности (Бочарова и др., 2006). Важно отметить, что во всех изученных случаях у обследованных лиц не было отмечено клинических симптомов герпесвирусной инфекции. Таким образом, опубликованные данные указывают на связь между бессимптомной ВПГ-инфекцией и нарушением функции репродуктивной системы. Однако многие вопросы в этой области остаются невыясненными. Так, не доказана внутригаметная локализация полноценных вирусных частиц в зрелых мужских половых клетках, не установлена способность инфицированных ВПГ сперматозоидов участвовать в оплодотворении ооцитов и в передаче вируса эмбрионам через ВПГ-содержащие сперматозоиды. Недостаточно изучены механизмы противовирусной защиты в ооцитах человека, которые могли бы эффективно сдерживать развитие герпесвирусной инфекции. Это означает, что процессы, приводящие к снижению фертильности у человека при ВПГ инфекции, остаются не раскрытым. Цель настоящего исследования заключалась в оценке вли-

яния бессимптомной ВПГ-инфекции у мужчин на оплодотворение и ранние стадии эмбриогенеза человека при экстракорпоральном оплодотворении.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Пациенты. Обследовали 131 супружескую пару, обратившихся в лечебно-диагностический центр "Евро-Клиник" (г. Москва) и в отделение репродукции ГУЗ МОНИИАГ (г. Москва) в течение 2008 и 2009 гг. для лечения бесплодия методом ЭКО. Критериями включения в экспериментальную группу женщин являлись: возраст не менее 19 и не более 37 лет, индекс массы тела не менее 19 кг/м^2 и не более 25 кг/м^2, базальный уровень фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) не более 9 МЕ/л, отсутствие генетических и эндокринных нарушений и системных заболеваний воспалительного характера. Критериями исключения мужчин были отсутствие сперматозоидов в эякуляте и присутствие маркеров инфекционных заболеваний бактериально-вирусной природы (кроме маркеров ВПГ-инфекции). Ни в одном случае у обследованных пациентов в анамнезе не было клинического эпизода ВПГ-инфекции. Определение ВПГ проводили в выделенной фракции зрелых, активно подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов.

Выделение фракции активно подвижных сперматозоидов из эякулята проводили согласно рекомендациям ВОЗ (WHO, 2010) с использованием сертифицированных коммерческих сред фирмы COOK (Австралия).

Детекция ДНК ВПГ проводилась методом стандартной ПЦР и ПЦР *in situ*. Стандартный вариант ПЦР выполняли с использованием сертифицированных коммерческих наборов ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Для выделения ДНК использовали наборы ДНК-сорб-А-М и ДНК-сорб-В. Амплификацию ДНК проводили с использованием комплекта реагентов "АмплиСенс HSV 1.2 типов" на термоциклере "Терцик" (ДНК-Технология, Россия) по температурной программе, рекомендованной изготовителем тест-систем.

Для проведения ПЦР *in situ* препараты готовили на стеклах с адгезивным покрытием (Histobond, Германия). По 150 мкл из фракции подвижных сперматозоидов наносили на стекла, центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин в цитоцентрифуге 5804R (Эппендорф, Германия), высушивали на воздухе и фиксировали в 10% формалине в течение 4 часов. После двукратной отмывки в 0.05 М трис-HCl-буфере, препараты обрабатывали протеиназой К ("DAKO", Дания) 30 мин при 37°С. Добавляли амплификационную смесь, содержащую биотинилированные праймеры и проводили амплификацию в термоциклере T1 ("Biometra GmbH", Германия). Проявление реакции осуществляли с использованием комплекса биотин-стрептавидин-пероксидаза ("DAKO", Дания) и диаминобензидина ("Sigma", США). Подсчитывали не менее 2000 сперматозоидов в препаратах от каждого пациента и вычисляли долю клеток, содержащих метку ДНК ВПГ, которую выражали в процентах.

Экстракорпоральное оплодотворение. Стимуляция функции яичника проводилась по стандартному длинному протоколу с применением агонистов гонадотропин рилизинг гормона (а-ГнРГ) и гонадотропинов. Оплодотворение клеток методом ЭКО и/или методом введения сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКСИ) проводили по протоколам, описанным в работе Ван Ландэт (Van Landuyt et al., 2005). Через 18 часов после соединения гамет в условиях *in vitro* определяли число пронуклеусов в зиготах. Затем, через каждые 24 ч анализировали дробление и морфологию эмбрионов, которое оценивали по количеству бластомеров, количеству ядер в одном бластомере и наличию или отсутствию фрагментации бластомеров. Эмбрионы культивировали с использованием коммерческих сертифицированных сред фирмы COOK (Австралия), в условиях 6% CO_2 и 37°С. Полученные эмбрионы переносили в полость матки на второй-третий день развития. Для переноса отбирали не более 2–3 эмбрионов наиболее высокого качества. К ним относили эмбрионы, содержащие 4 и 8 бластомеров на 2 и 3 сутки соответственно без фрагментации и полинуклеарности. Оставшиеся после переноса эмбрионы культивировали до пятого дня развития и криоконсервировали на стадии бластоцисты.

Для оценки результатов ЭКО вычисляли следующие параметры:

1. Индекс оплодотворения как соотношение общего числа полученных у пациенток яйцеклеток к числу оплодотворившихся ооцитов (зигот).

2. Индекс дробления как отношение количества всех зигот к общему количеству дробившихся эмбрионов.

3. Частоту достижения эмбрионами стадии бластоцисты по числу бластоцист на пятый день развития эмбриона.

4. Частоту имплантации эмбрионов (ЧИЭ) по соотношению количества развивающихся плодных яиц к общему числу перенесенных эмбрионов.

5. Частоту наступления беременности (ЧНБ) как количество случаев наступления клинической беременности при расчете на одну процедуру переноса эмбрионов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы "BIOSTAT". Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента–Фишера – χ^2, различия считали достоверными при $p < 0.05$.

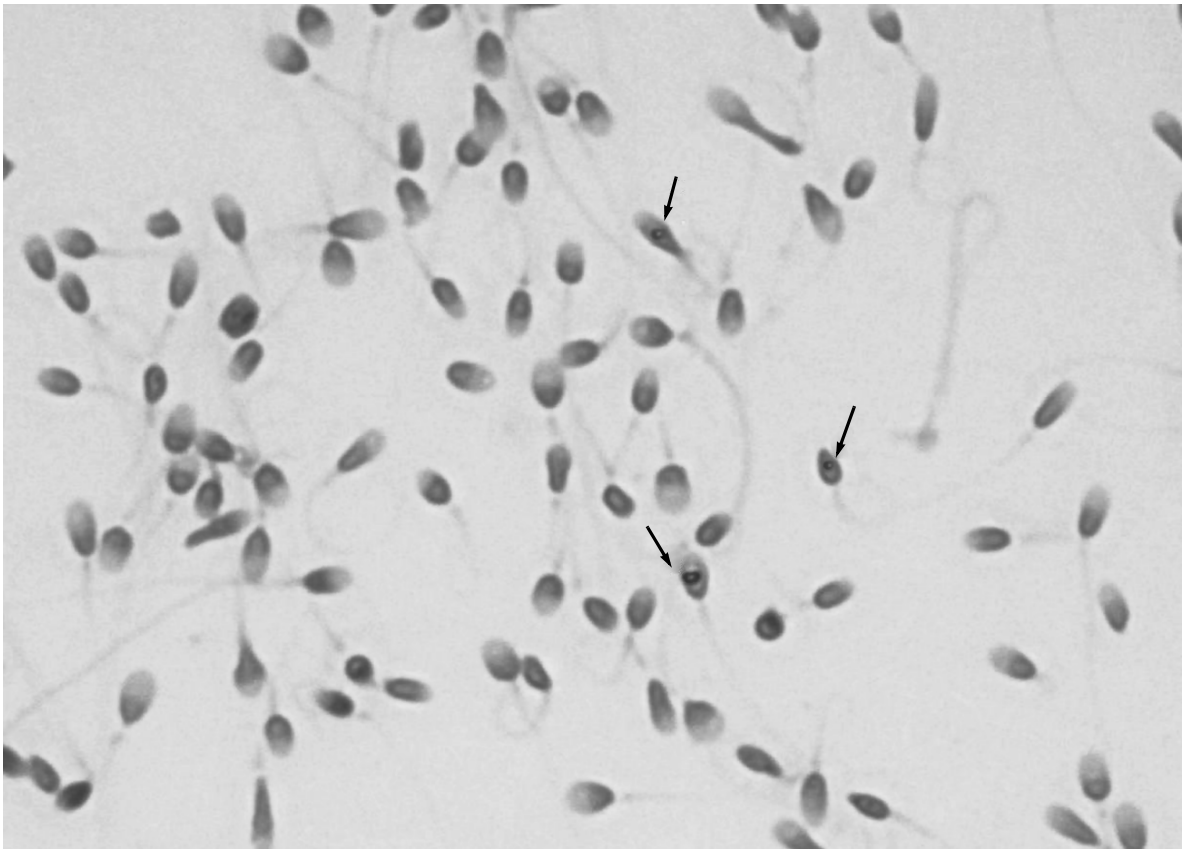


Рис. 1. Выявление ДНК вируса простого герпеса в сперматозоидах человека.
Цитологический препарат сперматозоидов, выделенных из фракции подвижных клеток эякулята пациентов с бесплодием. Окраска гематоксилином Караччи. Гаметы, содержащие ДНК ВПГ, обозначены стрелками. Реакция ПЦР *in situ*. Увеличение 400.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Детекцию ДНК ВПГ в сперматозоидах методом ПЦР проводили у 131 пациента, что позволило оценить частоту встречаемости ВПГ в мужских гаметах. У 64 пациентов из этой группы исследование вирусного генома проводили дополнительно методом ПЦР *in situ*, который позволяет оценить количество инфицированных клеток в цитологическом препарате. В целом, частота обнаружения ДНК вируса в сперматозоидах у обследованных пациентов методами ПЦР и ПЦР in situ составила 21.4% (28/131).

Подсчет ПЦР-позитивных мужских клеток показал, что доля инфицированных сперматозоидов в препаратах от разных пациентов различалась почти в 10 раз – от 0.25 до 20%, и в среднем составляла 2.8%. На рис. 1 можно видеть сперматозоиды, содержащие метку ДНК ВПГ, выявленную методом ПЦР *in situ*. Следует отметить, что до 80% сперматозоидов, содержавших геномную ДНК ВПГ, имели нарушение строения головки (макроголовки, микроголовки и аморфное строение головки).

По результатам выявления вирусной ДНК пациенты ($n = 131$) были разделены на две группы. В группу I вошли пациенты ($n = 28$), в подвижных сперматозоидах которых был выявлен ВПГ, группу II составили лица ($n = 103$), у которых ВПГ обнаружен не был. В изученных группах сопоставляли результаты оплодотворения и развития эмбрионов в условиях *in vitro*. Данные представлены в таблице 1. Они показали, что такие параметры как индекс оплодотворения и индекс дробления в изученных группах статистически значимо не различались. Изучение эмбрионов 2–3 дня развития в группах не выявило различий по морфологическим критериям (число бластомеров, фрагментация и полинуклеарность). В то же время частота формирования бластоцист в группе I была статистически значимо ниже, чем в группе II ($p = 0.015$).

Данные по эффективности лечения бесплодия методами ЭКО/ИКСИ у пациентов с ВПГ во фракции подвижных сперматозоидов и у ВПГ-негативных пациентов представлены в таблице 2. Сравнительный анализ показал, что при обнаружении ДНК ВПГ (группа I) частота имплантации эмбрионов была в 5.4 раз ниже и частота наступле-

Таблица 1. Сравнительная оценка развития эмбрионов при экстракорпоральном оплодотворении у инфицированных вирусом простого герпеса (I группа) и неинфицированных (II группа) пациентов

Пациенты / Эффективность эмбриогенеза	группа I $n = 28$	группа II $n = 103$
Индекс оплодотворения ооциты/зиготы	**1.31** 362/276	**1.5** 1715/1136
Индекс дробления зиготы/эмбрионы	**1.3** 276/210	**1.19** 1136/958
Частота формирования бластоцист, %	**21.4%*** 6/28	**49.5%*** 51/103

* Различия статистически значимы, $p = 0.015$.

ния беременности – в 4.6 раз ниже, чем в группе II, в которой ВПГ в мужских гаметах не был выявлен.

ОБСУЖДЕНИЕ

Опубликованные данные о частоте обнаружения ВПГ в сперматозоидах у инфертильных мужчин значительно расходятся: по сообщениям одних авторов, этот показатель составляет 3.5% (Wald et al., 1999), по результатам других исследователей – 49.6% (Kapranos et al., 2003). В настоящей работе из 131 пациента с бесплодием в браке ДНК ВПГ была выявлена у 28, что составляет 21.4%. Использование метода ПЦР *in situ* позволило установить, что количество инфицированных сперматозоидов в ВПГ-положительных образцах составляет в среднем 2.8%. Результаты других исследователей также свидетельствуют о том, что отдельные вирусные компоненты (ДНК и белки) и структуры (вирусные капсиды) обнаруживаются не во всех гаметах у инфицированных пациентов. Так, согласно данным изучения ДНК ВПГ методами гибридизации *in situ* и ПЦР *in situ* (Бочарова и др., 2007; Науменко В.А. и др., 2010), доля сперматозоидов, содержащих вирусный геном, у ВПГ-инфицированных пациентов составляет в среднем 1.5%.

Анализ структуры сперматозоидов, проведенный в настоящей работе, показал, что значительная часть гамет, содержащих геном ВПГ, характеризуются аномальной морфологией. Эти данные сходны с полученными ранее Котрониас и Капранос (Kotronias D., Kapranos N., 1998), которые указывали на обнаружение ДНК ВПГ у пациентов с преобладанием морфологически измененных форм зрелых мужских половых клеток. Детальный анализ морфологии мужских гамет позволил Абдулмеджидовой и соавторам установить, что детекция ВПГ в эякуляте культуральным методом коррелировала с увеличением числа сперматозоидов с микроголовками и с каплей не шейке сперматозоидов (Абдулмеджидова и др., 2007).

Несмотря на факт обнаружения ВПГ в зрелых сперматозоидах, подтвержденный различными методами, влияние вируса на процесс оплодотворения ооцита и ранние стадии развития эмбриона оставалось не установленным. В связи с этим в настоящей работе были изучены частота имплантации эмбрионов и частота наступления беременности в циклах ЭКО при обнаружении ДНК ВПГ в сперматозоидах пациентов (группа I) и при отсутствии вируса в мужских половых клетках (группа II). Проведенный сравнительный анализ показал, что и ЧИЭ и ЧНБ у инфицированных пациентов были приблизительно в 5 раз ниже, чем у ВПГ-негативных пациентов. Это статистически значимое снижение показывает, что детекция ВПГ в сперматозоидах прямо коррелирует с чрезвычайно низкой эффективностью ВРТ: 7% в группе I против 32% в группе II.

Представляло интерес выяснить, на какие стадии эмбриогенеза вирус может оказывать негативное влияние. На первый взгляд данные об отсутствии влияния ВПГ на оплодотворение и дробление противоречат результатам о статистически значимом снижении частоты развития бластоцист у пациентов, инфицированных ВПГ.

Эти данные можно объяснить, если принять во внимание следующие обстоятельства. В настоящее время дробление эмбрионов *in vitro* оценивается методом, основанным на морфологических критериях (Van Royen, 1999), который не учитывает возможные генетические изменения. В то же время можно считать установленным факт высокой частоты гетероплоидии эмбрионов человека (Баранов и Кузнецова, 2007). Так, при изучении эмбрионов 3 дня развития с нормальной морфологией, гетероплоидия была показана у 60% из них, а среди

Таблица 2. Сравнительный анализ эффективности экстракорпорального оплодотворения при инфицировании сперматозоидов вирусом простого герпеса (группа I) и при отсутствии вируса в сперматозоидах (группа II)

Пациенты / Показатель эффективности ЭКО	группа I $n = 28$	группа II $n = 103$	Статистическая значимость (критерий χ^2)
Частота имплантации эмбрионов, %	2.6 (2/76)	14.1 (40/284)	$p = 0.01$
Частота наступления беременности, %	7 (2/28)	32 (33/103)	$p = 0.016$

эмбрионов 5 дня развития – у 40% (Clouston, 2002; Jamieson et al., 1994). Эти данные свидетельствуют об отсутствии связи между генетическими событиями в ядрах бластомеров и морфологическими параметрами эмбрионов. Можно предположить, что существенное снижение частоты развития эмбрионов до более поздней стадии (бластоцисты) у инфицированных пациентов является следствием нарушения клеточных механизмов, обеспечивающих нормальное течение митотического деления. Известно, что патология митоза приводит к развитию мутаций, анеуплоидии и к появлению хромосомных аббераций.

О том, что бессимптомная ВПГ-инфекция может вносить вклад в возникновение генетических нарушений в эмбрионах человека, таких как гетероплоидия, свидетельствует ряд данных. Показано, что антигены ВПГ способны индуцировать хромосомные аберрации и возникновение точечных мутаций в инфицированных клетках культуры фибробластов человека (Chenet-Monte et al., 1986; Hwang and Shillitoe, 1990). Установлено, что некоторые из сверхранних белков ВПГ негативно влияют на клеточный цикл, индуцируя нарушения в количестве и составе хромосом (Liu M. et al., 2010). Изучение белков ВПГ в сперматозоидах показало, что в зрелых, морфологически нормальных мужских половых клетках обнаруживаются вирусные белки – продукты сверхранних и ранних вирусных генов (Бочарова и др., 2007).

В настоящей работе установлено снижение частоты имплантации эмбрионов у пациентов с ВПГ-инфекцией мужских гамет. Это может быть следствием разных причин, в том числе низкой потенции к имплантации эмбрионов у ВПГ-инфицированных пациентов. Можно предположить, что ВПГ-инфекция оказывает влияние также на клетки эндометрия, создавая неблагоприятные условия для развития эмбриона в полости матки. Экспериментальные доказательства данного предположения – предмет дальнейших исследований.

Таким образом, в результате проведенной работы впервые показано, что обнаружение ДНК ВПГ в сперматозоидах статистически значимо коррелирует со снижением уровня формирования бластоцист и с низкими показателями имплантации эмбрионов. Установленное снижение эффективности лечения бесплодия методом ЭКО может быть связано с механизмом передачи ВПГ эмбрионам в результате оплодотворения ооцитов инфицированными сперматозоидами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Абдулмеджидова А.Г., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В. и др. Бессимптомная форма генитального герпеса и бесплодие у мужчин // Урология. 2007. № 3. С. 56–59.

Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты // СПб: Н-Л, 2007. 640 с.

Бочарова Е.Н., Завалишина Л.Э., Брагина Е.Е. и др. Выявление геномной ДНК простого герпеса методом гибридизации in situ в сперматозоидах человека при нарушении фертильности // Докл. РАН. 2007. Т. 412. № 3. С. 417–421.

Бочарова Е.Н., Брагина Е.Е., Гусак Ю.К. и др. Спонтанное прерывание беременности, неудачи при использовании репродуктивных технологий и герпетическое инфицирование сперматозоидов // Андрол. и генит. хир. 2006. № 1. С. 59–65.

Брагина Е.Е., Абдулмаликов Р.А., Курило Л.Ф. и др. Выявление свперматозоидов, инфицированных вирусом простого герпеса // Вестник дерматологии венерологии. 2000. № 5. С. 18–22.

Климова Р.Р., Чичев Е.В., Науменко В.А. и др. Вирус простого герпеса и цитомегаловирус в эякуляте мужчин: вирус простого герпеса чаще встречается при идиопатическом бесплодии и коррелирует со снижением показателей спермы // Вопросы вирусологии. 2010. Т. 55. № 1. С. 27–31.

Науменко В.А., Климова Р.Р., Курило Л.Ф. и др. Выявление вируса простого герпеса в мужских половых клетках при экспериментальной инфекции органной культуры семенника и в эякуляте мужчин с нарушением фертильности // Акушерство и гинекология. 2010. № 3. С. 42–46.

Bezold G., Politch J.A., Kiviat N.B. et al. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia // Fertil Steril. 2007. V. 87(5). P. 1087–97.

Chenet-Monte C., Mohammad F., Celluzzi C.M. et al. Herpes simplex virus gene products involved in the induction of chromosomal aberrations // Virus Res. 1986. V. 6(3). P. 245–60.

Clouston H.J., Herbert M., Fenwick J. et al. Cytogenetic analysis of human blastocysts // Prenat. Diag. 2002; 22; 12: 1143–1152.

Csata S., Kulcsar G. Virus-host studies in human seminal and mouse testicular cells // Acta Chir. Hung. 1991; 32: 83–90.

Dejucq N., Jegou B. Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system // Mycrobiol. and Mol. biol. 2001; 65: 208-231.

Deture F.A., Drylie D.M., Kaufman H.E., Centifanto Y.M. Herpesvirus type 2: isolation from seminal vesicle and testes // Urol. 1976; 7: 541–544.

Hwang CB, Shillitoe EJ. DNA sequence of mutations induced in cells by herpes simplex virus type-1 // Virology. 1990 Sep; 178(1): 180–8.

Jamieson M.E., Coutts J.R., Connor J.M. The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro // Hum. Reprod. 1994; 9; 4: 709–715.

Kotronias D., Kapranos N. Detection of herpes simplex virus DNA in human spermatozoa by *in situ* hybridization technique // In vivo. 1998; 12: 391–394.

Liu M., Schmidt E.E., Halford W.P. ICP0 Dismantles Microtubule Networks in Herpes Simplex Virus-Infected Cells // PLoS One. 2010 Jun 8; 5(6): e10975.

Moore D.E., Ashley R.L., Zarutskie P.W. et al. Transmission of genital herpes by donor insemination // JAMA. 1989; 261: 3441–3443.

Van Landuyt L., De Vos A., Joris H. et al. Blastocyst formation in *in vitro* fertilization versus intra cytoplasmic sperm injection cycles: influence of the fertilization procedure // Fertil Steril 2005; 83: 1397–1403.

Van Royen E., Mangelschots K., De Neubourg D. et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer // Hum Reprod. 1999. Sep; 14(9): 2345–9.

Wald A., Matson P., Ryncarz A. and Corey L. Detection of herpes simplex virus DNA in semen of men with genital HSV-2 infection // Sex transm. Dis. 1999; 26: 1–3.

WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5th ed. // Cambridge University Press. 2010.

Herpes Simplex Virus Infection of Human Spermatozoa Correlates with Decreased Frequency of Blastocyst Formation and Frequency of Embryo Implantation during in Vitro Fertilization

A. S. Tsibizov[a], A. G. Abdulmedzhidova[a], K. B. Krasnopol'skaya[b], Z. S. Gadzhieva[a], and A. A. Kushch[a]

[a] *Ivanovsky Research Institute of Virology Federal State Institution, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, ul. Gamalei 16, Moscow, 123098 Russia*

[b] *Reproduction Department, Moscow Regional Scientific-Research Institute for Obstetrics and Gynecology State Healthcare Institution, Vtoroi Botkinskii proezd 5, korp. 5, Moscow, 125101*

e-mail: anisat2011@gmail.com

Abstract—We have conducted a comparative analysis of developing human embryos in the course of in vitro fertilization (IVF) as a method of sterility treatment of two groups of patients: herpes simplex virus (HSV) was detected in the fraction of motile sperm of male partners in group I ($n = 28$) and no HSV was found in sperm in group II ($n = 103$). We assessed number of fertilized ova, embryos during cleavage, and blastocysts as well as such parameters as frequency of implantation and frequency of pregnancy in IVF cycles. It was established that the presence of HSV in spermatozoa did not affect the efficiency of fertilization or cleavage of zygotes. At the same time, in cases of virus-infected male gametes, the frequency of blastocyst formation was two times less ($p = 0.015$), and the frequency of embryo implantation and pregnancy was, on average, five times lower ($p = 0.01$ and $p = 0.016$, respectively). Based on the obtained results, a conclusion was made about the negative influence of HSV-virus in male gametes at the early stages of embryo development and the frequency of achievement of pregnancy in respect to the methods of assisted reproductive technologies (ART).

Keywords: human spermatozoa, human embryos, herpes simplex virus, in vitro fertilization, implantation, achievement of pregnancy

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 6, с. 453–464

ЭМБРИОГЕНЕЗ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

УДК 576.385.5

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ, МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ IAR-2, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ОНКОГЕНОМ *RAS*: ВКЛАД БЕЛКА МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ Е-КАДХЕРИНА

© 2011 г. И. Ю. Житняк, Н. А. Глушанкова

НИИ канцерогенеза, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478 Москва Каширское ш., д. 24

E-mail: natglu@hotmail.com

Поступила в редакцию 09.09.2010 г.
Окончательный вариант получен 16.12.2010 г.

Разрушение стабильной межклеточной адгезии и приобретение способности к миграции являются закономерными этапами неопластической эволюции опухолевых клеток эпителиального происхождения. В работе были исследованы морфологические и миграционные характеристики эпителиоцитов клонов IAR1162 и IAR1170, полученных из смешанной культуры трансформированных онкогеном N-*RasV12* клеток линии IAR-2. Было обнаружено, что мутантный онкоген *RAS* может вызвать два типа морфологических изменений эпителиоцитов IAR-2. Клетки одного типа (клоны IAR1162) прошли эпителиально-мезенхимальный переход: утратили экспрессию Е-кадхерина, приобрели фибробластоподобную морфологию, не образовывали плотные контакты. Клетки другого типа (клоны IAR1170) сохранили морфологию, близкую к морфологии нетрансформированных предшественников, образовывали межклеточные Е-кадхерин-содержащие адгезионные контакты и плотные контакты, формировали монослой в конфлуэнтной культуре. Вместе с тем, как в клетках 1AR1162, так и в клетках IAR1170 мутантный онкоген *RAS* вызывал разрушение краевого актинового пучка и реорганизацию межклеточных адгезионных контактов. Трансформированные эпителиоциты IAR1162 и IAR1170 приобрели способность мигрировать по плоскому субстрату, а также через узкие поры в мембранах миграционных камер. Видеомикроскопические исследования культур трансформированных эпителиоцитов продемонстрировали нестабильность межклеточных контактов и независимый характер миграции клеток. Эпителиоциты IAR1170, имеющие Е-кадхерин-содержащие АК, были также способны перемещаться в составе группы (коллективная миграция). Клетки 1162D3, утратившие в результате Ras-трансформации экспрессию эндогенного Е-кадхерина, были трансфицированы плазмидой, несущей ген *CDH1*, и в результате трансфекции были получены клоны клеток с различным уровнем экспрессии экзогенного Е-кадхерина. Высокий уровень экспрессии экзогенного Е-кадхерина в трансформированных эпителиоцитах приводил к снижению скорости миграции на двумерном субстрате клеток, находящихся в контакте с соседними клетками, практически не влияя на миграцию одиночных клеток, но, вместе с тем, увеличивал количество клеток, мигрировавших через поры в миграционных камерах. Таким образом, разрушение краевого актинового пучка и изменение пространственной организации межклеточных адгезионных контактов, несмотря на наличие или отсутствие в них Е-кадхерина, сопровождается разрушением стабильной межклеточной адгезии и появлением локомоторной активности у Ras-трансформированных эпителиоцитов. Сохранение Е-кадхерина в межклеточных адгезионных контактах влияет на локомоторную активность трансформированных эпителиоцитов и играет важную роль в их коллективной миграции.

Ключевые слова: трансформированные эпителиоциты, актиновый цитоскелет, межклеточные контакты, Е-кадхерин, миграция.

Инвазия и метастазирование клеток из первичной опухоли являются ключевыми моментами опухолевой прогрессии. Нарушения межклеточной адгезии при трансформации играют существенную роль в развитии инвазивного потенциала опухолевых клеток. В настоящее время общепринятой точкой зрения является представление о том, что программа эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), при котором дифференцированные эпителиальные клетки превращаются в фибробластоподобные клетки, способные к миграции, является основным механизмом эволюции клеток карцином (Thiery, 2002; Ackland et al., 2003). В ходе ЭМП происходит разрушение стабильной межклеточной адгезии, главным образом, за счет угнетения экспрессии

или аккумуляции на мембране Е-кадхерина, при этом эпителиальные клетки начинают экспрессировать мезенхимальные маркеры (N-кадхерин, фибронектин, виментин) (Rosivatz et al., 2002; Yang et al., 2004; Wheelock et al., 2007; Thiery et al., 2009).

Угнетение экспрессии Е-кадхерина и связанное с этим разрушение межклеточной адгезии часто рассматривается как пусковой механизм инвазии и диссеминации опухолевых клеток (Perl et al., 1998; Brabietz et al., 2001; Prall, 2007). Вместе с тем хорошо известно, что ряд карцином человека, в частности протоковые карциномы молочной железы, карциномы толстой кишки, меланомы могут сохранять экспрессию Е-кадхерина (Nabeshima et al., 1999; Gillett et al., 2001; Hegerfeldt et al., 2002). Показано также, что опухолевые клетки способны к миграции и инвазии и в отсутствие ЭМП, что свидетельствует о возможности существования механизмов запуска инвазии, не связанных с угнетением экспрессии и аккумуляции на мембране Е-кадхерина (Tarin et al., 2005; Wicki et al., 2006; Wolf et al., 2007).

Ранее мы обнаружили, что неопластическая трансформация эпителиальных клеток может приводить к исчезновению типичного для эпителиоцитов краевого актинового пучка и реорганизации межклеточных Е-кадхерин-содержащих адгезионных контактов (АК), разрушающих стабильную межклеточную адгезию (Ayollo et al., 2009). Вместе с тем, до сих пор оставалось неясным, как влияет сохранение в клетках экспрессии главной молекулы межклеточной адгезии Е-кадхерина на морфологические и миграционные характеристики трансформированных эпителиоцитов.

Целью данной работы было сравнительное исследование морфологии, межклеточных взаимодействий и миграционной активности Ras-трансформированных эпителиоцитов IAR1162, утративших экспрессию Е-кадхерина, и Ras-трансформированных эпителиоцитов IAR1170, сохранивших экспрессию Е-кадхерина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные культуры. В работе была использована постоянная линия нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2, полученная из эксплантата печени крысы (Montesano et al., 1975). Линии эпителиальных клеток, трансформированные онкогеном N-*RA*S, были получены путем инфекции кДНК мутантного гена человека N-*RasV12* в составе вириона ретровируса (pPS/hygro) в клетки исходной линии IAR-2, с отбором трансформантов в среде с гигромицином (200 мкг/мл) (Gloushankova et al., 1994) с последующим клонированием. Были получены клоны Ras-трансформированных эпителиоцитов IAR1170: 1170D6, 1170D11, 1170F9, 1170H5, 1170D12, имевших морфологию, близкую к морфологии нетрансформированных эпителиоцитов, а также клоны Ras-трансформированных эпителиоцитов IAR1162: 1162D3, 1162F4, клетки которых имели вытянутую, фибробластоподобную морфологию. Клетки клона 1162D3 были трасфицированы плазмидой BIEcwt, несущей кДНК гена *CDH1* (Е-кадхерин). В результате клонирования были получены клоны 1162D3-EI7, 1162D3-EK2, 1162D3-EP8, 1162D3-EM5, 1162D3-EJ7, различающиеся по уровню экспрессии экзогенного Е-кадхерина.

Культивирование клеток. Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma, США) с добавлением 7.5% эмбриональной телячьей сыворотки (PPA Lab., Австрия) и антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, 100 ед/мл) при температуре 37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO_2. Линии, трасфицированные плазмидой BIEcwt, культивировали в среде с добавлением G-418 (1 мг/мл) (Sigma, США).

Клонирование клеток. Клетки снимали с подложки 0.1% трипсином на растворе Версена. Исходя из концентрации клеток в суспензии, производили серию разведений до концентрации клеток 10 кл/мл и раскапывали по 100 мкл в лунки 96-луночной плашки. Выросшие колонии пересаживали в 12-луночные плашки, после чего подросшие клоны окрашивали на Е-кадхерин и отбирали с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии.

Трансфекция клеток. Трансфекция плазмидой BIEcwt производилась на 20-часовой редкой культуре клеток в чашках Петри с помощью Lipofectamine™ LTX и Plus™ Reagent (Invitrogen, США). Через 2 суток в среду на 2 недели добавляли селектирующий агент G-418. Для выявления эффективных трансфектантов было использовано иммунофлуоресцентное окрашивание Е-кадхерина. В результате клонирования смешанной культуры были получены клоны, в клетках которых в присутствии G-418 стабильно экспрессировался экзогенный Е-кадхерин.

Фиксация клеток. Для флуоресцентного окрашивания актиновых филаментов клетки фиксировали 3.7% раствором параформальдегида на PBS (фосфатный буфер, pH 7.2) в течение 10 мин, отмывали и обрабатывали 0.5% раствором Triton X-100 (Sigma, США) на PBS в течение 3 мин. Для иммунофлуоресцентного окрашивания белков межклеточных контактов (Е-, N-кадхерина, окклюдина) применяли фиксацию метанол-ацетоном (1 : 1) в течение 10 мин при –20°C.

Иммунофлуоресцентное окрашивание и микроскопия. В качестве первичных антител в работе использовали моноклональные мышиные анти-

тела к Е-кадхерину, N-кадхерину (BD, Transduction Laboratories, США), окклюдину (Invitrogen, Zymed, США). В качестве вторичных антител использовали моноклональные антитела к IgG мыши, меченные родамином (Jackson ImmunoResearch, США), или меченные AlexaGreen^{488} (Invitrogen, Molecular Probes, США). Для окраски актина использовался фаллоидин, меченный родамином (Sigma, США), или A1exaGreen^{488}-фаллоидин (Invitrogen, Molecular Probes, США). Фиксированные клетки на покровных стеклах помещали в раствор первичных антител на PBS и инкубировали в течение 40 мин, после чего отмывали PBS и окрашивали вторичными антителами. Препараты заключали в раствор поливинилового спирта (Sigma, США) на PBS и исследовали с помощью флуоресцентных микроскопов Axioplan (Zeiss, Германия) или Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония). Фотосъемку препаратов осуществляли с помощью цифровых камер Olympus DP70 с программным обеспечением DP Controller (Olympus, Япония) и Hamamatsu с программным обеспечением NIS-Elements AR (Nikon, Япония).

Морфометрия. Полученные изображения одиночных клеток использовали для морфометрического анализа. Контуры клеток были проанализированы с помощью программы TRACER V1.0. При анализе формы измеряли следующие параметры: площадь, дисперсию, элонгацию, периметр клеток. Параметры дисперсия и элонгация были предложены Данном и Брауном (Dunn, Brown, 1986). Элонгация является величиной, характеризующей степень вытянутости клеток (биполярность), и равна нулю у радиально симметричных фигур. Она определяется как lg_2 от отношения длинной оси описанного вокруг фигуры эллипса к его короткой оси. Элонгация инвариантна к изменению масштаба (размера) контура (эллипса), но не к его растяжению. Дисперсия – это величина, отражающая степень "изрезанности" края клетки (мультиполярность), и равна нулю для любого эллипса. Она определяется как lg_2 от отношения площади эллипса, описанного вокруг контура клетки, к ее площади. Дисперсия нечувствительна ни к изменению масштаба контура, ни к его растяжению. Данные морфометрического анализа подвергали статистической обработке. С использованием программы Excel были вычислены средние значения величин, стандартные отклонения и доверительные интервалы для определения достоверности полученных результатов.

Видеомикроскопия. С помощью видеомикроскопа Nikon Eclipse Ti была исследована локомоторная активность клеток в редкой культуре через 20 ч после их рассева в концентрации 20000 кл/мл. Последовательности видеокадров, полученные каждые 15 мин в течение 6 ч, обрабатывали в программе ImageJ, определяя перемещения и скорости индивидуальных клеток.

Миграционная активность. Миграционную активность клеток исследовали в BD Bio-Coat™ миграционных камерах (Becton Dickinson, США), содержащих поликарбонатные мембранные вставки с порами диаметром 8 мкм. Клетки в концентрации 2×10^5 клеток/мл среды DMEM с эмбриональной телячьей сывороткой добавляли в верхнюю часть миграционной камеры, помещенной в лунку 24-луночной плашки, заполненной той же средой. После 20 ч инкубации при 37°C в термостате клетки с верхней поверхности мембраны удаляли, а клетки на нижней поверхности мембраны фиксировали 100% метанолом и окрашивали DAPI (Sigma, США). Мембраны монтировали на предметное стекло и исследовали микроскопически с использованием 20× объектива. Миграционная активность клеток оценивалась после подсчета количества окрашенных клеток в 15 полях зрения в трех повторах и определения среднего значения.

Иммуноблоттинг. Вестерн-блот анализ проводили с использованием ячейки Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad, США). В качестве лизирующего буфера использовали буфер RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.1% SDS; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.5% деоксихолат Na) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Sigma, США). Образцы белка (10–20 мкл), смешанные с буфером для нанесения, выдерживали 5 мин при 95°C и наносили на SDS-ПААГ для электрофореза. Перенос осуществляли на PVDF мембраны (GE Healthcare, Amersham, США), которые затем окрашивали первичными антителами на Е-, N-кадхерин и α-тубулин (в качестве маркера) и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (Molecular Probes, Invitrogen, США). Детекция белка осуществлялась с помощью ECL Plus kit (GE Healthcare, Amersham), хемилюминесцентные изображения были получены с помощью системы Chemi-Smart 2000 и программного обеспечения Chemi Capt (Vilber Lourmat, France).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменения морфологии, актинового цитоскелета и межклеточных контактов эпителиальных клеток IAR-2 при неопластической трансформации. Нетрансформированные эпителиоциты линии IAR-2 в редкой культуре образовывали островки плотно сцепленных между собой клеток, которые по всему клеточному краю образовывали псевдоподии (рис. 1А). В густой культуре эпителиоциты IAR-2 росли в виде монослоя. Одиночные клетки IAR-2 имели дискоидную форму. Главная структура актинового цитоскелета нормальных эпителиальных клеток – краевой актиновый пучок, который располагался на свобод-

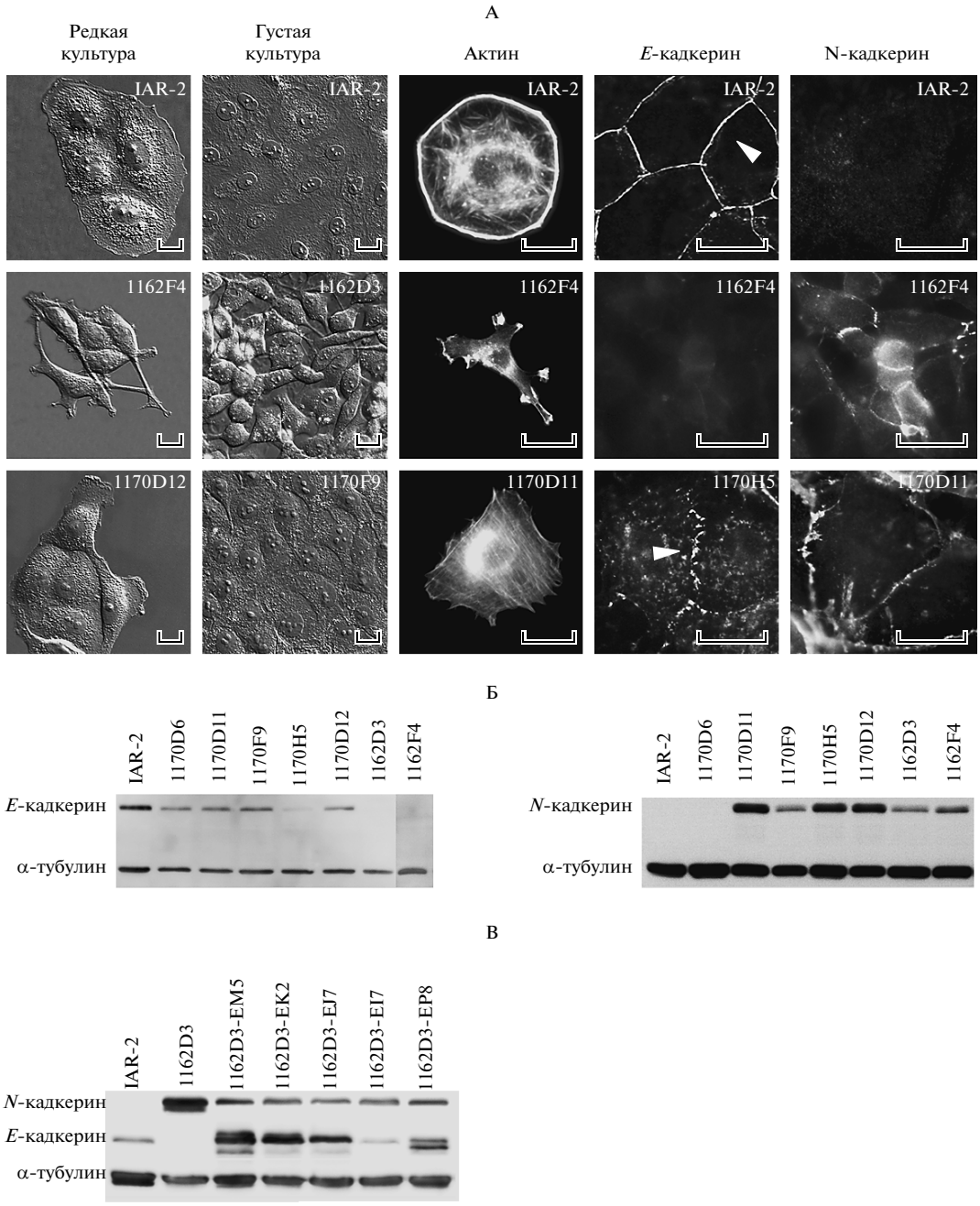


Рис. 1. Нетрансформированные эпителиоциты IAR-2 и их Ras-трансформированные производные IAR1162 и IAR1170.

1А. Нетрансформированные эпителиоциты IAR-2 имеют дискоидную форму, в редкой культуре объединяются в островки, в густой культуре формируют монослой. Трансформированные эпителиоциты IAR1162 имеют фибробластоподобный фенотип и образуют многослойную культуру (клоны 1162F4, 1162D3). Трансформированные эпителиоциты IAR1170 имеют полигональную форму и формируют монослой (клоны 1170D12, 1170F9, 1170D11). В трансформированных эпителиоцитах IAR1162 (клон 1162F4) и IAR1170 (клон 1170D11) утрачивается краевой актиновыи пучок, характерный для нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2 (окрашивание филаментного актина родамин-фаллоидином). АК нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2 организованы в непрерывные тангенциальные пояса (стрелка) (окрашивание на Е-кадхерин). В трансформированных эпителиоцитах IAR1170 Е-кадхерин формирует кластеры АК на межклеточных границах (клон 1170H5 – стрелка). В эпителиоцитах IAR1162 и IAR1170 N-кадхерин аккумулирован в кластерах на границах между клетками (клоны 1162F4, 1170D11). 1Б, 1В. Иммуноблоттинг культур эпителиоцитов. Окраска антителами к Е-кадхерину, N-кадхерину, α-тубулину (маркерный белок).

Морфометрические параметры трансформированных эпителиоцитов

Линия	Площадь, мкм^2	Элонгация	Дисперсия	Периметр, мкм
IAR-2	2028 ± 120	0.17 ± 0.02	0.01 ± 0.001	168 ± 6
Ras-трансформированные эпителиоциты				
IAR1162D3	576 ± 47	0.86 ± 0.11	0.25 ± 0.06	122 ± 8
IAR1162F4	533 ± 40	1.36 ± 0.13	0.39 ± 0.04	137 ± 6
IAR1170D6	642 ± 71	0.57 ± 0.08	0.13 ± 0.03	112 ± 7
IAR1170D11	583 ± 58	0.31 ± 0.04	0.08 ± 0.02	108 ± 6
IAR1170F9	863 ± 74	0.33 ± 0.04	0.05 ± 0.01	118 ± 5
IAR1170H5	804 ± 87	0.38 ± 0.05	0.19 ± 0.05	139 ± 9
IAR1170D12	691 ± 59	0.41 ± 0.06	0.14 ± 0.04	126 ± 6
Клетки IAR1162D3, трансфицированные кДНК гена *CDH1*				
IAR1162D3-EM5	928 ± 98	0.49 ± 0.08	0.15 ± 0.04	131 ± 7
IAR1162D3-EK2	962 ± 96	0.70 ± 0.12	0.49 ± 0.08	204 ± 20
IAR1162D3-EJ7	1004 ± 76	0.66 ± 0.09	0.17 ± 0.03	156 ± 9
IAR1162D3-EI7	1613 ± 226	0.48 ± 0.08	0.16 ± 0.03	181 ± 13
IAR1162D3-EP8	1353 ± 199	0.65 ± 0.11	0.12 ± 0.04	164 ± 14

ных краях эпителиоцитов. Иммуноблоттинг показал, что эпителиоциты IAR-2 экспрессировали эпителиальный E-кадхерин, а N-кадхерин в этих клетках не обнаруживался (рис. 1Б). Межклеточные адгезионные контакты эпителиоцитов IAR-2, образованные E-кадхерином, были организованы в адгезионные пояса, располагавшиеся вдоль межклеточных границ (рис. 1А).

После трансформации эпителиоцитов IAR-2 мутантным онкогеном N-*RAS* были получены два типа клонов: клоны IAR1170 и клоны 1AR1162. Клетки клонов IAR1162 в результате трансформации претерпели эпителиально-мезенхимальный переход (рис. 1А). Трансформированные эпителиоциты IAR1162 имели вытянутую фибробластоподобную форму, образуя одну-две ведущие ламеллы. В редкой культуре эпителиоциты IAR1162 в большинстве своем существовали как отдельные клетки, иногда объединяясь в островки. В густой культуре клетки IAR1162 часто подползали под соседние клетки, образуя многослойную культуру. Флуоресцентно-микроскопическое исследование с использованием меченого фаллоидина показало, что в трансформированных эпителиоцитах IAR1162 исчезал краевой актиновый пучок, в цитоплазме обнаруживались немногочисленные тонкие актиновые пучки, ориентированные вдоль длинной оси клетки.

При иммуноблоттинге было обнаружено, что в трансформированных эпителиоцитах IAR1162 E-кадхерин не экспрессировался, но экспрессировался мезенхимальный N-кадхерин (рис. 1Б). При иммунофлуоресцентном окрашивании культуры IAR1162 E-кадхерин также не выявлялся. АК эпителиоцитов IAR1162 были организованы в кластеры на межклеточных границах, в которых аккумулировался N-кадхерин (рис. 1А).

Морфометрический анализ одиночных клеток (таблица) показал, что по сравнению с нетрансформированными предшественниками IAR-2 существенно (в 3–4 раза) уменьшалась площадь трансформированных клеток IAR1162, увеличивалась элонгация клеток, характеризующая вытянутость клеток, возрастала дисперсия, характеризующая изрезанность клеточного края.

После трансформации клеток IAR-2 онкогеном N-*RAS*, помимо клонов IAR1162, были также выделены 5 клонов IAR1170, клетки которых не претерпели эпителиально-мезенхимальный переход (рис. 1А). Одиночные трансформированные эпителиоциты IAR1170 имели полигональную или дискоидную форму. Трансформированные эпителиоциты IAR1170 формировали широкие псевдоподии вдоль свободного края, при этом образование псевдоподий по клеточному краю было крайне неравномерным. Клетки IAR1170 в редкой культуре часто объединялись в островки, а в густой культуре росли в виде монослоя, похожего на монослой нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2. Флуоресцентное окрашивание филаментного актина выявило в трансформированных эпителиоцитах IAR1170 исчезновение непрерывного краевого актинового пучка. В некоторых клетках можно было видеть актиновые арки, располагающиеся параллельно клеточному краю.

Иммуноблоттинг показал, что трансформированные эпителиоциты IAR1170 продолжали экспрессировать E-кадхерин, при этом в клетках IAR1170 также активировалась экспрессия

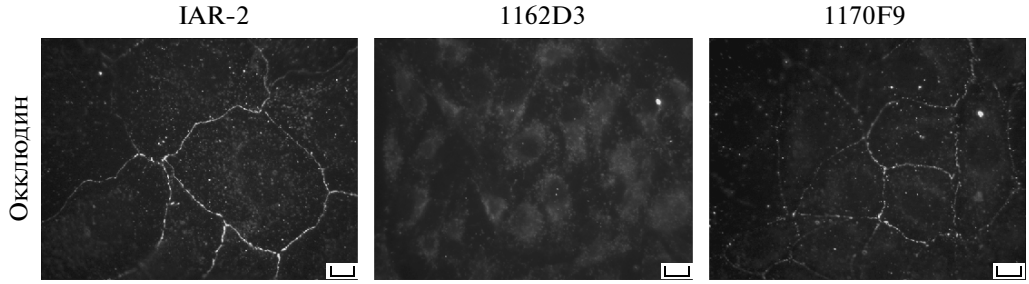


Рис. 2. Распределение белка плотных контактов окклюдина в нетрансформированных эпителиоцитах IAR-2 и трансформированных эпителиоцитах IAR1162 и IAR1170. В клетках IAR-2 плотные контакты организованы в полосы вдоль межклеточных границ. Трансформированные эпителиоциты IAR1162 (клон 1162D3) плотные контакты не формируют. В трансформированных эпителиоцитах IAR1170 (клон 1170F9) окклюдин собирается в точечные кластеры на границах между клетками.

N-кадхерина (рис. 1Б). Несмотря на то, что в эпителиоцитах IAR1170 E-кадхерин аккумулировался в адгезионных контактах на границах между клетками, организация контактов существенно изменялась (рис. 1А). В отличие от непрерывных адгезионных поясов нетрансформированных эпителиальных клеток, АК трансформированных эпителиоцитов IAR1170 представляли собой изолированные точечные кластеры на межклеточных границах. В густых культурах кластеры АК могли также образовывать фрагментированные линии вдоль межклеточных границ. В состав АК эпителиоцитов IAR1170 наряду с E-кадхерином входил и N-кадхерин.

Морфометрический анализ показал, что по сравнению с нетрансформированными эпителиоцитами IAR-2, средняя площадь одиночных трансформированных эпителиоцитов IAR1170 была меньше, а дисперсия и элонгация увеличивались (таблица).

Для исследования возможного влияния экспрессии E-кадхерина на морфологические и миграционные характеристики трансформированных эпителиоцитов была произведена трансфекция экзогенной конструкцией с геном E-кадхерина клеток клона трансформированных эпителиоцитов 1162D3, утративших E-кадхерин (рис. 1В). Экзогенный E-кадхерин аккумулировался в точечных АК на границах между клетками (рис. 3). Экспрессия экзогенного E-кадхерина изменяла морфологию трансформированных эпителиоцитов IAR1162, имевших исходно фибробластоподобный фенотип. Клетки клонов 1162D3-EM5, 1162D3-EK2, 1162D3-EI7, 1162D3-EP8 и 1162D3-EJ7 приобрели полигональную форму, контур клеток был часто изрезан. Экспрессия экзогенного E-кадхерина приводила к существенным изменениям морфометрических характеристик трансформированных эпителиоцитов IAR1162: резко возрастала площадь их распластывания на субстрате, снижалась элонгация клеток и в большинстве клонов уменьшалась дисперсия (таблица).

Как известно, АК участвуют в формировании и механическом поддержании плотных контактов (tight junctions), которые, в свою очередь, обеспечивают барьерную функцию эпителия и физически разделяют мембрану поляризованных эпителиоцитов на апикальный и базолатеральный домены (Steed et al., 2010). С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии мы исследовали распределение белка плотных контактов, окклюдина, в нетрансформированных и трансформированных эпителиоцитах IAR и обнаружили, что неопластическая трансформация вызывала разрушение структуры плотных контактов в эпителиальных культурах. Нетрансформированные эпителиоциты IAR-2 формировали плотные контакты, которые располагались в виде полос вдоль межклеточных границ (рис. 2). Трансформированные эпителиоциты IAR1162, лишенные E-кадхерина, плотные контакты не образовывали. В трансформированных эпителиоцитах IAR1170, экспрессирующих E-кадхерин, окклюдин аккумулировался на межклеточных границах, образуя плотные контакты в виде точечных кластеров. Вместе с тем трансфекция в клетки IAR1162D3 гена *CDH1* E-кадхерина не приводила к восстановлению аккумуляции окклюдина на границах клеток и формированию плотных контактов (рис. 3).

Локомоторная активность нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2 и трансформированных эпителиоцитов IAR1162 и IAR1170 в редких культурах. Видеомикроскопическое исследование выявило существенные различия в поведении нетрансформированных и трансформированных эпителиальных клеток. Нетрансформированные эпителиоциты IAR-2 на протяжении 6 ч практически не меняли свою морфологию. Одиночные клетки IAR-2 имели дискоидную форму, образуя псевдоподии по всему краю. Эпителиоциты IAR-2 могли объединяться

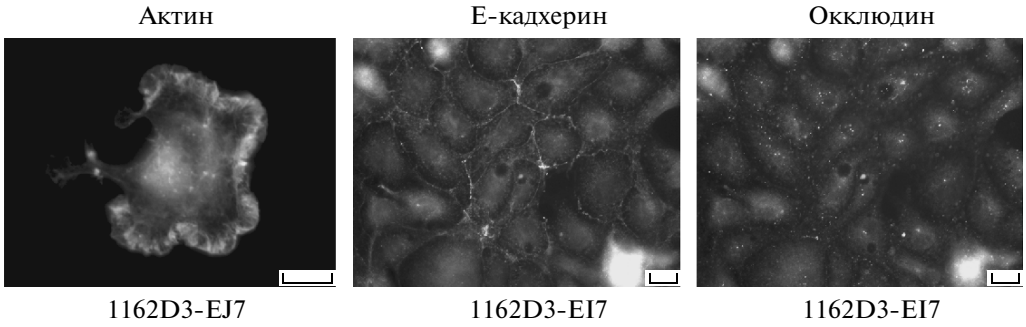


Рис. 3. Трансформированные эпителиоциты IAR1162, экспрессирующие экзогенный Е-кадхерин. В результате трансфекции гена *CDH1* форма трансформированных клеток становится полигональной (клон 1162D3-EJ7). Е-кадхерин аккумулирован в точечных АК, плотные контакты не образуются (клон 1162D3-EI7).

в островки, межклеточные контакты в которых оставались стабильными в течение всего времени наблюдения (рис. 4). Относительное расположение клеток в островках практически не менялось. Нетрансформированные эпителиоциты были прикреплены к подлежащему субстрату, они образовывали псевдоподии на свободном крае, но смещения клеток по субстрату были незначительны. В течение 6 ч эпителиоциты IAR-2 сдвигались на 10–13 мкм.

Видеомикроскопическое исследование показало, что фибробластоподобные трансформированные эпителиоциты IAR1162 приобрели способность направленно перемещаться по двумерному субстрату. Клетки IAR1162 могли мигрировать по подложке индивидуально, а также могли зацепляться друг за друга и образовывать островки. Клетки IAR1162 в составе островков довольно легко разрывали межклеточные контакты, перемещаясь друг относительно друга, выходили из островков. Мы измерили скорости и пройденные расстояния трансформированных эпителиоцитов 1162D3, находящихся в контакте с соседними клетками, которые оказались существенно выше по сравнению с аналогичными показателями миграции одиночных клеток (рис. 5). Вместе с тем, мы не наблюдали направленных перемещений групп контактирующих клеток 1162D3 по субстрату (коллективной миграции).

При длительном видеомикроскопическом исследовании было обнаружено, что для трансформированных эпителиоцитов IAR1170, экспрессирующих Е-кадхерин, характерна асимметрия псевдоподиальной активности на свободном крае, что отличает их от нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2. Клетки IAR1170 в ходе наблюдения постоянно меняли области преимущественного образования псевдоподий. Эпителиоциты IAR1170 часто объединялись в островки, однако, в отличие от стабильных контактов нетрансформированных предшественников, межклеточные контакты трансформированных эпителиоцитов были нестабильными. Трансформированные эпителиоциты IAR1170 могли разрывать контакты с соседними клетками, могли менять положение в группе клеток, образующих островок, перемещаясь друг относительно друга. Эпителиоциты IAR1170 могли мигрировать по субстрату, как в составе группы клеток, так и индивидуально, образуя при встрече с другими клетками новые контакты (рис. 4).

Экспрессия экзогенного Е-кадхерина изменяла миграционные характеристики трансформированных эпителиоцитов IAR1162, утративших эндогенный Е-кадхерин в результате трансфекции онкогена *RAS*. Эти изменения затрагивали, главным образом, подвижность клеток, находящихся в контакте с другими клетками, и были связаны с уровнем экспрессии экзогенного Е-кадхерина в клетках. Скорость перемещений эпителиоцитов клона 1162D3-EK2, экспрессировавших высокий уровень Е-кадхерина (рис. 1В), резко уменьшалась (0.22 ± 0.01 мкм/мин – у клеток клона 1162D3 и 0.13 ± 0.01 мкм/мин у клеток 1162D3-EK2). Вместе с тем, клетки 1162D3-EK2, в отличие от эпителиоцитов 1162D3 находясь в контакте с другими клетками, могли мигрировать, не разрывая связей с этими клетками (коллективная миграция). Видеомикроскопические исследования показали, что средняя скорость движения клеток 1162D3-EP8 с меньшим уровнем экспрессии Е-кадхерина (рис. 1В), достоверно не отличалась от средней скорости движения клеток исходного клона 1162D3 (рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Ras-трансформация приводит к появлению у эпителиальных клеток IAR-2 локомоторной активности. Трансформированные эпителиоциты IAR1170, даже несмотря на сохранение в них эпителиального Е-кадхерина, приобрели способность мигрировать по подложке. Вместе с тем, высокий уровень экспрессии экзогенного Е-кадхерина в клетках клона 1162D3-EK2 замет-

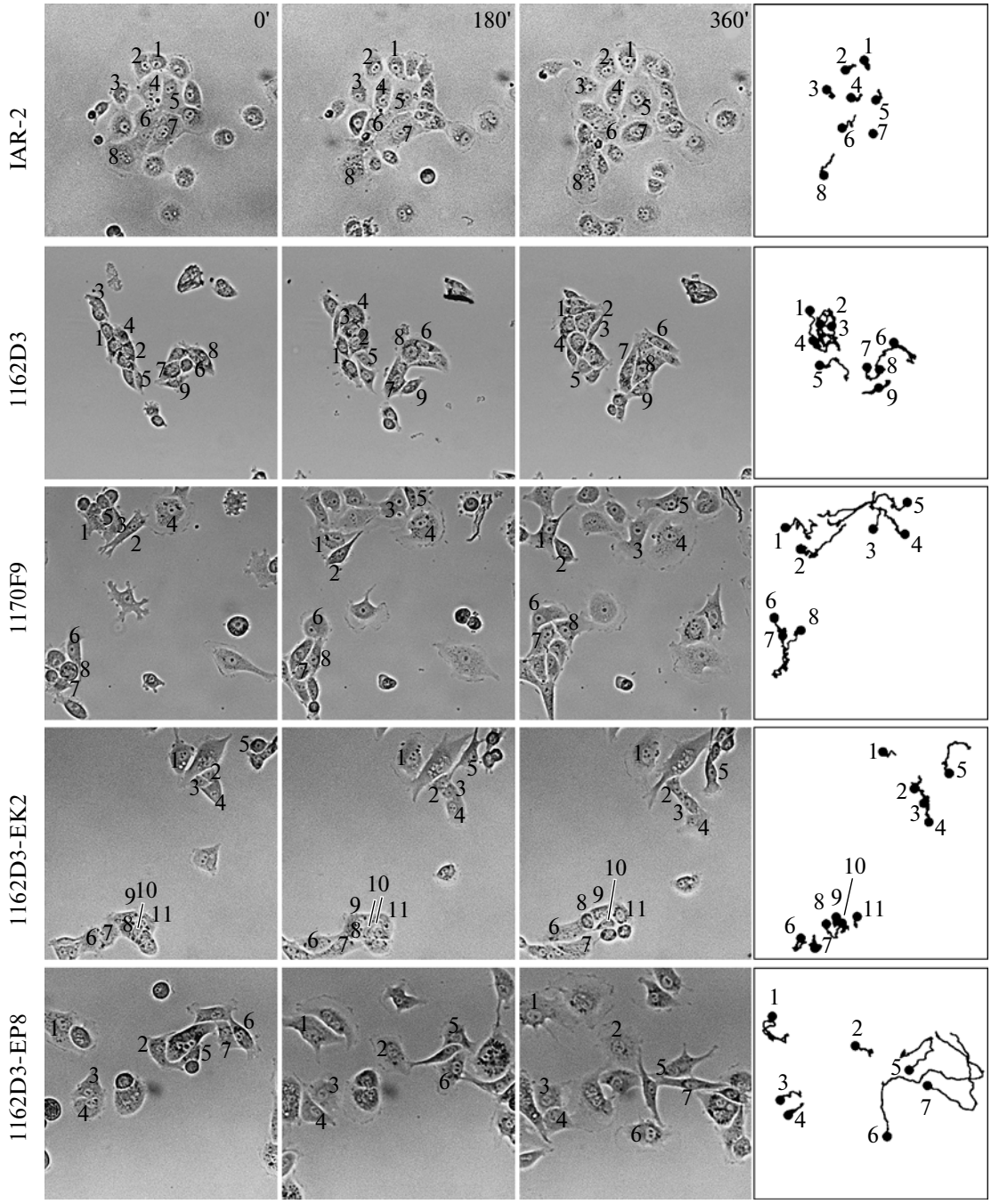


Рис. 4. Поведение нетрансформированных и трансформированных эпителиоцитов IAR в редкой культуре. Выбранные кадры из видеопоследовательностей. Траектории перемещений отдельных клеток, обозначенных цифрами, показаны справа (кружком обозначено конечное положение клетки после 6 ч наблюдения). Нетрансформированные эпителиоциты IAR-2 объединяются в островки. Контакты между клетками IAR-2 в островках стабильны, перемещения клеток незначительны. Трансформированные эпителиоциты IAR1170 и IAR1162 приобрели локомоторную активность. Межклеточные контакты трансформированных эпителиоцитов нестабильны. Клетки могут менять положение в островке, перемещаясь друг относительно друга (1162D3 – клетки 1, 2, 3, 4). Клетки, находившиеся в контакте, могут разрывать контакты и двигаться независимо друг от друга (1170F9 – клетки 1, 2, 5). Эпителиоциты 1170F9, экспрессирующие Е-кадхерин, в отличие от эпителиоцитов 1162D3, могут мигрировать по подложке в составе группы клеток (коллективная миграция) (1170F9 – клетки 6, 8). Клетки 1162D3-EK2 с высоким уровнем экспрессии экзогенного Е-кадхерина способны двигаться по подложке, оставаясь связанными друг с другом (1162D3-EK2 – клетки 2, 3, 4).

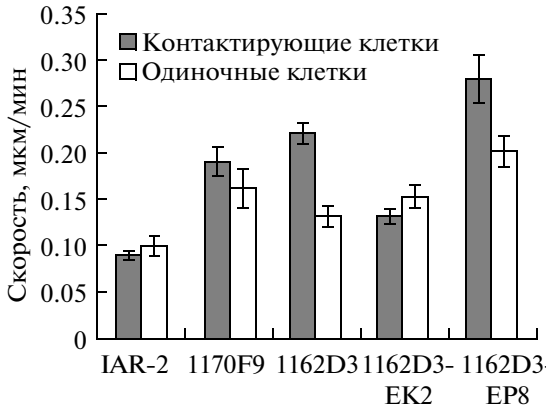


Рис. 5. Скорости перемещений нетрансформированных и трансформированных эпителиоцитов IAR в редкой культуре. Скорости движения индивидуальных клеток определялись после анализа в программе ImageJ положения ядер клеток в кадрах видеопоследовательностей, полученных каждые 15 мин в течение 6 ч.

но уменьшал их подвижность, что связано, по-видимому, с усилением межклеточной адгезии.

Миграционная активность нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2 и трансформированных эпителиоцитов IAR1170 и IAR1162. Миграционная активность нетрансформированных и трансформированных эпителиоцитов была также исследована в камерах с мембранами, имеющими поры диаметром 8 мкм. При подсчете количества клеток на нижней поверхности мембран были обнаружены принципиальные различия в поведении нетрансформированных и трансформированных эпителиоцитов: количество мигрировавших трансформированных клеток было существенно выше по сравнению с количеством нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2 (рис. 6). Наибольшая миграционная активность была характерна для трансформированных эпителиоцитов IAR1170, экспрессирующих E-кадхерин, – 1170F9, 1170D6 и 1170H5, среднее количество клеток в поле зрения составляло 70–100 клеток. Миграционная активность клеток IAR1162, утративших в результате трансформации E-кадхерин, была существенно ниже и не превышала 20–22 клеток в поле зрения. Клетки клонов 1162D3-EM5, 1162D3-EK2 и 1162D3-EJ7 с высоким уровнем экспрессии экзогенного E-кадхерина более эффективно, нежели клетки исходного клона, могли мигрировать через поры. Миграционная активность клеток клонов 1162D3-EI7 и 1162D3-EP8 была сравнима с миграционной активностью клеток исходного клона 1162D3, утратившего при трансформации E-кадхерин.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные указывают на возможность реализации при трансформации различных направлений морфологических изменений эпителиальных клеток, приводящих к одному и тому же результату, критическому для опухолевой прогрессии, – возникновению миграционного фенотипа у неподвижных, плотно сцепленных между собой эпителиальных клеток. В наших исследованиях мутантный онкоген RAS вызывал два типа морфологической трансформации эпителиоцитов IAR-2, сопровождавшихся появлением у эпителиальных клеток способности к направленному

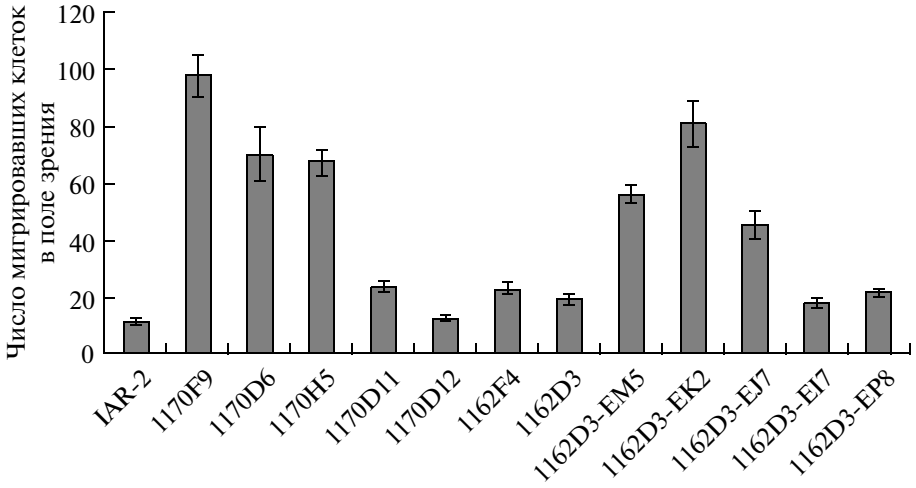


Рис. 6. Миграционная активность нетрансформированных эпителиоцитов IAR-2 и трансформированных эпителиоцитов IAR1170 и IAR1162. Клетки IAR-2 и клетки клонов IAR1170 и IAR1162 были рассеяны с плотностью 2×10^5 клеток/мл в миграционные камеры. Через 20 ч подсчитывали количество клеток, мигрировавших через поры диаметром 8 мкм на нижнюю поверхность мембран. Данные представлены в виде среднего значения количества клеток в поле зрения после подсчета клеток в 15 полях зрения в трех повторах ± ошибка среднего.

перемещению по подложке. Клоны одного типа (IAR1162) прошли эпителиально-мезенхимальный переход: утратили Е-кадхерин и плотные контакты, начали экспрессировать N-кадхерин, приобрели фибробластоподобную морфологию и локомоторную активность. Вместе с тем, в результате Ras-трансформации эпителиоцитов IAR-2 возникли также клоны трансформированных эпителиоцитов IAR1170, имевших морфологию, близкую к морфологии нетрансформированных предшественников и формировавших в густой культуре монослой. Клетки IAR1170 сохраняли экспрессию Е-кадхерина и могли образовывать плотные контакты. Тем не менее, несмотря на присутствие в клетках Е-кадхерина и возможность его включения в состав межклеточных адгезионных контактов, трансформированные эпителиоциты IAR1170, также как и клетки IAR162, приобрели высокую двигательную активность и могли направленно мигрировать как по плоскому субстрату, так и через узкие поры в мембранах миграционных камер.

Ранее, исследуя распределение GFP-Е-кадхерина, трансфицированного в клетки, мы обнаружили принципиальные изменения пространственной организации и динамики Е-кадхерин-содержащих АК у эпителиоцитов IAR-6-1, трансформированных химическим канцерогеном диметилнитрозамином (Ayollo et al., 2009). Мы предположили, что обнаруженное превращение тангенциальных поясов АК в радиальные АК (точки и штрихи), связано, прежде всего, с разрушением краевого актинового пучка при трансформации, что приводит к дефициту тангенциального натяжения в зоне межклеточного контакта, исчезновению контактного паралича у трансформированных эпителиоцитов и разрушению стабильной межклеточной адгезии. В настоящей работе, в Ras-трансформированных клетках IAR мы также обнаружили исчезновение краевого актинового пучка и реорганизацию тангенциальных АК в индивидуальные кластеры, что сопровождалось разрушением стабильной межклеточной адгезии. Сохранение Е-кадхерин-содержащих АК в трансформированных эпителиоцитах - IAR1170 не является препятствием для приобретения клетками локомоторной активности. Проведенные исследования продемонстрировали нестабильность Е-кадхерин-содержащих АК в группах клеток IAR1170, разрушение связи между клетками, миграцию клеток друг относительно друга. Таким образом, изменение пространственной организации Е-кадхерин-содержащих АК при неопластической трансформации, сопровождающееся разрушением краевого актинового пучка, угнетает стабильную межклеточную адгезию.

Вместе с тем, видеомикроскопические исследования показали, что трансформированные эпителиоциты IAR1170, имеющие Е-кадхерин-содержащие АК, могут перемещаться по подложке в составе группы, когда одна лидирующая клетка тянет за собой клетки, находящиеся с ней в контакте. Это движение цепочек и групп клеток, физически связанных друг с другом (коллективная миграция) *in vitro* описано для клеток опухолей, продолжающих экспрессировать Е-кадхерин (Friedl et al., 1995; Nabeshima et al., 1999). Направленное перемещение групп клеток задается активностью “лидирующих” клеток, имеющих поляризованную морфологию, высокую псевдоподиальную активность в отличие от более низкой подвижности клеток аръергарда. Предполагается, что различия между передними и задними клетками обусловлены, прежде всего, различиями в экспрессии на клетках поверхностных рецепторов к хемокинам, факторам роста, интегриновых рецепторов, асимметрией распределения в клетках зон полимеризации актиновых филаментов и сил в актомиозиновом кортексе, регулируемых малыми ГТФазами семейства Rho. Коллективная миграция клеток, ассоциированная с протеолизом и пенетрацией межклеточного матрикса, была описана также *in vivo* и рассматривается в качестве основного механизма диссеминации опухолевых клеток рабдомиосаркомы, карциномы полости рта, колоректальной карциномы, протоковой карциномы молочной железы и меланомы (Friedl, Gilmour, 2009).

В наших экспериментах трансфекция экзогенного Е-кадхерина в эпителиоциты IAR1162, утратившие экспрессию Е-кадхерина в результате Ras-трансформации, приводила к увеличению количества клеток, мигрировавших через поры в мембранах. Можно предположить, что коллективная миграция через узкие поры клеток, связанных Е-кадхерином в цепочки, более эффективна, нежели миграция одиночных разобщенных клеток. Между тем, при видео-микроскопическом исследовании поведения клеток на двумерном субстрате мы обнаружили снижение миграционной активности клеток клона 1162D3-EK2 с высоким уровнем экспрессии экзогенного Е-кадхерина. Существенное уменьшение скорости миграции в культуре 1162D3-EK2 было характерно для эпителиоцитов, контактирующих с соседними клетками, при этом клетки двигались более направленно. Трансфекция Е-кадхерина практически не влияла на локомоторную активность одиночных трансформированных клеток. Вместе с тем, в литературе имеются сообщения об угнетении миграционной и инвазивной активности трансформированных клеток в результате индукции экспрессии Е-кадхерина (Vleminckx et al., 1991; Mao et al., 2008). Очевидна необходимость дальнейших детальных исследований, которые могли бы прояснить причины различного влияния экспрессии Е-кадхерина в разных экспериментальных системах.

Мы также обнаружили, что трансфекция Е-кадхерина изменяет морфометрические характеристики трансформированных эпителиоцитов IAR1162, что указывает на его значение в качестве плейотропного регулятора фенотипа эпителиальных клеток. Морфометрический анализ показал резкое возрастание средней площади распластывания клеток на субстрате, снижение их элонгации и дисперсии при восстановлении экспрессии Е-кадхерина в трансформированных эпителиоцитах IAR1162. В лаборатории Вайнберга было обнаружено, что снижение экспрессии Е-кадхерина в результате трансфекции специфической shPHK, но не ослабление межклеточной адгезии при введении доминантно-негативного мутанта Е-кадхерина резко стимулирует миграцию и метастатическую активность Ras-трансформированных эпителиоцитов. Авторы считают, что формирование миграционного фенотипа и развитие метастатического потенциала у трансформированных клеток при угнетении экспрессии Е-кадхерина связано с активацией сигнальной функции β-катенина, изменением спектра специфических киназ и транскрипционных регуляторов (Onder et al., 2008).

Таким образом, проведенные нами исследования продемонстрировали участие Е-кадхерина в формировании фенотипа Ras-трансформированных эпителиоцитов IAR. Разрушение краевого актинового пучка и изменение пространственной организации АК, несмотря на наличие или отсутствие в них Е-кадхерина, сопровождается разрушением стабильной межклеточной адгезии и появлением локомоторной активности у Ras-трансформированных эпителиоцитов. Сохранение Е-кадхерина в АК влияет на локомоторную активность трансформированных эпителиоцитов и играет важную роль в их коллективной миграции.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 10-04-00664-а) и ФЦП Минобороны РФ (ГК № 16.512.11.2264).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ackland M., Newgreen D.F., Fridman M. et al. Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells // Lab. Invest. 2003. V. 83. P. 435–448.

Ayollo D.V., Zhitnyak I.Y., Vasiliev J.M., Gloushankova N.A. Rearrangements of the actin cytoskeleton and E-cadherin-based adherens junctions caused by neoplasic transformation change cell–cell interactions // PLoS ONE. 2009. V. 4. e8027.

Brabletz T., Jung A., Reu S. et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 8. P. 10356–10361.

Dunn G.A., Brown A.F. Alignment of fibroblasts on grooved surfaces described by a simple geometric transformation //J. Cell Sci. 1986. V. 83. P. 313–340.

Friedl P., Noble P.B., Walton P.A. et al. Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants *in vitro* // Cancer Res. 1995. V. 55. P. 4557–4560.

Friedl P., Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009. V. 10. P. 445–457.

Gillett C.E., Miles D.W., Ryder K. et al. Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast // J. Pathol. 2001. V. 193. P. 33–41.

Gloushankova N.A., Lyubimova A.V., Tint I.S. et al. Role of the microtubular system in morphological organization of normal and oncogene-transfected epithelial cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 8597–8601.

Hegerfeldt Y., Tusch M., Brocker E. et al. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, β1-integrin function, and migration strategies // Cancer Res. 2002. V. 62. P. 2125–2130.

Mao Q., Li Y., Zheng X. et al. Up-regulation of E-cadhenn by small activating RNA inhibits cell invasion and migration in 5637 human bladder cancer cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 375. P. 466–470.

Montesano R., Saint Vincent L., Drevon C. et al. Production of epithelial and mesenchymal tumours with rat liver cells transformed *in vitro* // Int. J. Cancer. 1975. V. 16. P. 550–558.

Nabeshima K., Inoue T., Shimao Y. et al. Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets // Histol. Histopathol. 1999. V. 14. P. 1183–1197.

Onder T.T., Gupta P.B., Mani S.A. et al. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways // Cancer Res. 2008. V. 68. P. 3645–3654.

Perl A.K., Wilgenbus P., Dahi U. et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma // Nature. 1998. V. 392. P. 190–193.

Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma // Histopathology. 2007. V. 50. P. 151–162.

Rosivatz E., Becker I., Specht K. et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer // Am. J. Pathol. 2002. V. 161. P. 1881–1891.

Steed E., Balda M.S., Matter K. Dynamics and functions of tight junctions // Trends Cell Biol. 2010. V. 20. P. 142–149.

Tarin D., Thompson E.W., Newgreen D.F. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 5996–6000.

Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression // Nat Rev Cancer. 2002. V. 2. P. 442–454.

Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y.J. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease // Cell. 2009. V. 139. P. 871–890.

Vleminckx K., Vakaet L. Jr., Mareel M. et al. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role // Cell. 1991. V. 66. P. 107–119.

Wheelock M.J., Shintani Y., Maeda M. et al. Cadherin switching // J. Cell Sci. 2007. V. 121. P. 727–735.

Wicki A., Lehembre F., Wick N. et al. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actir: cytoskeleton // Cancer Cell. 2006. V. 9. P. 261–272.

Wolf K., Wu Y.I., Liu Y. et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion // Nat. Cell Biol. 2007. V. 9. P. 893–904.

Yang J., Mani S.A., Donaher J.L. et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis // Cell. 2004. V. 117. P. 927–939.

Morphology, Cell–Cell Interactions, and Migratory Activity of IAR-2 Epithelial Cells Transformed with the *RAS* Oncogene: Contribution of Cell Adhesion Protein E-Cadherin

I. Yu. Zhitnyak and N. A. Glushankova

Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia
e-mail: natgtlu@hotmail.com

Abstract—The destruction of stable cell–cell adhesion and the acquisition of the ability to migrate are consistent stages of neoplastic evolution of tumor cells of epithelial origin. We studied the morphologic and migration characteristics of epithelial cells of IAR1162 and IAR1170 clones derived from a mixed culture of oncogene N-*RasV12*-transformed cell line IAR-2. It was found that the mutant oncogene *RAS* can cause two types of morphological changes in IAR-2 epithelial cells. Cells of one type (IAR1162 clones) underwent epithelial–mesenchymal transition: they stopped to express E-cadherin, acquired fibroblast-like morphology, and did not form tight junctions. Cells of the other type (IAR1170 clones) retained a morphology close to the morphology of nontransformed progenitor cells, formed E-cadherin-based adherens junctions and tight junctions, and formed a monolayer in confluent culture. However, in both IAR1162 and IAR1170 cells, the mutant oncogene *RAS* caused the destruction of marginal actin bundle and the reorganization of cell–cell adherens junctions. *RAS*-transformed IAR1162 and IAR1170 epithelial cells acquired the ability to migrate on a flat substrate as well as through narrow pores in membranes of migration chambers. A videomicroscopic study of transformed epithelial cell cultures demonstrated the instability of cell–cell contacts and the independent nature of cell migration. IAR1170 epithelial cells, which had E-cadherin-based adherens junctions, were also able to move as a group (collective migration). 1162D3 cells, which lost the ability to express endogenous E-cadherin as a result of Ras-transformation, were transfected with a plasmid carrying the *CDH1*. As a result of transfection, clones of cells with different levels of expression of exogenous E-cadherin were obtained. The high level of expression of exogenous E-cadherin in transformed epithelial cells led to a decrease in the rate of migration on a two-dimensional substrate of the cells that were in contact with neighboring cells but almost had no effect on the migration of single cells, at the same time increasing the number of cells that migrated through the pores in migration chambers. Thus, the destruction of marginal actin bundle and the change in the spatial organization of cell–cell adherens junctions, irrespective of the presence or absence of E-cadherin, was accompanied by destruction of stable cell–cell adhesion and the appearance of locomotor activity in Ras-transformed epithelial cells. The retaining of E-cadherin in cell–cell adhesion junctions affects the locomotor activity of transformed epithelial cells and plays an important role in their collective migration.

Keywords: transformed epithelial cells, actin cytoskeleton, cell–cell contacts, E-cadherin, migration

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 6, с. 465–480

ФИЗИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

УДК 591

СРЕДНЕЕ УХО МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2011 г. Г. Н. Солнцева

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
119071 Москва, Ленинский проспект, д. 33
E-mail: g-solntseva@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.06.10 г.
Окончательный вариант получен 28.09.10 г.

Среднее ухо млекопитающих характеризуется разнообразными структурными вариациями и широким спектром адаптационных преобразований, связанных с особенностями экологии вида, сохраняя общий основной принцип строения у большинства млекопитающих. У филогенетически далеких видов, но сходных по экологической специализации, возникают черты параллелизма в развитии отдельных элементов слуховых косточек, а также в способе их соединения между собой и прикрепления в барабанной полости. На пути адаптации к водному образу жизни у полуводных и водных видов появляются новые дополнительные структуры, несвойственные для исходных наземных форм. Использование эколого-морфологического подхода при изучении периферического отдела слуховой системы у млекопитающих с различной экологической специализацией в онтогенезе позволило установить, что особенности в ее строении у различных групп млекопитающих обусловлены приспособлением животных к конкретным акустическим свойствам среды обитания. Главными в эволюции являются морфофункциональные адаптации периферической слуховой системы, направленные на оптимизацию слуховой чувствительности в различных по физическим свойствам средах обитания. Адаптивные особенности в строении среднего уха водных видов появляются на ранних стадиях развития, несмотря на то, что развитие в утробе матери происходит без непосредственного влияния условий окружающей среды.

Ключевые слова: bulla tympanica, барабанная полость, молоточек, наковальня, стремя, барабанная перепонка, кавернозное сплетение, венозные синусы

Значительные успехи последних десятилетий в изучении слуховой системы, связанные с появлением принципиально новой акустической аппаратуры, привели к кардинальному пересмотру традиционных представлений о способах и значении звуковой сигнализации в мире животных. Работы в области биоакустики млекопитающих продемонстрировали необычайную значимость слуха для пространственной ориентации и коммуникации всех представителей этого класса.

В процессе эволюции произошли значительные изменения в развитии слуховой системы у ряда позвоночных животных. Морфологическая перестройка коснулась всех звеньев периферического отдела слуховой системы и, прежде всего, наружного и среднего уха как филогенетически наиболее молодых образований. Например, в среднем ухе вместо одной слуховой косточки, характерной для низших позвоночных – колумеллы, появляются три косточки: молоточек, наковальня и стремечко. Такая система слуховых косточек обеспечила млекопитающих специальной механической системой, способной увеличивать звуковое давление на мембрану овального окна внутреннего уха. Передача звукового давления из воздушной среды в жидкость улитки является наиболее эффективным приспособлением у млекопитающих в эволюционном плане.

В результате многолетних исследований слуховых и вестибулярных структур у наземных млекопитающих и человека накопился целый ряд фундаментальных работ, выполненных на морфологическом, электронно-микроскопическом и физиологическом уровнях.

Большие трудности в сборе эмбрионального материала по морским млекопитающим неизбежно приводили к тому, что органы слуха и равновесия большой группы млекопитающих долгое время оставались неизученными и выпадали из общей схемы изучения развития этих органов у млекопитающих в целом. Все это не давало ответа на многие вопросы, касающиеся структурной организации периферической слуховой системы у различных групп млекопитающих, и не позволяло установить общие закономерности развития периферической слуховой системы у млекопитающих в целом.

Наиболее важные данные относительно адаптивных и эволюционных изменений слуховой си-

стемы можно получить только путем сравнительных исследований эмбриогенеза этой системы у широкого набора видов, филогенетически близких, но с разной экологией, и филогенетически далеких, но со сходным образом жизни.

Задача настоящего исследования – выявление видовых и адаптивных особенностей в строении среднего уха у млекопитающих с различной экологией в пре- и постнатальном онтогенезе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В постнатальном онтогенезе были исследованы следующие виды млекопитающих: Insectivora (*Talpa europaea*); Chiroptera (*Rhinolophus ferrumequinum, Pipistrellus pipistrellus*); Rodentia (*Rattus norvegicus, Miocastor coypus, Cavia porcellus*); Cetacea (Odontoceti: *Tursiops truncatus, Delphinus delphis, Phocoena phocoena*; Mysticeti: *Balaenoptera acutorostrata, Balaenoptera physalus*); Carnivora (*Canis familiaris, Vulpes vulpes, Enhydra lutris, Mustela vison*); Pinnipedia (Otariidae: *Callorchinus ursinus, Eumetopias jubatus*; Phocidae: *Pagophilus groenlandicus, Phoca vitulina, Phoca insularis, Erignathus barbatus, Pusa hispida, Pusa caspica*; Odobenidae: *Odobenus rosmarus divergens*).

Для проведения сравнительно-эмбриологического анализа были исследованы представители наземных (Rodentia: *Rattus norvegicus*, *Cavia porcellus*; Artiodactyla: *Sus scrofa domestica*); воздушных (Chiroptera: *Rhinolophus ferrumequinum, Nictalus noctula*); полуводных (Otariidae: *Eumetopias jubatus*; Phocidae: *Pusa hispida*, *Erignathus barbatus*; Odobenidae: *Odobenus rosmarus divergens*) и водных млекопитающих (Odontoceti: (*Stenella attenuata*, *Tursiops truncatus*, *Delphinus delphis*, *Phocoena phocoena*, *Delphinapterus leucas*; Mysticeti: *Balaenoptera acutorostrata*).

Морфологический материал фиксировали 10% нейтральным формалином и фиксаторе Витмаака, обезвоживали в спиртах возрастающей крепости и заливали в целлоидин. Серийные срезы толщиной 10–15 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, а также по методам Маллори и Кульчицкого и импрегнировали солями азотнокислого серебра.

Для проведения сравнительного анализа был использован принцип сопоставления развивающихся структур на сравнимых стадиях с имеющимися данными по нормальному развитию лабораторных животных (Дыбан и др., 1975)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Периферический отдел слуховой системы млекопитающих включает три звена: наружное, среднее и внутреннее ухо.

Наружное и среднее ухо являются звукопередающим аппаратом. Звуковая волна проходит через наружное ухо, вызывая колебания барабанной перепонки. Эти колебания через цепь слуховых косточек передаются во внутреннее ухо, в котором механические колебания преобразуются в нервные раздражения.

Изучение среднего уха млекопитающих издавна привлекало внимание многих исследователей, поэтому в настоящее время существует ряд фундаментальных работ, посвященных сравнительно-анатомическому исследованию элементов среднего уха у представителей разных отрядов (Hyrtl, 1848; Doran, 1878; Denker, 1899; Bondy, 1907; Frey, 1911; Crowe et al., 1931; Wassif, 1948; Yamada, 1953; Webster, 1960; Werner, 1960; Hentzen, 1970; Ramprashad et al., 1973 и др.).

Среднее ухо млекопитающих представлено барабанной полостью (*cavum tympani*), которая евстахиевой трубой соединяется с полостью глотки, барабанной перепонкой (*membrana tympani*) и цепью слуховых косточек (*ossicula auditus*): молоточек (*malleus*), наковальня (*incus*) и стремя (*stapes*). К слуховым косточкам прикрепляются связки и две мышцы среднего уха (*m. tensor tympani, m. stapedius*). Мышцы барабанной полости регулируют передачу звуковой энергии и предохраняют внутреннее ухо от сверхинтенсивных звуков. Связки удерживают слуховые косточки в определенном положении.

Среднее ухо отделено от наружного барабанной перепонкой, натянутой на барабанное кольцо (*anulus tympanicus*). Барабанная перепонка образована тремя слоями. Ее основу составляют радиально и циркулярно направленные соединительнотканные волокна, которые в центре срастаются с периостом рукоятки молоточка (*manubrium mallei*), вправленной в перепонку. Барабанная перепонка изнутри покрыта слизистой оболочкой (*stratum mucosum*), образованной однослойным плоским эпителием, а снаружи – кожным покровом (*stratum cutaneum)*, лишенным волос, желез и сосочкового слоя. Барабанная перепонка имеет вид конуса с вершиной, обращенной в барабанную полость. На барабанной перепонке различают натянутую часть (*pars tensa*) и небольшой участок – ненатянутую часть (*pars flacida*), которая лишена основы, поэтому более подвижна.

Барабанную полость выстилает слизистая оболочка, в среднем слое которой располагаются кровеносные сосуды, от количества которых зависит толщина самой оболочки. Барабанная полость расположена между наружным слуховым проходом и лабиринтом внутреннего уха и отделена от этих образований тонкими мембранами. В барабанной полости различают 6 стенок: переднюю, в которой находится устье евстахиевой трубы, заднюю, имеющую отверстие, ведущее в *antrum mastoideum*, медиальную, верхнюю, латеральную, об-

разованную барабанной перепонкой, и дно. Медиальная стенка образована капсулой лабиринта и отделяет среднее ухо от внутреннего. В этой стенке располагаются овальное и круглое окна. Верхняя стенка имеет вид костной перегородки.

Слуховые косточки млекопитающих устроены более сложно, чем у представителей других классов наземных позвоночных. Молоточек дифференцирован на головку (*capitulum mallei*), шейку (*collum mallei*) и рукоятку (*manubrium mallei*). Головка несет суставную поверхность для соединения с наковальней. На медиальном крае рукоятки близ шейки располагается небольшой мускульный отросток (*processus muscularis*), который служит для прикрепления напрягателя барабанной перепонки. На дорзальном конце рукоятки прикрепляется короткий отросток (*pr. brevis*), а на дорзальном крае шейки – длинный отросток (*pr. longus*), который у большинства млекопитающих редуцируется до небольшого острого выступа (*pr. gracilis*), соединенного с помощью связки со стенкой барабанной полости. У других же видов длинный отросток сильно развит и жестко срастается со стенкой барабанной полости. К рукоятке молоточка прикрепляется m. tensor tympani, при сокращении которой барабанная перепонка втягивается внутрь и через систему слуховых косточек вдавливает стремя в овальное окно. Молоточек удерживается в определенном положении с помощью трех связок: передняя связка достигает *fissura Glasseri* и прикрепляется к *pr. anterior* молоточка, наружная связка располагается в области, противоположной шейке молоточка, аксиальная связка представляет собой ось, вокруг которой вращается молоточек.

Наковальня состоит из тела и двух отростков: длинного (*crus longum*) и короткого (*cr. breve*). Длинный отросток тянется параллельно относительно рукоятки молоточка. Нижний его конец изгибается, образуя сочленение со стременем с помощью *pr. lenticularis*. Короткий отросток располагается в костном углублении барабанной полости, где посредством связки соединяется с последней.

Стремя состоит из тела, образованного двумя дужками (*crura*) головки (*capitulum stapedius*) и подножной пластинки (*basis stapedius*). Головка стремени соединяется с *cr. longum* наковальни. Дужки образуют междужковое пространство. Подножная пластинка овальной формы и удерживается в овальном окне внутреннего уха с помощью кольцевидной связки. К головке стремени прикрепляется *m. stapedius*, которая лежит в области задней стенки барабанной полости.

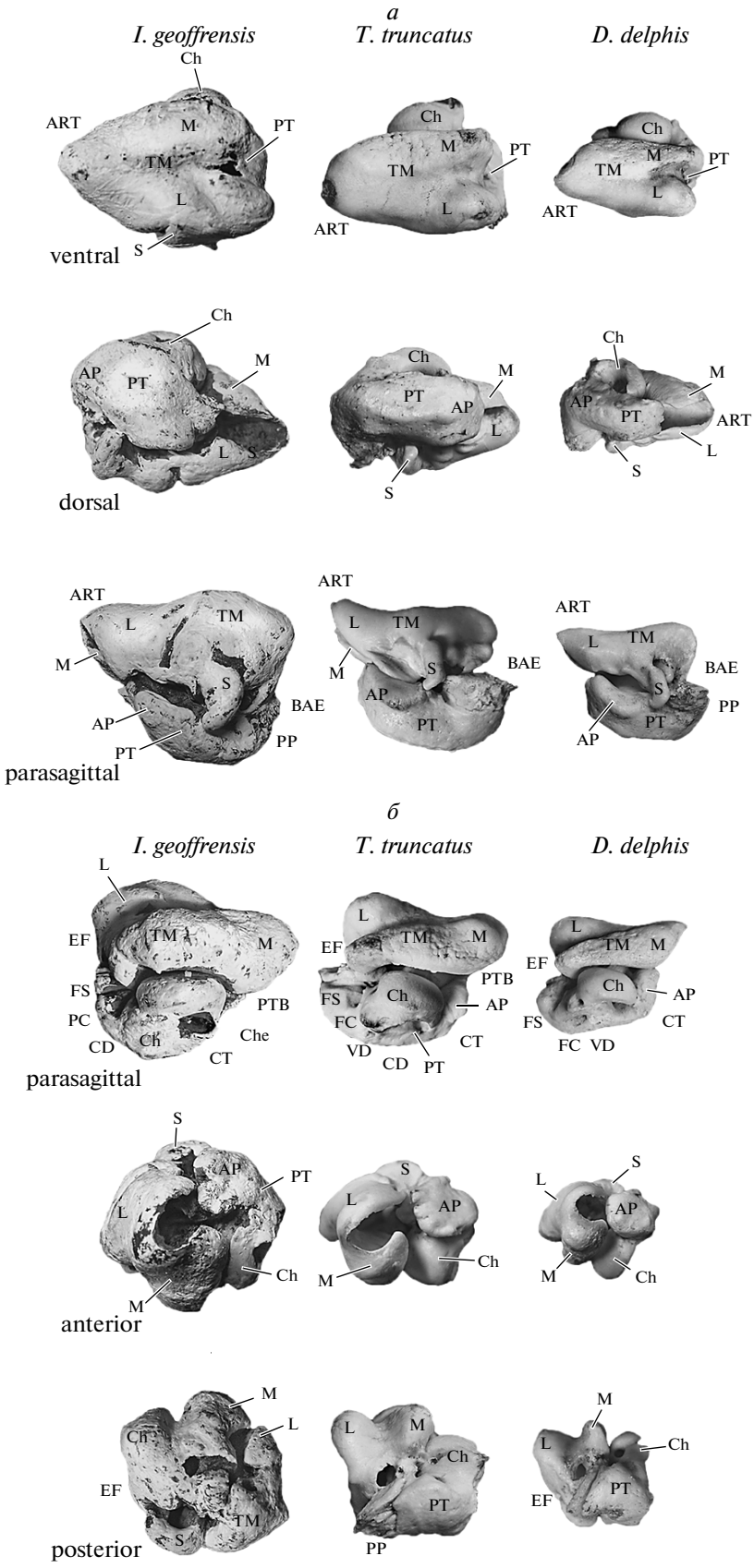
Обобщение результатов собственных и литературных данных позволило провести сравнительный анализ строения и топографии элементов среднего уха у млекопитающих, принадлежащих к разным отрядам.

Bulla tympanica млекопитающих представляет собой tympano-periotic (барабанно-околоушный) комплекс, который образован os tympanicum и os perioticum. Os tympanicum образован костными стенками, формирующими барабанную полость, в которой располагаются элементы среднего уха. В os perioticum располагается os cochlearis, в толще которой проходит улитковый канал. Толщина стенок os tympanicum резко меняется от вида к виду. Так у наземных и полуводных видов стенки os tympanicum утолщены по сравнению с такими водными млекопитающими, как зубатые китообразные. У усатых китов стенки os tympanicum резко гипертрофированы.

У представителей сем. *Delphinidae* bulla tympanica имеет уникальное строение, отличающее ее от других видов млекопитающих. Os tympanicum и os perioticum частично срастаются друг с другом в области pr. posterior, pr. sigmoid и pr. tubarius (добавочная косточка) (Kasuya, 1973; Pilleri, 1987; Oelschlager, 1990). У амазонского речного дельфина (*Inia geoffrensis*), в отличие от морских видов дельфинов (*Tursiops truncatus, Delphinus delphis, Phocoena phocoena, Stenella attenuata*) bulla tympanica образована толстыми костными стенками. Os tympanicum и os perioticum у речного дельфина относительно плотно прилегают друг к другу. У морских видов дельфинов bulla tympanica образована более тонкими и довольно хрупкими костными стенками. Расположение os tympanicum и os perioticum таково, что создает впечатление изолированности этих костей относительно друг друга (рис. 1).

Сравнительный анализ строения bulla tympanica у речного дельфина и морских видов дельфинов показал, что она построена по единому плану, характерному для всех представителей сем. *Delphinidae*, и имеет видоспецифические черты в строении у исследованных видов, связанные с особенностями их экологии.

Верхняя граница слухового восприятия, как и частота наилучшей чувствительности, у речного дельфина значительно ниже, чем у океанических видов дельфинов, поэтому в строении bulla tympanica этого вида отмечены некоторые особенности, которые, по всей вероятности, связаны с особенностями его экологии, т.е. функционированием органа слуха в условиях большой зашумленности и загрязненности среды. Под загрязненностью среды подразумевается перемешивание воды с воздушными пузырьками, частичками ила и песка, что значительно ухудшает процесс эхолокации в условиях реки, так как препятствует восприятию отраженных эхо-сигналов (Солнцева, 2009). Поэтому на дальних расстояниях эхолокационные сигналы могут затухать, не возвращаясь в слуховой приемник дельфина, что является одной


а
I. geoffrensis
T. truncatus
D. delphis
ventral
dorsal
parasagittal
б
I. geoffrensis
T. truncatus
D. delphis
parasagittal
anterior
posterior

из причин работы локационно-слухового аппарата речного дельфина на сравнительно небольших дистанциях при частоте наилучшей чувствительности порядка 20–60 кГц.

Bulla tympanica у дельфинов не срастается с черепными костями и соединена с ними посредством сухожильной связки. У зубатых и усатых китообразных в элементах, связывающих os perioticum с черепом, находятся многочисленные сесамоидные косточки, которые обеспечивают некоторую подвижность слуховой кости относительно черепа (Yamada, 1953).

В среднем ухе различных видов млекопитающих отмечается различная степень срастания bulla tympanica с костями черепа (Fraser, Purves, 1960). У большинства форм bulla tympanica срастается с черепными костями, принимая участие в образовании стенки черепа. Известно, что такое срастание может обеспечивать костную звукопроводимость (Kunze, Kietz, 1949).

Под влиянием звуковых колебаний движения костей черепа передаются на костный лабиринт внутреннего уха, а следовательно, и на перилимфу. У некоторых видов летучих мышей, грызунов (Fleischer, 1973) и зубатых китообразных этого не происходит за счет того, что bulla tympanica полностью отделена от костей черепа и соединена с ним подвижно посредством соединительной ткани. В результате такого соединения оба уха становятся независимыми приемниками и могут обеспечивать направленный прием акустических сигналов.

Изоляция bulla tympanica от костей черепа достигается тем, что она со всех сторон окружена синусами, заполненными пеной из жировой эмульсии. Пена состоит из мельчайших воздушных пузырьков, которые являются хорошим изолятором звука, в результате чего все звуковые колебания, которые идут с костей черепа, не доходят до внутреннего уха. Остается единственный путь к улитке – через наружное ухо и систему слуховых косточек (Fraser, Purves, 1960; Solntseva, 1995). Благодаря такому раздельному восприятию звука, т.е. каждым из слуховых приемников, для дельфинов характерен так называемый бинауральный эффект, который позволяет животным определять направление на звучащий объект (Kellogg, 1958). Кроме того, b. tympanica у зубатых китообразных с помощью мышц может совершать незначительные перемещения относительно черепа, за счет чего обеспечивается стереофонический (объемный) прием отраженных эхолокационных сигналов.

У большинства млекопитающих, в том числе и у *Soricidae*, в жестком соединении с черепом находится только *pars mastoidea*, в то время как большая часть b. tympanica соединена с черепом с помощью соединительной ткани.

У некоторых полуводных (калан, ластоногие) и водных (китообразные) форм в стенках барабанной полости располагаются венозные синусы, сконцентрированные, в основном, в костном отделе слухового прохода.

В зависимости от экологической специализации видов выделено несколько типов строения барабанных полостей (Симкин, 1977). Шаровидный тип характерен для видов, использующих ультразвуковую ориентацию и эхолокацию (лесные и домовые мыши, тушканчики, рыжие полевки, летучие мыши, китообразные, ластоногие). Губчатый тип слуховой полости встречается у видов, обитающих в условиях уплотненной среды (подземные и водные формы), или у обитателей твердого и каменистого субстрата (серые полевки, степные пеструшки, пищухи, ласки, горностаи). Камерный тип слуховой полости характерен для сусликов и сонь. При этом типе слуховая полость разделена тонкими костными перегородками на ряд незамкнутых камер. Крупноячеистый тип сходен с камерным и встречается у белок, бурундуков, сурков, куниц. Слуховая полость перегорожена слабо выраженными костными ребрами.

У большинства млекопитающих барабанная полость выстлана тонкой слизистой оболочкой за счет небольшого числа пронизывающих ее кровеносных сосудов. У форм, преимущественно обитающих в водной среде, слизистая оболочка барабанной полости сильно утолщена из-за обилия в ней кровеносных сосудов, пронизывающих ее средний слой. Кроме того, в барабанной полости дельфинов (Yamada, 1953), которые являются абсолютными гидробионтами, располагается кавернозное сплетение, состоящее из густой сети кровеносных сосудов.

У большинства млекопитающих барабанная перепонка округлой формы, слегка вытянута в конус и очень тонкая. Значительное утолщение барабанной перепонки происходит у полуводных и водных видов (рис. 2, 4). Барабанная перепонка дельфинов не связана непосредственно с рукояткой молоточка, как это имеет место у большинства

Рис. 1. Bulla tympanica у дельфинов *Inia geoffrensis* (1), *Tursiops truncatus* (2), *Delphinus delphis* (3) в проекциях: а – ventral; б – dorsal; в, г – parasagittal; д – anterior; е – posterior. PT – os perioticum; TM – os tympanicum; AP – передний отросток периотикума; Ch – кохлеарная часть периотикума; Chc – кохлеарный канал; S – сигмоидный отросток; BAE – костный отдел наружного слухового прохода; L – латеральная доля тимпаникума; M – медиальная доля тимпаникума; PTB – pr. tubarius; EF – элипсоидное отверстие; FS – углубление для m. stapedius; FC – кохлеарное окно; CD – латеральная часть кохлеарного протока; VD – латеральная часть вестибулярного протока; CT – crista transversalis; SL – sulcus lateralis; APT – передний отросток тимпаникума; PP – задний отросток тимпаникума.

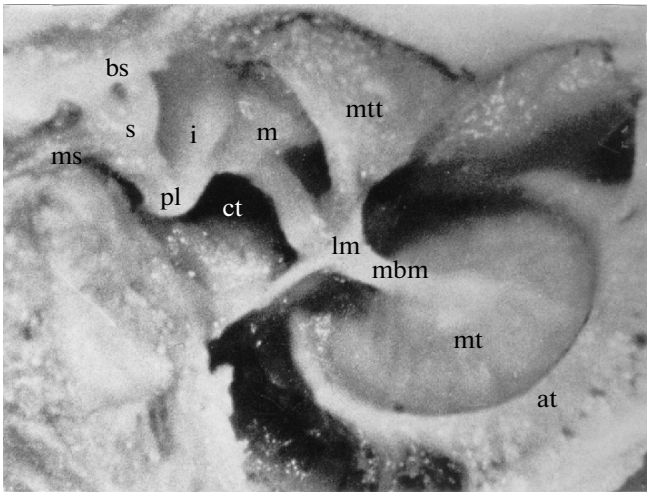


Рис. 2. Расположение структур среднего уха в барабанной полости у *Pagophilus groenlandicus*. Анатомический препарат. mt – барабанная перепонка; at – барабанное кольцо; mbm – рукоятка молоточка; m – молоточек; lm – связка молоточка; i – наковальня; pl – pr. lenticularis; s – стремя; bs – основание стремени; ms – m. stapedius; mtt – m. tensor tympani: ct – барабанная полость.

млекопитающих. Их соединение осуществляется посредством треугольной связки, асимметрично прикрепленной к округлой и очень толстой барабанной перепонке. У усатых китов барабанная перепонка состоит из двух частей: безволокнистого "перчаточного выроста", выступающего в полость наружного слухового прохода, и отходящей от него фиброзной связки, которая прикрепляется к цилиндрической рукоятке молоточка. Фиброзная связка усатых китов аналогична треугольной связке зубатых китообразных. Барабанная перепонка гладких китов по структуре и форме занимает как бы промежуточное положение между таковой *Balaenopteridae* и *Odontoceti* (Fraser, Purves, 1960).

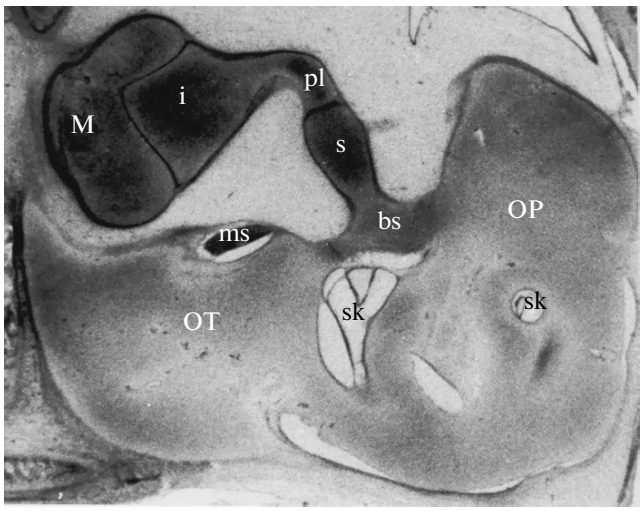


Рис. 3. Гистотопография среднего уха в дорсовентральных срезах головы у эмбриона *Delphinapterus leucas* (длина эмбриона 250 мм). Показано расположение слуховых косточек в полости среднего уха; молоточек и наковальня соединены между собой под прямым углом, что лишает их возможности совершать независимые друг от друга движения. M – молоточек; I – наковальня; S – стремя; pl – pr. lenticularis; bs – основание стремени; ms – m. stapedius; sk – полукружные каналы; OP – os perioticum; OT – os tympanicum.

Уменьшение поверхности барабанной перепонки наблюдается у форм, способных к эхолокации или ультразвуковой ориентации (землеройки, летучие мыши, некоторые виды ластоногих, китообразные).

Несмотря на то, что принцип организации слуховых косточек сходен у всех млекопитающих, у представителей различных экологических групп обнаруживаются характерные особенности строения (Солнцева, 1975, 1987). Структурные вариации проявляются в изменении размеров, формы элементов, весовом соотношении слуховых косточек, а также в способе их соединения и прикрепления в барабанной полости (рис. 3, 4, 5). У представителей различных отрядов отмечается срастание между молоточком и наковальней (нутрия, морской котик) (рис. 5Б). У большинства млекопитающих длинный отросток молоточка срастается со стенкой барабанной полости, а его форма значительно варьирует. У некоторых насекомоядных и летучих мышей хорошо развита *pars transversalis* молоточка; наковальня при этом небольшая, уменьшается суставная поверхность в области молоточко-наковальневого сочленения, pr. muscularis располагается в окципитальной части *pars transversalis*.

У различных представителей отряда грызунов, непарнокопытных и хищных длинный отросток молоточка уменьшается или совсем отсутствует (род *Cricetus, Rattus, Tapirus, Vulpes*). Одновременно для этих форм характерны хорошо выраженная *pars transversalis* молоточка, уменьшенная суставная поверхность между молоточком и наковальней. Хорошо развитая *pars transversalis* молоточка и увеличенная наковальня характерны для китообразных, у которых обнаруживается большая жесткость в соединении между молоточком и наковальней. Рукоятка молоточка китообразных редуцирована до округлого бугорка у зубатых и конического отростка у усатых китов. Увеличение рукоятки молоточка *Odontoceti* в отличие от *Mysticeti* происходит за счет мускульного отростка (Yamada, 1953).

У некоторых представителей подотряда парнокопытных и отряда хищных уменьшается *pars transversalis* молоточка, но увеличивается поверхность в области молоточко-наковальневого сочле-

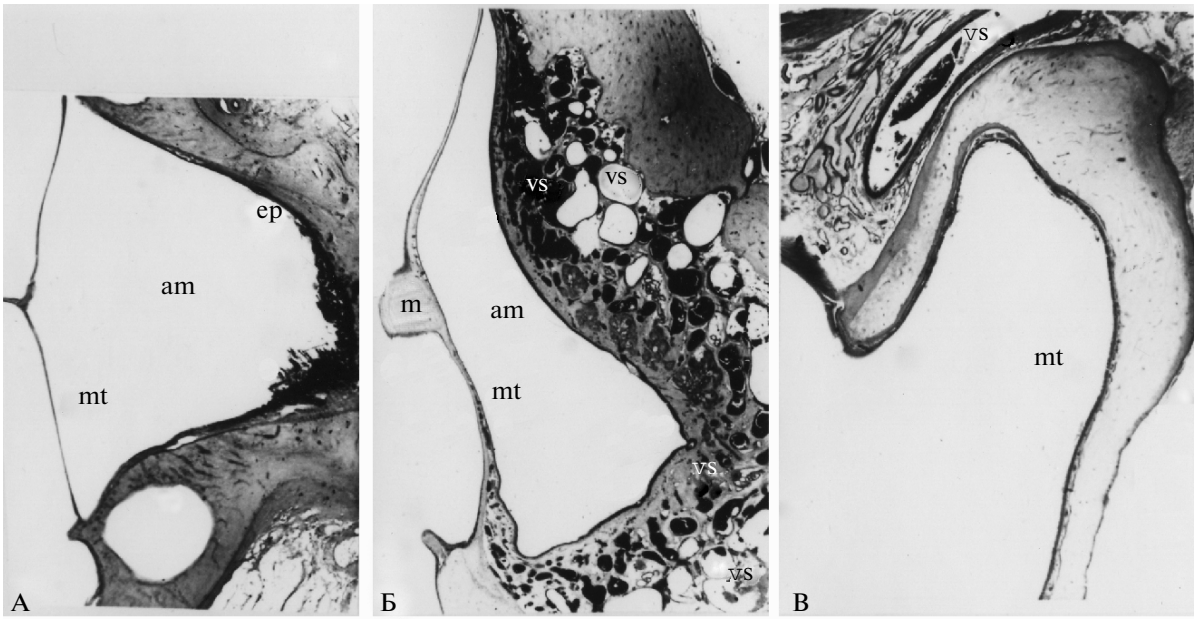


Рис. 4. Барабанная перепонка у различных видов млекопитающих. Гистологические препараты. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 25×. А – *Myocastor coypus*; Б – *Pagophilus groenlandicus*; В – *Tursiops truncatus*. mt – барабанная перепонка; am – полость наружного слухового прохода; ep – эпителий; m – молоточек; vs – венозные синусы.

нения и размер наковальни (*Martes, Sus*). Наковальня обнаруживает у различных млекопитающих вариации как в строении и величине самого тела, так и в топографии его отростков. У большинства млекопитающих длинный и короткий отростки наковальни располагаются под углом к телу наковальни. У настоящих тюленей они располагаются почти параллельно друг к другу. Резкое утолщение и удлинение длинного отростка наковальни отмечено у китообразных. У усатых китов почти редуцирован короткий отросток наковальни, что лишает наковальню опоры на стенке os tympanicum и дает основание предполагать, что у усатых китов наковальня может функционировать несколько иначе, чем у зубатых китов (Yamada, 1953).

Строение стремени обнаруживает значительное видовое разнообразие. У однопроходных стремя не дифференцировано на дужки и имеет вид столбика. Заметное сужение стремени характерно для крота и, особенно, для тенелюбов (Fleischer, 1973). Отсутствует дифференцировка стремени у зубатых китообразных (дельфины), в результате чего стремя приобретает вид конуса округлой формы. Стремя усатых китов дифференцировано на дужки, но междужковое пространство затянуто костной пластинкой. Головка стремени дельфинов без заметной шейки переходит в ножку овальной формы, которая расширена в основании и точно подогнана к овальному окну (Yamada, 1953). Такое расположение основания стремени в овальном окне дало возможность некоторым исследователям ошибочно говорить о прирастании стремени в овальном окне внутреннего уха у дельфинов (Hyrtl, 1845; Boenninghaus, 1903). У ластоногих и калана компактное и тяжелое стремя имеет сильно утолщенные дужки, образующие небольшое междужковое пространство. У ушастых тюленей (котик, сивуч) заметна некоторая дифференцировка стремени на дужки с полным отсутствием междужкового пространства. У всех мелких млекопитающих стремя хрупкое и легкое (*Suncus, Crocidura, Chiroptera, Microtus, Spalax*). У большинства млекопитающих стремя внутри полое. Основание стремени может быть плоским, вогнутым или овальным. Плоское основание имеют *Thylogale, Heliophobius, Loxodonta*. Вогнутое основание характерно для *Nyctalus, Tapirus.* Выпуклое основание имеют Cynocephalus, Microtus, Mustela, Procavia. Форма и размеры основания стремени также могут варьировать. У однопроходных, рукокрылых, китообразных (Odontoceti) основание стремени округлой формы. Очертание эллипса имеет основание стремени некоторых насекомоядных, приматов, грызунов и непарнокопытных (Fleischer, 1973).

Кроме анатомической перестройки слуховых косточек изменяются их весовые соотношения, особенно между молоточком и наковальней. Так, например, у лисицы, норки и нутрии вес молоточка в два раза превышает таковой наковальни. У калана, котика и сивуча весовые соотношения равны. У настоящих тюленей вес молоточка в 2–2.5 раза меньше такового наковальни. У зубатых китообразных вес молоточка превышает вес наковальни.

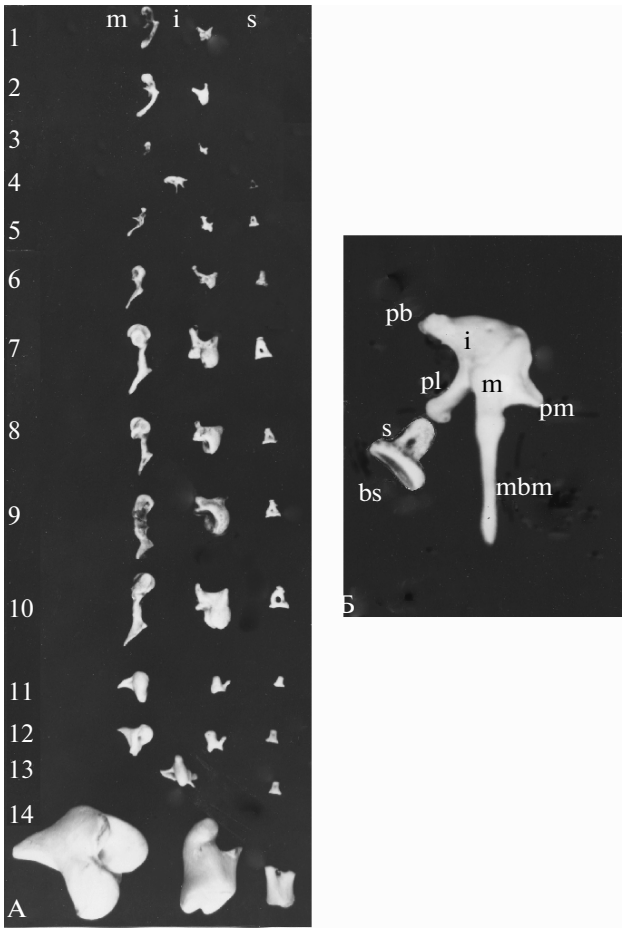


Рис. 5. Слуховые косточки у различных видов млекопитающих (А)

по вертикали – названия слуховых косточек, по горизонтали – вид животного. Увеличение 1.2×.

1 – обыкновенная лисица (*Vulpes vulpes*);
2 – обыкновенная собака (*Canis familiaris*);
3 – американская норка (*Mustela vison*);
4 – нутрия (*Myocastor coypus*);
5 – калан (*Enhydra lutris*);
6 – сивуч (*Eumetopias jubatus*);
7 – гренландский тюлень (*Pagophilus groenlandicus*);
8 – каспийский тюлень (*Pusa caspica*);
9 – ларга (*Phoca vitulina*);
10 – островной тюлень (*Phoca insularis*);
11 – обыкновенный дельфин (*Delphinus delphis*);
12 – афалина (*Tursiops truncatus*);
13 – морская свинья (*Phocoena phocoena*);
14 – финвал (*Balaenoptera physalus*);
Б – цепь слуховых косточек у *Callorchinus ursinus*.

Показаны элементы слуховых косточек и срастание между молоточком и наковальней в области молоточко-наковальневого сочленения.

На пути адаптации к водному образу жизни изменяются весовые соотношения слуховых косточек, которые проявляются в увеличении веса наковальни относительно молоточка. Изменяется относительная величина и форма отдельных элементов слуховых косточек. При этом происходит утолщение и расширение рукоятки молоточка (ластоногие) и ее редукция у китообразных, удлиняется pr. longus молоточка и cr. longum наковальни, а также уменьшается междужковое пространство стремени вплоть до полного его исчезновения у зубатых китообразных. Увеличивается жесткость в области соединения молоточка с наковальней.

У нелоцирующих млекопитающих строение среднего уха обнаруживает черты сходства, хотя строение барабанных полостей и слуховых косточек весьма варьирует. Для этого типа строения среднего уха характерно срастание bulla tympanica с костями черепа, утончение и заострение длинного отростка молоточка до его редукции и перехода в pr. gracilis, который эластично соединен со стенкой барабанной полости, а также увеличение суставной поверхности в области молоточко-наковальневого сочленения. Благодаря анатомической перестройке слуховых косточек с их особенностями в топографии сохраняется основной принцип звукопередачи среднего уха в различных средах обитания.

Для максимальной передачи энергии поступающего сигнала необходимо, чтобы удельное акустическое сопротивление среды было согласовано с удельным акустическим сопротивлением слухового приемника. Такое согласование достигается разнообразием в строении передаточного аппарата среднего уха в зависимости от среды, где происходит передача звуковой информации. В воде для оптимального принятия звуковых сигналов слуховой приемник должен обладать высоким модулем упругости, что обеспечивается жесткостью в соединении слуховых косточек между собой и их прикреплении в барабанной полости. Например, у северного морского котика молоточек и наковальня образуют единый молоточко-наковальневый комплекс, поскольку обе косточки прочно сращены между собой и функционируют как единое целое (Солнцева, 1987). Расширение диапазона в ультразвуковую область вызывает повышение резонансной частоты собственных колебаний слуховых косточек, а также увеличение упругости барабанной перепонки.

Помимо звукопроведения, среднее ухо млекопитающих выполняет и предохранительную функцию, уменьшая энергию поступающего сигнала во внутреннее ухо. Эта функция обеспечивается посредством сокращения мышц среднего уха: m. tensor tympani и m. stapedius, которые хорошо развиты у эхолоцирующих видов (дельфины, летучие мыши). Посредством натяжения барабанной перепонки и слуховых косточек мышцы среднего уха создают условия для проведения ультразвука, расслабление этих мышц предохраняет улитку от

сверхинтенсивных сигналов. Существует предположение, что мышцы среднего уха способны обеспечивать настройку слуховой системы на определенные частоты (Blair, 1964).

У животных, образ жизни которых связан с обитанием преимущественно в водной среде (калан, водные млекопитающие), в стенках барабанной полости располагаются венозные синусы, сконцентрированные вблизи барабанной перепонки. Венозные синусы рассматриваются как дополнительные образования, функциональное назначение которых заключается в выравнивании давления в барабанной полости при погружении на глубину (Tandler, 1899). Аналогичную функцию выполняет слизистая оболочка барабанной полости, которая в отличие от таковой наземных и некоторых полуводных форм, значительно утолщена за счет многочисленных кровеносных сосудов, расположенных в ее среднем слое.

У некоторых типично водных видов (дельфины) в барабанной полости располагается кавернозное сплетение, состоящее из густой сети кровеносных сосудов. Кавернозное сплетение, как и венозные синусы, рассматриваются в качестве дополнительных образований, способных изменять объем за счет наполнения их кровью, и тем самым выравнивать давление в полости среднего уха при заныривании животного на большую глубину (Solntseva, 1995).

Специального внимания заслуживает строение барабанной перепонки у различных млекопитающих. У наземных, воздушных и подземных форм барабанная перепонка очень тонкая, мягкая, округлой формы и несколько вытянута в конус. Подобное строение обнаруживает барабанная перепонка некоторых полуводных видов (норка, нутрия). У водных млекопитающих барабанная перепонка утолщена, а ее форма может оставаться округлой или овальной. Однако у представителя полуводных видов северного морского котика барабанная перепонка тонкая, но ее размеры значительно уменьшены, и она очень жестко закреплена на барабанном кольце, что увеличивает ее упругость и создает условия для передачи частот широкого диапазона, включая ультразвуки (Солнцева, 1998).

У китообразных барабанная перепонка сильно видоизменена. У усатых китов барабанная перепонка представлена “перчаточным выростом” с отходящей от него фиброзной связкой, которая прикрепляется к редуцированной рукоятке молоточка.

У зубатых китообразных барабанная перепонка сильно утолщена, жесткая и не имеет непосредственной связи с рукояткой молоточка. Их соединение осуществляется посредством треугольной связки, асимметрично прикрепленной к барабанной перепонке (Solntseva, 1990). При этом барабанная перепонка и связка образуют дополнительный рычаг, имеющий важное значение для усиления передачи звукового давления средним ухом под водой.

На пути адаптации к водному образу жизни увеличивается жесткость в соединении между молоточком и наковальней (калан, ластоногие). Черты параллелизма в строении и соединении слуховых косточек можно наблюдать у филогенетически далеких видов (нутрия, морской котик), у которых происходит срастание двух косточек в области молоточко-наковальневого сочленения. Подобная жесткость в соединении слуховых косточек у водных и эхолоцирующих видов создает возможность беспрепятственной передачи звуковых сигналов во внутреннее ухо, поскольку снижает потери звуковой энергии в сочленениях и связках, создавая тем самым оптимальные условия для прохождения звука. В отличие от качающейся системы слуховых косточек наземных форм, у водных и эхолоцирующих видов возникает упругая вибрационная система, способная после удара звуковой волны вновь принимать прежнее положение (Симкин, 1977).

В строении слуховых косточек различных видов млекопитающих существуют самые разнообразные структурные вариации. Однако в ряду, отражающем путь адаптации к водному образу жизни, прослеживается четкая тенденция к утолщению и укорочению рукоятки молоточка (калан, ластоногие) до полной ее редукции у китообразных, а также к удлинению и утолщению тонкого отростка молоточка. В строении наковальни обращает внимание удлинение и утолщение длинного отростка. В строении стремени резко уменьшается междужковое пространство вплоть до его полного исчезновения у дельфинов.

Слуховые косточки обнаруживают межвидовую изменчивость, которая проявляется в изменении размеров и формы как самих слуховых косточек, так и их отростков, в весовом соотношении слуховых косточек, а также в способе их прикрепления в барабанной полости. Сходный тип строения элементов среднего уха обнаруживают млекопитающие, обладающие высокочастотным слухом (землеройки, летучие мыши, крысы, китообразные, морской котик). Несмотря на внешние различия слуховых косточек этих животных, они имеют морфологическое сходство, которое выражается в удлинении, утолщении и видоизменении длинного отростка молоточка, его жестком соединении со стенкой барабанной полости, а также в увеличении жесткости в области молоточко-наковальневого сочленения.

Жесткость в соединении длинного отростка молоточка с os tympanicum дает возможность предположить (Künze, Kietz, 1949), что цепь слуховых

косточек у китообразных не функционирует, а проведение акустических сигналов обеспечивается посредством костной звукопроводимости. Вместе с тем было высказано мнение, что костная звукопроводимость невозможна вследствие изоляции bulla tympanica от костей черепа (Reysenbach de Haan, 1957). Кажущиеся неподвижными слуховые косточки китообразных способны передавать звуковые колебания во внутреннее ухо, что было подтверждено экспериментально (Fraser, Purves, 1960; Purves, 1966) и расчетным путем (Липатов, Солнцева, 1972).

Итак, при переходе к водному образу жизни выявляются следующие особенности в строении среднего уха: (1) изменение относительной величины и формы отдельных элементов слуховых косточек: утолщение рукоятки молоточка до полной ее редукции у китообразных; удлинение длинного отростка наковальни и уменьшение междужкового отверстия вплоть до его исчезновения у зубатых китов; (2) значительное увеличение жесткости в соединении между молоточком и наковальней; (3) изменение весовых соотношений в системе слуховых косточек; (4) резкое утолщение слизистой оболочки, выстилающей барабанную полость, за счет увеличения в ее среднем слое кровеносных сосудов; (5) относительное утолщение барабанной перепонки, особенно у китообразных, за счет развития элементов соединительной ткани; (6) развитие венозных синусов, сконцентрированных вблизи барабанной перепонки и в стенках, формирующих барабанную полость; (7) развитие кавернозного сплетения, характерного только для китообразных.

Для выявления акустических возможностей среднего уха была предпринята попытка провести анализ биомеханики этого звена в ряду от наземных к водным формам.

Сравнение полученных данных показывает, что у типичных представителей наземных (лисица, собака) и полуводных млекопитающих (норка, нутрия) среднее ухо имеет самый низкий коэффициент передачи звукового давления (25–29). У калана и ластоногих он увеличивается в 1.5–2 раза (40–60). У дельфинов среднее ухо имеет самый высокий коэффициент, который почти в 2.5–3 раза превышает таковой калана и ластоногих. Такое увеличение значения коэффициента передачи звукового давления у дельфинов, прежде всего, связано с наклоном оси вращения слуховых косточек и наличием дополнительного рычага в виде треугольной связки, асимметрично прикрепленной к выгнутой барабанной перепонке, что характерно только для дельфинов. Кроме того, большую роль играют и особенности в строении барабанной перепонки (значительное ее утолщение и большая упругость), позволяющие передавать всю поступающую на барабанную перепонку звуковую информацию (Липатов, Солнцева, 1972).

Биомеханические особенности среднего уха млекопитающих, образ жизни которых связан с обитанием преимущественно в водной среде, направлены на повышение коэффициента передачи звукового давления среднего уха. По всей вероятности, это и определяет эффективность работы периферического отдела слухового анализатора при ориентации млекопитающих в водной среде и значительно расширяет диапазон воспринимаемых ими частот.

Морфологические и биомеханические особенности среднего уха, несомненно, являются адаптивными и служат для передачи частот широкого диапазона.

Таким образом, среднее ухо млекопитающих характеризуется разнообразными структурными вариациями и широким спектром адаптационных преобразований, связанных с особенностями экологии вида, сохраняя общий основной принцип строения у большинства млекопитающих. У филогенетически далеких видов, но сходных по экологической специализации или по частотной настройке слуховой системы, возникают черты параллелизма в развитии отдельных элементов слуховых косточек, а также в способе их соединения между собой и прикрепления в барабанной полости. На пути адаптации к водному образу жизни у полуводных и водных видов появляются новые дополнительные структуры, несвойственные для исходных наземных форм.

ПРЕНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ СРЕДНЕГО УХА

Изучив особенности структурной организации среднего уха у представителей различных экологических групп в постнатальном онтогенезе, мы встали перед необходимостью проведения сравнительно-эмбриологического исследования этого звена периферической слуховой системы в пренатальном онтогенезе у представителей наземных, полуводных и водных форм, обладающих низко-средне- и высокочастотным слухом (Солнцева, 1982, 1983, 1985а, б, 1986а–в, 1988а, б, 1993).

Это позволило не только более подробно изучить структурные особенности среднего у исследованных видов, но и выяснить особенности его формирования в связи с акустическими свойствами среды их обитания, а также найти объяснение возникновению некоторых структурных адаптаций у полуводных и водных форм, определив их этапы формирования (Solntseva, 1992, 1999).

Впервые нами проведено сравнительно-эмбриологическое исследование среднего уха с использованием уникальных эмбриональных коллекций по ластоногим и китообразным, что позво-

лило более подробно изучить его структурную организацию, выявить черты сходства и различия в формировании его компонентов на разных стадиях развития, определить этапы формирования выявленных нами ранее структурных адаптаций и установить закономерности развития структур среднего уха у млекопитающих, принадлежащих к различным экологическим группам.

Результаты сравнительно-эмбриологического исследования показали, что развитие структур среднего уха у всех изученных видов происходит в раннем предплодном периоде, т.е. во время формирования хрящевого скелета, начиная с образования слухового пузырька (ст. 13) до завершения анатомического формирования основных структур (ст. 20) (Солнцева, 1983, 1985а, б, 1986а–в, 1988а, б, 1990).

Парный зачаток перепончатого лабиринта отмечен на стадии 2–3 пар сомитов (Wilson, 1914). В дальнейшем на стадии 6–9 пар сомитов образуется слуховая плакода (Kappers, 1941), а на стадии 14–15 пар сомитов образуется слуховая ямка, из которой на стадии 20 пар сомитов (почка передней конечности, ст. 13) развивается слуховой пузырек. На этой же стадии у всех исследованных видов обнаружена закладка слуховых косточек в виде сгущения мезенхимы.

Среднее ухо млекопитающих закладывается выпячиванием первого глоточного кармана, энтодерма которого преобразуется в общее трубо-барабанное выпячивание. Уже упоминалось, что закладка слуховых косточек у всех исследованных видов появляется на 13-й стадии в виде сгущения мезенхимы, и лежит она изолированно от закладки пирамиды височной кости.

На 15–16-й стадиях в закладке слуховых косточек выявляются их контуры (рис. 6). Барабанная полость на данной стадии представлена в виде узкого, слепого канала, лежащего ниже закладки слуховых косточек. Отмечена закладка барабанной перепонки.

На 17-й стадии в среднем ухе каждая из закладок слуховых косточек представляет собой уже самостоятельное образование, их основу составляет незрелая предхрящевая ткань. Барабанная перепонка у всех видов толстая и очень рыхлая. Увеличены размеры барабанной полости.

На 18-й стадии в среднем ухе отмечено формирование структурных элементов слуховых косточек, которые увеличены в размерах и погружены в глубь барабанной полости. В молоточке хорошо выражены головка, шейка, рукоятка (рис. 7–12). В наковальне сформированы тело и оба отростка (длинный и короткий). Стремя подразделено на дужки и основание. На данной стадии развития слуховые косточки настолько увеличены, что их размер лишь в 4.5–5 раз меньше того, который они

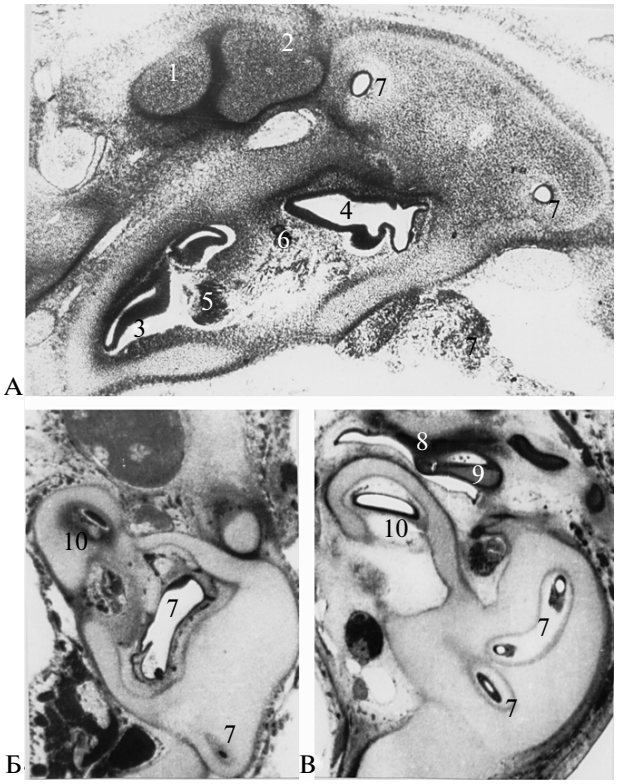


Рис. 6. Гистотопография периферического отдела слуховой системы в пренатальном развитии у предплода *Odobenus rosmarus divergens*, стадия 15. Слуховые косточки имеют четкие очертания, хорошо выражено молоточко- наковальневое соединение. Условные обозначения здесь и на рис. 7–12: 1 – молоточек; 2 – наковальня; 3 – улитковый канал; 4 – вестибулярный аппарат; 5 – кохлеарная ветвь слухового нерва; 6 – вестибулярная ветвь слухового нерва; 7 – полукружные каналы; 8 – барабанная перепонка; 9 – рукоятка молоточка; 10 – улитка; 11 – стремя; 12 – мозг; 13 – саккулюс; 14 – утрикулюс; 15 – наружный слуховой проход; 16 – стременная мышца; 17 – барабанная мышца; 18 – венозные синусы; 19 – кавернозное сплетение; 20 – слуховой нерв.

приобретают в дефинитивный период. Основу слуховых косточек составляет зрелая предхрящевая ткань, но уже в конце этой стадии отмечено замещение зрелой предхрящевой ткани эмбриональным гиалиновым хрящом. Процесс образования хрящевой ткани начинается в центре каждой закладки слуховых косточек, постепенно распространяясь на их периферию. Слуховые косточки окружены надхрящницей, которая состоит из мелких плоских клеток-хондробластов. Благодаря надхрящнице места соединений слуховых косточек хорошо выражены. На этой же стадии отмечено формирование особенностей, связанных с взаиморасположением слуховых косточек. Слуховые косточки изменяют свое положение в результате их поворота вокруг сагиттальной и фронтальной осей тела животного. Стремя располагается более

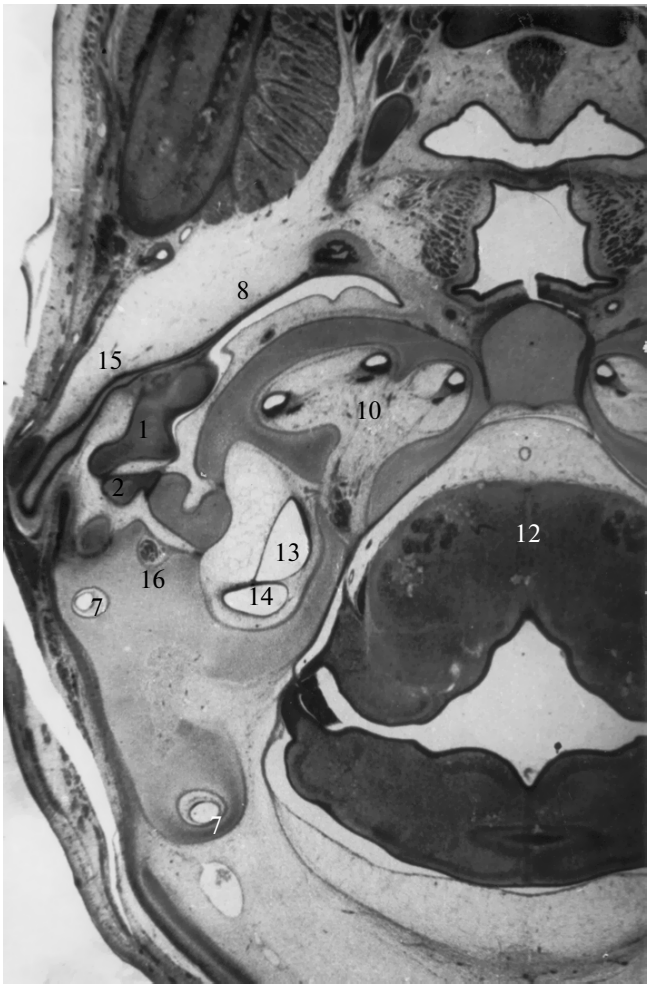


Рис. 7. Гистотопография периферического отдела слуховой системы у предплода *Sus scrofa domestica*, стадия 18. Показано расположение слуховых косточек в барабанной полости. Рукоятка молоточка по всей длине соединена с барабанной перепонкой, как и у других наземных видов.

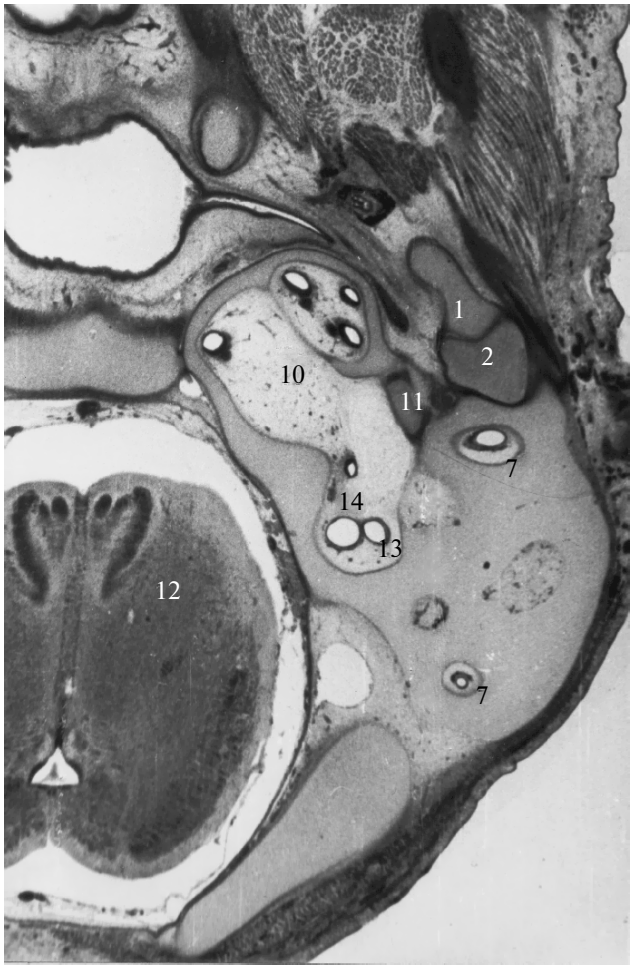


Рис. 8. Гистотопография периферического отдела слуховой системы у предплода *Eumetopias jubatus*, стадия 18. Слуховые косточка увеличены в размерах и дифференцированы на образующие их элементы.

каудально относительно молоточка и наковальни. В результате поворота подножная пластинка стремени оказывается расположенной каудально. Барабанная перепонка значительно утончена, имеет трехслойное строение и располагается почти горизонтально на латеральной поверхности полости среднего уха.

У зубатых и усатых китообразных барабанные перепонки-связки обнаруживают сходство в строении на сходных стадиях развития в раннем предплодном периоде, тогда как в плодном периоде их строение приобретает видоспецифические черты (Солнцева, 1983, 1985).

К концу 19-й стадии в среднем ухе продолжается формирование барабанной полости и начинается образование хрящевой ткани в слуховых косточках. Замещение зрелой предхрящевой ткани первичной хрящевой тканью происходит неодновременно у разных видов. Например, на данной стадии основу слуховых косточек у серой крысы по-прежнему образует зрелая предхрящевая ткань. У морской свинки процесс образования хрящевой ткани в молоточке закончился, в то время, как в наковальне и стремени этот процесс только начался. У летучих мышей, как и у крысы, слуховые косточки образованы зрелой предхрящевой тканью. У ластоногих созревание слуховых косточек происходит неодновременно. Раньше созревает молоточек, затем тело наковальни, в то время, как лентикулярный отросток наковальни и стремя образованы зрелой предхрящевой тканью. У китообразных, наоборот, в первую очередь хрящевая ткань образуется в стремени и наковальне, тогда как в молоточке ее образование только начинается. Однако у предплодов зрелорождающихся видов

Рис. 9. Гистотопография периферического отдела слуховой системы у предплода *Erignathus barbatus*, стадия 18. Молоточек и наковальня под прямым углом соединены между собой, что препятствует независимым движениям этих косточек относительно друг друга.

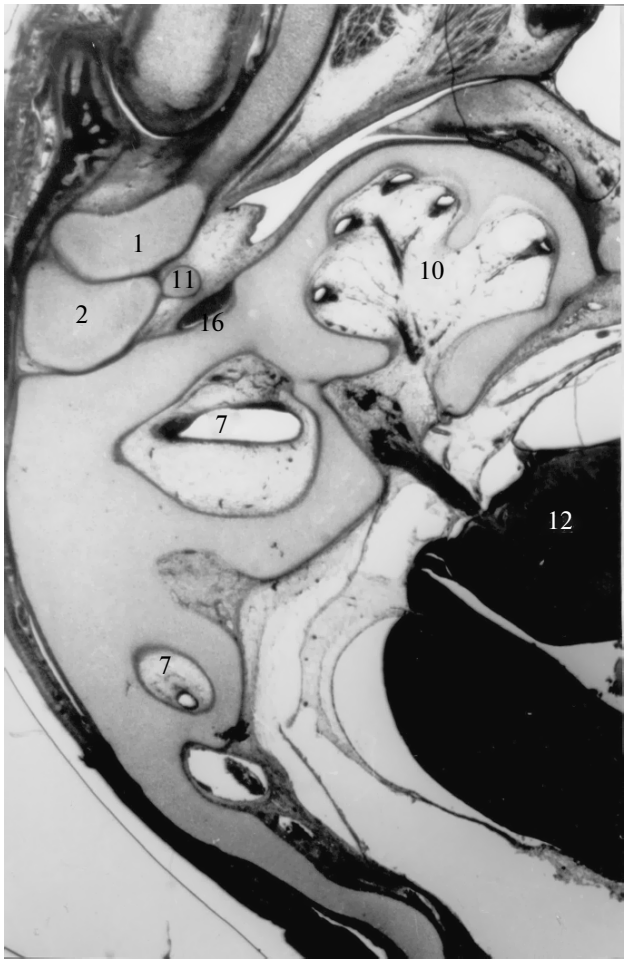


Рис. 10. Гистотопография периферического отдела слуховой системы у предплода *Odobenus rosmarus divergens*, стадия 18. Слуховые косточки массивные. Соединение между молоточком и наковальней сходно с таковым наземных видов, т.е. слуховые косточки способны совершать независимые движения относительно друг друга.

к ст. 20 замещение зрелой предхрящевой ткани эмбриональным хрящом полностью заканчивается.

На 20-й стадии в среднем ухе зубатых китов отмечено формирование кавернозного сплетения. В костном отделе слухового прохода у предплодов ластоногих и китообразных отмечено формирование венозных синусов. Развитие перибуллярных синусов, расположенных между черепной стенкой и b. tympanica, характерно только для китообразных. У зубатых китообразных (белуха) прослеживается отделение b. tympanica от черепа. Стадией 20 завершается вторая половина раннего предплодного периода. Закончился основной процесс формирования среднего уха (Solntseva, 1990, 1992, 1999).

Результаты сравнительного изучения развития периферического отдела слуховой системы у представителей различных экологических групп показали, что формирование у них структур среднего уха протекает в раннем предплодном периоде в сходной последовательности и приблизительно на сходных стадиях развития. Наибольшее сходство в формировании среднего уха млекопитающих отмечается в первой половине раннего предплодного периода. Видоспецифические особенности в структурной организации среднего уха формируются во второй половине раннего предплодного периода в зависимости от экологической специализации вида. Адаптивные особенности в строении среднего уха водных млекопитающих появляются на ранних стадиях развития, несмотря на то, что развитие в утробе матери происходит без непосредственного влияния условий окружающей среды (Солнцева, 1983, 1985а, б, 1986, 1988а, б, 1997, 1998).

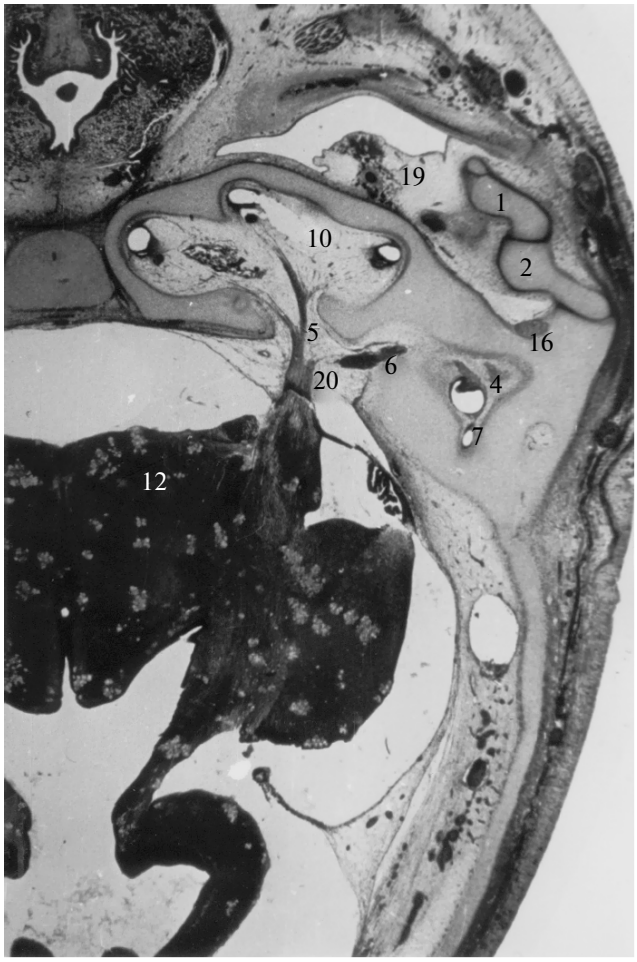


Рис. 11. Гистотопография периферического отдела слуховой системы у предплода *Stenella attenuata*, стадия 18–19. В барабанной полости отмечено формирование сосудистого (кавернозного) сплетения, характерного только для китообразных.

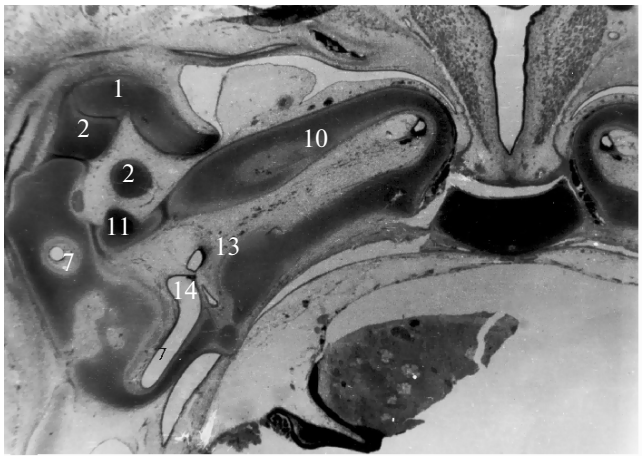


Рис. 12. Гистотопография периферического отдела слуховой системы у предплода *Balaenoptera acutorostrata*, стадия 18–19. Молоточек представлен массивным образованием относительно наковальни и стремени.

Использование эколого-морфологического подхода при изучении среднего уха у млекопитающих с различной экологической специализацией в онтогенезе позволило установить, что особенности в его строении у различных групп млекопитающих обусловлены приспособлением животных к конкретным акустическим свойствам среды обитания. Главными в эволюции являются морфофункциональные адаптации среднего уха, направленные на оптимизацию слуховой чувствительности в различных по физическим свойствам средах обитания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дыбан А.П., Пучков В.Ф., Баранов В.С. и др. Лабораторные млекопитающие: мышь *Mus musculus*, крыса *Rattus norvegicus*, кролик *Oryctolagus cuniculus*, хомячок *Cricetus griseous* // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 505–563.

Липатов Н.В., Солнцева Г.Н. Некоторые особенности биомеханики среднего уха дельфинов // Тезисы докл. V Всес. совещ. по изуч. морских млекопитающих. Махачкала, 1972. Ч. 2. С. 140–142.

Симкин Г.Н. Акустическая ориентация и общение млекопитающих // Автореф. дисс. .... доктора биол. наук. М., 1977. С. 1–37.

Солнцева Г.Н. Морфо-функциональные особенности органа слуха наземных, полуводных и водных млекопитающих // Зоол. журн. 1975. Т. 44. Вып. 10. С. 1529–1539.

Солнцева Г.Н. Ранний эмбриогенез периферического отдела слухового анализатора у представителя зубатых китообразных *Stenella attenuata* // Онтогенез. 1983. Т. 14. № 3. С. 312–318.

Солнцева Г.Н. Ранний эмбриогенез периферического отдела слухового анализатора представителя усатых китообразных (*Balaenoptera acutorostrata*) // ДАН СССР. 1985а. Т. 280. № 6. С. 1428–1432.

Солнцева Г.Н. Формирование периферического отдела слухового анализатора у представителя настоящих тюленей морского зайца (*Erignathus barbatus*) // ДАН СССР. 19856. Т. 286. № 4. С. 1504–1508.

Солнцева Г.Н. Ранний эмбриогенез периферического отдела слухового анализатора моржа (*Odobenus rosmarus divergens*) // ДАН СССР. 1986. Т. 283. № 4. С. 984–988.

Солнцева Г.Н. Направление эволюционных преобразований периферического отдела слухового анализатора у млекопитающих с различной экологией // Журн. Общ. Биол. 1987. Т. 158. № 3. С. 403–410.

Солнцева Г.Н. Морфологические адаптации периферического отдела слухового анализатора у эхолоцирующих китообразных в пре- и постнатальном развитии. ДАН СССР, 1988а. Т. 298. № 1. С. 219–224.

Солнцева Г.Н. Формирование периферического отдела слухового анализатора у представителя настоящих тюленей кольчатой нерпы (*Pusa hispida*) // ДАН СССР. 19886. Т. 302. № 6. С. 1489–1493.

Солнцева Г.Н. Сравнительно-морфологический анализ развития органа слуха у млекопитающих // Онтогенез. 1993. Т. 24. № 5. С. 62–79.

Солнцева Г.Н. Структурно-функциональная организация периферической слуховой системы афалины (Odontoceti: *Tursiops truncatus*) в пре- и постнатальном развитии // В кн.: Черноморская афалина. М.: Наука, 1997. С. 420–441.

Солнцева Г.Н. Структурно-функциональная организация периферической слуховой системы северного морского котика в пре-и постнатальном онтогенезе // В кн.: Северный морской котик. М.: Наука, 1998. С. 303–319.

Солнцева Г.Н. Сравнительно-морфологический анализ Bulla tympanica у речного (*Inia geoffrensis*) и черноморских дельфинов (*Tursiops truncatus*, *Delphinus delphis*) // ДАН. 2009. Т. 425. № 1. С. 1–5.

Blair S.F. Perceptual theories of middle ear muscle function // Ann. Otol. Rhinol.Laryngol. 1964. V. 73. № 3. P. 724.

Boenninghaus G. Das Ohr der Zahnwales, zugleich ein Beitrag zur Theorie der Schalleitung. // Zool. Jahrb., 1903. 19: 189–360.

Bondy G. Beitrage zur vergleichenden Anatomie des Gehororgans der Sauger (Tympanicum, Membrana Shrapnelli und Chordaverlauf.) // Anat. Hefte I, Abt. Wiesbaden. 1907. Bd. 35(H. 106). S. 293–408.

Crowe S.J., Hughson W., Witting E.G. Function of the tensor tympani muscles // Arch. Otolaryngol. 1931. V. 14. P. 5.

Doran A.H.G. Morphology Mammalian *Ossicula auditus* // Trans. Linnean Soc. London. 1878. V. 1. P. 371–497.

Denker A. Vergleichend-anatomische Untersuchungen uber das Gehororgen der Saugetiere nach Corrosionspraparaten und Knochenschnitten. Leipzig, 1899. P. 1–115.

Fleischer G. Studien am Skelett des Gehororgans der Saugetiere, einschliesslich des Menschen // Saugetierk. Mitt. 1973. V. 21. Ch. 2–3.: S. 131–239.

Fraser F.C., Purves P. E. Hearing in Cetaceans // Bul. Brit. Mus. Natur. Hist. Zool 1960. V. 7. № 1. P. 1–140.

Frey F. Vergleichend-anatomische Studien uber die Hammer-Amboss-Verbindung der Sauger // Anat. Hefte, I. Abt., Wiesbaden. 1911. Bd 44. Ch. 2–3. 132–134.

Hentzen E. Histology studies of the normal mucosa in the middle ear, mastotd cavities and Eastachian tube // Ann. Otol., Rhnol. and Laryngol. 1970. V. 79. № 4. P. 825–833.

Hyrtl J. 1845. Vergleichend-anatomische Untersuchungen uber des innere Gehororgan des Menschen an der Saugetiere. Prage, pp. 1–139.

Hyrtl J. Zur vergleichenden Anatomy der Trommelhohle // Abh. math. naturw. Cl. kais. Acad. Wiss. Wien. 1948. Bd. 1. S. 1–17.

Kappers A.C.U. Die vergleichende Anatomie des Nervensystems der Wirbeltiere und des Menschen. Haarlem, 1921. S. 1–2.

Kasuya T. Systematic consideration of resent toothed whales based on the morphology of tympano-periotic bone // Sci. Rep. Whales Res. Inst. Tikyo. 1973. V. 25. P. 1–103.

Kellogg W.H. Echo ranging in porpoise (Perception of objects by reflected sound is demonstrated for the first time in marine animals) // Science. 1958. 128 (3330): 982–988.

Künze W., Kietz H. Uber Horempfindungen in Ultraschallgebiet bei Knochenleitung // Arch. Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilk. 1949. Bd. 135. S. 683–692.

Oelschlager H.A. Evolutionary Morphology and Acoustics in the Dolphin Skull. In: Sensory abilities of cetaceans (Eds. Thomas, J.A. and Kastelein, R.A.) // Plenum Press, N.Y. 1990. P. 137–162.

Pilleri G. The Cetacea of the Italian Pliocene // Inst. of Brain Anatomy, University of Berne (Switzerland). 1987. P. 1–160.

Purves P.E. Anatomy and physiology of the outer and middle ear in Cetaceans.In: Whales, dolphins and porpoises. Ed. Norris K.S., Berkeley, Los Angeles. Univ. Calif. Press. 1966. P. 320–380.

Ramprashad F., Corey S., Ronald K. The harp seal, Pagophilus groenlandicus (Erxleben, 1777). XIV. The gross and microscopic structure of the middle ear // Canad. J. Zool. 1973. V. 51. № 6. P. 589–600.

Reysenbach de Haan F.W. Hearing in whales // Acta otolaryngol. 1957. V. 134. P. 1–114.

Solntseva G.N. Formation of an adaptive structure of the peripherat part of the auditory analyzer in aquatic echolocating mammats during ontogenesis. In: "Sensory abilities of cetaceans". N.Y.: Pienum Press,1990. pp. 363–383.

Solntseva G.N. Prenatal development of the peripheral part of the auditory system in mammals of different ecologies. In: "Marine Mammal Sensory Systems" (Eds. Thomas, J.A., Kastelein, R.A. and Supin, A.). Plenum Press, New York, 1992. pp. 179–195.

Solntseva G.N. 1995. The auditory organ of mammals in relation to the acoustic properties of the habitat and frequency tuning. In: "Sensory Systems of Aquatic Mammals". Woerden Netherlands: De Spil Publishers, pp. 455–475.

Solntseva G.N. Development of the auditory organ in terrestrial, semi-aquatic, and aquatic mammals. J. Aquatic Mammals, 1999. 25(3): 135–148.

Tandler J. Uber ein corpus cavernosum tympanicum beim Seehnd // Monatschr. Ohrenheilk. 1899. Bd. 33. № 10. S. 437–440.

Wassif K. Studies on the structure of the auditory ossicles and tympanic bone in Egyptian Insectivora, Chiroptera and Rodentia // Bull. Fac. Sci., Fouad I Univ., Cairo. 1948. V. 27. P. 177–213.

Webster D. Auditory significance of the hypertrophied mastoid bullae in Dipodomys// Anat. Rec. 1960. P. 136–299.

Werner Cl.F. Das Gehororgan der Wirbeltiere und des Menschen. Leipzig: Georg Thieme. 1960. P. 1–410.

Wilson J.T. Observations upon young human embryos // J. Anat. Physiol. 1914. V. 48. P. 315.

Yamada M. Contribution to the anatomy of the organ of hearing of Whales // Sci. Repts Whales Res. Inst. 1953. V. 8. P. 1–79.

The Middle Ear in the Ontogenesis of Mammals

G. N. Solntseva

Severtsov's Institute of Problems of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskii Prospekt 33, Moscow, 119071 Russia
e-mail: g-solntseva@yandex.ru

Abstract—The middle ear in mammals is characterized by structural variations and a broad spectrum of adaptive transformations related to peculiarities of species ecology, but it preserves the general basic principle of structure in most mammals. In species remote from a phylogenetic point of view but close in ecologic specialization, features of parallelism are observed concerning the development of separate elements of auditory ossicles as well as the way of their interconnection and attachment to the tympanic cavity. Along the way to the adaptation to the water lifestyle in semi-aqueous and aqueous species, new additional structures, not intrinsic to initial terrestrial forms, have been formed. The use of ecological and morphological approaches to research the peripheral division of the auditory system of mammals with different ecological specialization in the ontogenesis permitted us to reveal that peculiarities of its structure in different groups of mammals are preconditioned by the animals' adaptation to specific acoustic properties of their environment. Morphofunctional adaptations of the peripheral auditory system aimed at optimizing auditory sensitivity in the environments differing in physical properties are of great importance in evolution. Adaptive specific features in the structure of the middle ear in aqueous species appear at early stages of development in spite of intrauterine growth without the direct influence of environmental conditions.

Keywords: bulla tympanica, tympanic cavity, malleus, anvil, stirrup, eardrum, cavernous plexus, and venous sinuses

Сдано в набор 11.07.2011 г. Подписано к печати 14.10.2011 г. Формат бумаги $60 \times 88^{1}/_{8}$
Цифровая печать Усл. печ. л. 10.0 Усл. кр.-отт. 1.1 тыс. Уч.-изд. л. 10.0 Бум. л. 5.0
Тираж 103 экз. Зак. 1836

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