	Название статьи	Страницы	Цит.
	МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ		
☐	ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАННЕГО ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ПЛОДОВОЙ МУШКИ ДРОЗОФИЛЫ Суркова С.Ю., Гурский В.В., Райниц Д., Самсонова М.Г.	3-19	0
☐	ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ ДЕКОНДЕНСАЦИИ ХРОМАТИНА СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ТЕХНИКИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ Семенова Е.В., Филатов М.В.	20-29	0
	ФИЗИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ		
☐	ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ Вайсерман А.М., Войтенко В.П., Мехова Л.В.	30-50	9
☐	ОСВОБОЖДЕНИЕ CA^{2+} ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО ООЦИТОВ СВИНЕЙ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РОСТА Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И.	51-56	0
	КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ		
☐	СИНЦИТИАЛЬНЫЕ ПЕРФОРАЦИИ НЕЙРОНАЛЬНЫХ МЕМБРАН ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА Сотников О.С., Новаковская С.А., Соловьева И.А.	57-61	0
	ХРОНИКА		
☐	ПОГОНЯ ЗА КЛЕТОЧНЫМ БЕССМЕРТИЕМ, ТЕЛОМЕРЫ, ТЕЛОМЕРАЗА И МЕРА ЗДОРОВЬЯ (РАЗМЫШЛЕНИЯ В СВЯЗИ С ПРИСУЖДЕНИЕМ АЛЕКСЕЮ МАТВЕЕВИЧУ ОЛОВНИКОВУ ДЕМИДОВСКОЙ ПРЕМИИ В ОБЛАСТИ БИОЛОГИИ ЗА 2009 ГОД) Егоров Е.Е., Зеленин А.В.	62-66	0
	ЮБИЛЕИ		
☐	АЛЕКСАНДР ВЛАДИМИРОВИЧ ЗЕЛЕНИН (К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ) Бадаева Е.Д., Васецкий С.Г., Егоров Е.Е., Муравенко О.В.	67-68	0
	ПОТЕРИ НАУКИ		
☐	ПАМЯТИ ВЛАДИМИРА ИЛЬИЧА ИВАНОВА (1932-2010)	69-71	0

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 1, с. 3–19

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

УДК 574.24

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАННЕГО ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ПЛОДОВОЙ МУШКИ ДРОЗОФИЛЫ[1]

© 2011 г. С. Ю. Суркова[1], В. В. Гурский[2], Дж. Райниц[3], М. Г. Самсонова[1]

[1] *Отдел компьютерной биологии Центра перспективных исследований Санкт-Петербургского политехнического университета, 195251 Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29*

[2] *Физико-технический институт РАН, 194021 Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26*

[3] *Университет Чикаго, IL 60637-1546 Чикаго, США*

E-mail: surkova@spbcas.ru

Биологические организмы хорошо адаптируются к изменению внешних условий и устойчивы к потенциальным повреждениям, таким, как мутации. Эпигенетический механизм подавления фенотипической вариабельности в процессе развития получил название канализации. Данная работа представляет собою краткое обобщение результатов исследований, в которых экспериментальный и теоретический подходы были использованы для выяснения механизмов канализации вариабельности экспрессии генов сегментации.

Ключевые слова: биология развития, математическое моделирование, канализация развития, дрозофила, сегментация.

ВВЕДЕНИЕ

Биологические организмы хорошо адаптируются к изменению внешних условий и устойчивы к потенциальным повреждениям, таким, как мутации. Эпигенетический механизм подавления фенотипической вариабельности в процессе развития получил название канализации.

Гипотеза о канализации экспрессии генов в процессе развития была выдвинута в 40-х годах XX века известным британским ученым Конрадом Уоддингтоном (Conrad Waddington). В основу этой гипотезы легло наблюдение о том, что в отличии от мутантов, организмы дикого типа обладают способностью подавлять на уровне фенотипа как генетическую вариабельность, так и вариабельность, обусловленную влиянием окружающей среды (Waddington, 1942). Для объяснения этого факта Уоддингтон постулировал, что в организмах, подвергающихся естественному отбору, процессы развития обычно канализированы и что существует конечное число траекторий развития, названных им креодами (Waddington, 1962). Эти траектории регулируются таким образом, чтобы обеспечить один и тот же конечный результат, независимо от вариабельности условий развития. Т.е. каждый креод должен оставаться стабильным при наличии небольших возмущений (Waddington, 1940, 1957).

Метафорическим представлением явления канализации явился эпигенетический ландшафт Уоддингтона, где развивающаяся система представлена горным ландшафтом, состоящим из хребтов и долин, по которому катится шар (рис. 1). Выбор пути развития происходит в точках деления долин в результате действия генов. Каждая долина ландшафта соответствует совокупности сходных траекторий развития. Если шар несильно толкнуть в сторону горного склона, он вернется в ту же долину, где был до этого, но окажется в несколько другой точке, чем до толчка. Эта аналогия позволяет уяснить смысл канализации, которая заключается в том, что в результате воздействия различных факторов (внутренних и внешних, генетических и негенетических) траектория развития может претерпеть изменение, однако это не скажется на ходе онтогенеза. В отличии от гомеостаза, обозначающего стабильность состояния биологической системы, устойчивость путей развития системы Уоддингтон назвал *гомеорезом* (Waddington, 1957; Saunders, 1993).

В настоящее время существование буферизации генотипической вариабельности на уровне фенотипа доказано как теоретическими, так и экспериментальными исследованиями. Последние позволили обнаружить гены, ответственные за канализацию (Ruterford, Lindquist, 1998; Sollars et al., 2002). Однако модельные системы для изучения канализации до сих пор отсутствуют. Такие системы должны отвечать определенным требованиям. Во-первых, высокая вариабельность компонентов системы должна существенно уменьшаться в процессе развития. Во-

[1] Работа выполнена при финансовой поддержке грантов NIH RR07801, АФГиР RUB1-1578, РФФИ 08-04-00712-а, 08-01-00315-а, 10-01-00627-а.

Рис. 1. Эпигенетический ландшафт Уоддингтона. Шар, катящийся по горному склону, является метафорическим представлением клетки. Долины изображают "креоды", или совокупности сходных траекторий в пространстве состояний. Выбор пути развития происходит в точках деления долин в результате действия генов. Рисунок сделан на основе фотографии склона Монблан (© А.М. Самсонов).

вторых, подобное уменьшение вариабельности должно быть собственным свойством системы и не быть обусловленным воздействием других систем организма или внешних факторов.

Система генов сегментации у дрозофилы (Akam, 1987) полностью отвечает этим двум требованиям. Во-первых, естественным свойством этой системы является уменьшение фенотипической вариабельности в ходе развития (Surkova et al., 2008). Таким образом, в систему не нужно вносить искусственные возмущения для изучения буферизации вариабельности. Кроме того, для этой системы получены высокоточные количественные данные по экспрессии генов сегментации во времени и пространстве (Суркова и др., 2008). Детальный анализ этих данных показал, что экспрессия зиготических генов сегментации у индивидуальных эмбрионов высоко вариабельна в цикле 13 и раннем цикле 14A. Эта вариабельность проявляется в изменчивости уровней экспрессии генов, вариабельности порядка, типа и времени формирования индивидуальных областей экспрессии, а также в вариабельности положения этих областей. Все эти типы вариабельности канализируются в конце цикла 14A, перед началом гаструляции в стабильные картины экспрессии, обладающие значительно меньшей вариабельностью (Surkova et al., 2008). Уменьшение вариабельности перед гаструляцией имеет важное биологическое значение, т.к. картины экспрессии генов *wingless* и *engrailed*, которые определяют позиции первичных компартментов тела дрозофилы (парасегментов), имеют ширину всего лишь в одно ядро. и являются мишенями зиготических генов gap и pair-rule.

Из всех типов вариабельности зиготических генов сегментации наибольший интерес представляет вариабельность положения границ областей экспрессии. Канализация вариабельности положения этих границ прежде всего выражается в том, что высокая вариабельность экспрессии материнского гена *bicoid* (*bcd*) в несколько раз уменьшается на уровне экспрессии зиготических генов gap и pair-rule, регулируемых Bcd. Экспрессия *bcd* представляет собой антеропостериорный градиент, большое количество экспериментальных данных свидетельствуют о том, что Bcd является морфогеном (Driever, Nusslein-Volhard, 1988). В простейшем представлении модели французского флага, границы областей экспрессии генов-мишений должны формироваться в позициях фиксированных пороговых концентраций этого морфогена (Wolpert, 1969). Вопрос о механизмах уменьшения, или фильтрации вариабельности Bcd на уровне генов-мишеней оставался открытым.

Из всех границ областей экспрессии генов-мишеней Bcd наибольшее внимание исследователей было уделено низкой вариабельности задней границы антериорной области экспрессии гена *hunchback* (*hb*) (Houchmanzadeh et al., 2002, 2005; Gregor et al., 2007a; Hardway et al., 2008; He et al., 2008) (рис. 2д, е).

Однако, в большинстве случаев, *hb* рассматривался исключительно как мишень Bcd, без учета его взаимодействий с другими зиготическими генами. Это некорректно, т.к. положение его границы смещается у эмбрионов, мутантных по *giant* (*gt*), *Kruppel* (*Kr*), *Kr;kni* и у эмбрионов с отсутствием белка Nanos (Houchmanzadeh et al., 2002, Clyde et al., 2003). Таким образом, чтобы выявить механизмы канализации позиционной вариабельности в системе сегментации, необходимо принимать во внимание все генные взаимодействия, обеспечивающие формирование паттерна во времени и пространстве.

Данная работа представляет собою краткое обобщение результатов наших исследований, в которых экспериментальный и теоретический подходы были использованы для выяснения механизмов канализации вариабельности экспрессии генов сегментации (Surkova et al., 2008; Manu et al., 2009a, b). В качестве теоретического подхода в этих работах использовали математическое моделирование. Математическое моделирование позволяет реконструировать механизмы регуляции *in silico* и доказать достаточность найденных регуляторных механизмов без проведения экспериментов по реконструкции системы *ab initio*. Другой важной особенностью математического моделирования является его способность проследить *in silico* динамику вкладов всех регуляторов в регуляцию каждого гена исследуемой биологической системы. Современные экспериментальные методы не позволяют получить такую информацию в одном эксперименте: обычно информацию о функции гена в системе получают по результатам инактивации его при мутациях, а структура сети генов реконструируется на основании большого количества подобных экспериментов.

Важно подчеркнуть, что концепция эпигенетического ландшафта Уоддингтона появилась под влиянием теории динамических систем, в наибольшей мере связанной с именем Анри Пуанкаре (Henri Poincare). Динамическая система составляет систему связей, описывающую эволюцию переменных системы во времени и их зависимость друг от друга. В каждый момент времени система может быть представлена одной точкой в многомерном пространстве состояний (фазовом пространстве), оси которого представляют значения каждой из переменных системы. Каждая точка в пространстве состояний ассоциирована с вектором, представляющем направление и скорость эволюции системы, начиная с этой точки. Несколько изолированных точек будут являться “аттракторами”, к которым система будет двигаться спонтанно с течением времени (Thom, 1983). Состояния аттрактора локально стабильны относительно небольших возмущений системы, и по этой причине было предложено, что конечные типы клеток являются аттракторами. Эпигенетический ландшафт Уоддингтона – это метафорическое представление динамической системы, в которой оси – это концентрации всех субстанций, или всех генных продуктов в клетке. Все клетки эмбриона будут развиваться в соответствии с теми же законами, но из-за разницы в индуцирующих сигналах, клетки в разных частях организма будут следовать разным траекториям развития, и в результате придут к разным аттракторам, которые представляют собой разные состояния окончательной дифференцировки (Slack, 2002).

Таким образом, аттрактор – своего рода качественное свойство, которое может объяснить стабильность траекторий развития, а следовательно, и явление канализации. Анализ системы генов сегментации как динамической системы, выполненный в работе Manu et al., 2009b, позволяет рассматривать канализацию вариабельности как результат действия аттракторов в фазовом пространстве концентраций генных продуктов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Количественные данные по экспрессии генов

Для изучения механизмов канализации в системе генов сегментации было использовано около 1600 эмбрионов дрозофилы дикого типа (Oregon R), находящихся на стадии бластодермы. В эмбрионах методом непрямого иммунофлуоресцентного маркирования окрашивались белковые продукты 14-ти генов сегментации: *bcd, caudal (cad), Kr, kni, tailless (tll), giant (gt), hb, even-skipped (eve), fushi tarazu (ftz),odd-skipped (odd), hairy (h), runt (run), paired (prd)* и *sloppy paired (slp)* (Kosman et al., 1998; Surkova et al., 2008).

Двойные мутанты по генам *Kr* и *kni* (*Kr;kni*) были получены путем скрещивания одиночных мутантов Kr^1 и *Df*(3L)ri-79c. Мутантные эмбрионы прокрашивали для выявления экспрессии *hb* и *gt*.

Цифровые изображения картин экспрессии генов мы получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP2, уровни сигнала настраивали в соответствии со шкалой 0–255 для обеспечения максимального динамического диапазона без эффекта насыщения (Janssens et al., 2005; Surkova et al., 2008).

Количественные данные по экспрессии генов получали с помощью методов и программ, описанных в ранее опубликованных работах (Myasnikova et al., 2001; Janssens et al., 2005; Суркова и др., 2008; Kozlov et al., 2009). Обработка изображений включала в себя (1) сегментацию изображений, (2) удаление фонового сигнала, (3) временную классификацию эмбрионов, (4) регистрацию изображений, (5) усреднение данных по временным классам для получения интегрированных, или эталонных данных по экспрессии каждого гена.

Поскольку гены сегментации действуют по большей части независимо от генов, контролирующих полярность эмбриона вдоль дорсовентральной оси (Carroll et al., 1987; Zeitlinger et al., 2007), корректным является рассмотрение экспрессии этих генов в од-

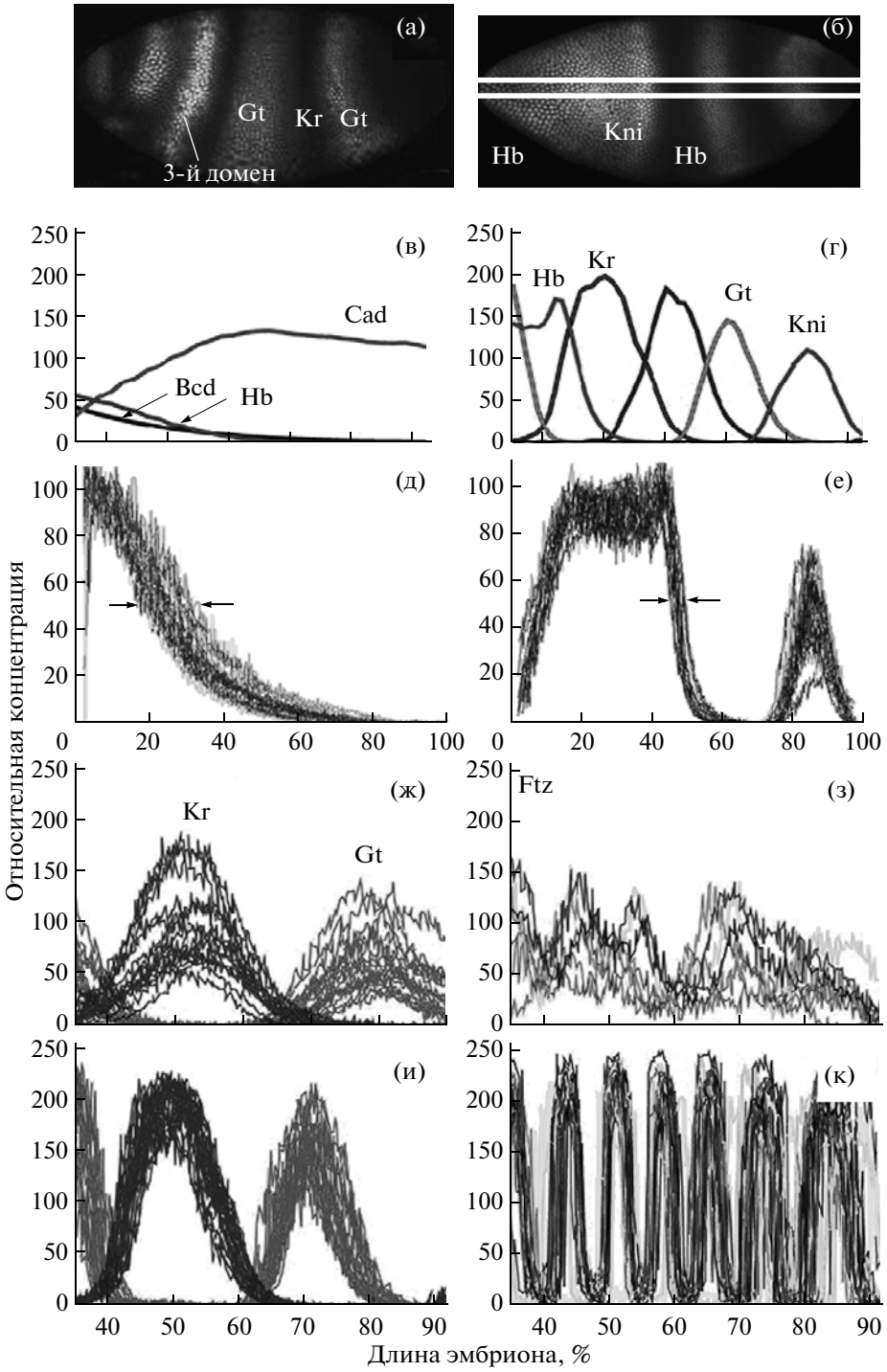


Рис. 2. Изображения картин экспрессии генов сегментации и одномерные количественные данные. (а, б). Изображения картин экспрессии gap генов *Kr* и *gt* (а), *hb* и *kni* (б) во временном классе 8 (~3 мин до начала гаструляции). На рис. (а) белой стрелкой показан третий домен экспрессии Gt, белые полосы на рис. (б) обозначают 10% полосу в направлении А–П, из которой извлекались одномерные количественные данные. Антериорный конец эмбриона находится слева, дорсальная сторона сверху. (в, г). Одномерные усредненные количественные данные для материнских градиентов Bcd (цикл 13), Hb (цикл 12) и Cad (цикл 12) (в). Усредненные количественные данные по экспрессии генов gap во временном классе 8 (г). (д, е). Фильтрация вариабельности градиента Bcd на уровне его гена-мишени *hb*. Показаны 43 картины экспрессии Bcd (д) и 19 картин экспрессии гена *hb* в цикле 14А (е). Размах А–П позиций пороговых концентраций показан стрелками. (ж–к). Уменьшение вариабельности картин экспрессии генов сегментации во времени. (ж, и) Ранние (~ за 47 мин до начала гаструляции) (ж) и поздние ~ за 3 мин до начала гаструляции (и) картины экспрессии gap генов *Kr* и *gt*. (з, к) Ранние (~ за 34 мин до начала гаструляции) (з) и поздние ~ за 3 мин до начала гаструляции (к) картины экспрессии pair-rule гена *ftz*.

ном направлении – вдоль антеропостериорной оси (А–П). Поэтому в рассматриваемых в данном обзоре работах использовались количественные данные из полоски шириной 10%, вырезанной из центральной области эмбриона в направлении А–П (рис. 2). Количественные данные по экспрессии генов имеют временное разрешение в 6.5 мин развития и пространственное разрешение в 1 ядро и находятся в свободном доступе в сети Интернет (http://urchin.spbcas.ru/flyex) (Pisarev et al., 2009).

Математическое моделирование

Реконструкцию генных сетей проводят в рамках математической модели, описывающей экспериментальные данные. Обыкновенные дифференциальные уравнения – наиболее часто используемый формализм для моделирования процесса экспрессии в генных сетях. Уравнения модели формулируются на феноменологическом уровне описания биологической системы, в котором основные молекулярные процессы регуляции представляются разумно упрощенными математическими выражениями.

Для моделирования эффекта канализации высокой вариабельности в стабильный паттерн сегментации была использована модель, успешно примененная нами для моделирования динамики экспрессии генов gap (Jaeger et al., 2004 a, b) с небольшими модификациями (Manu et al., 2009 a, b).

Осуществлялось моделирование картин экспрессии gap генов *hb*, *Kr*, *gt* и *kni* в пространственной области от 35 до 92% длины эмбриона (ДЭ) вдоль А–П оси. Именно в этой пространственной области эмбриона в дальнейшем формируются сегменты.

Модель вычисляет изменение концентрации генных продуктов в ядрах во времени, начиная с цикла дробления 13, и заканчивая началом гаструляции, начальные условия определяются с использованием данных 12-го цикла дробления. Во время митоза, происходящего перед 13-м делением ядер, концентрация белков определяется исключительно диффузией и распадом, т.к. синтез белка выключен. Во время интерфазы синтез белка зависит от регуляции гена продуктами других генов gap, материнским градиентом Bcd, а также, продуктами генов *cad* и *tll.*

Модель описывает динамику концентраций белков генов gap вдоль переднезадней оси раннего эмбриона дрозофилы и имеет следующий вид:

$$\frac{dv_i^a}{dt} = R^a g\left(\sum_{b=1}^{N} T^{ab} v_i^b(t) + m^a v_i^{\mathrm{Bcd}} + \sum_{\beta=1}^{N_e} E^{a\beta} v_i^{\beta}(t) + h^a\right) - \lambda^a v_i^a + D^a(n)[(v_{i-1}^a - v_i^a) + (v_{i+1}^a - v_i^a)], \quad (1)$$

где $1 \le a \le N$, $1 \le i \le M$, $v_i^a = v_i^a(t)$ – концентрация a-го белка в i-м ядре на переднезадней оси, $N = 4$ – число генов gap в моделируемой генной сети.

В качестве функции синтеза g выбрана функция $g(y) = 1/2(1 + y/\sqrt{1 + y^2})$ с сигмоидным графиком. В качестве "внешних" факторов, которые регулируют гены gap, но не испытывают регуляторных воздействий со стороны последних, в модели учтены концентрация v_i^{Bcd} материнского белка Bcd и $N_e = 2$ зависящих от времени концентраций $v_i^{\beta}(t)$ транскрипционных факторов Cad и Tll. Параметры T^{ab}, m^a и $E^{a\beta}$ численно описывают характер (активация или репрессия) и силу регуляторного влияния на ген a со стороны, соответственно, других gap генов b, гена *bcd,* и генов *cad* и *tll.* Константа h^a модулирует положение порогового значения аргумента функции синтеза g и может интерпретироваться как регуляторный вклад от факторов, однородных по пространству и времени. Аргумент функции g суммирует все вклады в регуляцию a-го гена и, таким образом, представляет собой общий регуляторный вклад в данном ядре i и в данный момент t. Константы R^a и λ^a суть характеристические скорости синтеза и распада белков, соответственно. Число уравнений $N \times M$ в (2) удваивается после каждого деления, поскольку удваивается число ядер: $M = M(n)$, $M(n+1) = 2M(n)$, где n – номер клеточного цикла. Коэффициент диффузии $D^a(n)$ также зависит от номера клеточного цикла, поскольку расстояния между ядрами уменьшается вдвое после каждого деления и коэффициент обратно пропорционально зависит от квадрата этого расстояния: $D^a(n+1) = 4D^a(n)$.

Другая модификация модели заключалась в том, что вместо усредненных данных для Bcd использовали данные индивидуального эмбриона, у которого параметры градиента имели медианные значения. Отказ от использования усредненных данных обусловлен следующими соображениями: градиент Bcd меняется вдоль передне-задней оси по квазиэкспоненциальному закону, и среднее арифметическое нескольких экспонент имеет не экспоненциальное распределение; это не позволяет получить наиболее характерный градиент путем арифметического усреднения градиентов у индивидуальных эмбрионов. Очевидно, что для реконструкции генной сети необходимо не только найти, какие гены взаимодействуют друг с другом, но и определить параметры этих взаимодействий. Несмотря на огромный прогресс молекулярной биологии в последние годы, многие такие параметры все еще не могут быть измерены в эксперименте и, поэтому их приходится находить, решая обратную задачу, т.е. путем подгонки решений модельных уравнений к экспериментальным данным по экспрессии генов. При этом используется широкий арсенал методов оптимизации, таких, как метод численного отжига, различные ге-

нетические алгоритмы, градиентный метод. Часто для увеличения эффективности поиска эти методы комбинируют, например, в работах (Gursky et al., 2004; Ashyraliyev et al., 2009) сначала одним из методов глобального поиска находят приближенные значения параметров, а затем используют эти значения в качестве стартовой точки для метода наискорейшего спуска.

Для исследования стабильности траекторий развития был проведен динамический анализ поведения системы (Manu et al., 2009b). Исходная модель описывает поведение системы в 58 ядрах и для 4 генов gap, и, таким образом, размерность динамической системы равняется 232, что делает проблематичной визуализацию результатов динамического анализа. Вследствие этого было проведено уменьшение размерности системы путем исключения из модели диффузии (которая, согласно экспериментальным данным не играет значительной роли в бластодерме дрозофилы (DeLotto et al., 2007) и сужение области моделирования до 35–71% ДЭ, что позволило исключить из рассмотрения терминальный ген *tll*. В такой упрощенной системе области экспрессии генов gap формируются в правильной последовательности и позициях, хотя и имеют более острые границы (Manu et al., 2009b). Позиционная информация задается концентрациями Bcd и Cad, $\nu^{\mathrm{Bcd}(x)}$ и $\nu^{\mathrm{Cad}(x)}$ соответственно; биологически реализуемые траектории решений уравнений для генов gap в ядре определяются начальными условиями – концентрацией материнского Hb.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамическое уменьшение вариабельности картин экспрессии генов

Анализ количественных данных по экспрессии генов сегментации показывает, что на ранних стадиях формирования паттернов, в 13-м цикле деления эмбриона, а также в начале цикла 14А наблюдается существенная вариабельность картин экспрессии зиготических генов. Эта вариабельность выявляется при анализе картин экспрессии у индивидуальных эмбрионов и выражается в высокой изменчивости уровней экспрессии генов, положений границ областей их экспрессии, времени, типов и последовательности формирования областей. Однако нами было выявлено, что все эти виды вариабельности значительно уменьшаются к моменту окончания цикла 14А, т.е. к началу гаструляции (Surkova et al., 2008).

На рис. 2ж, и показаны ранние и поздние картины экспрессии генов *Kr* и *gt*. Вариабельность (измеренная как стандартное отклонение) максимального уровня экспрессии *Kr в* цикле деления ядер 13 составляет 33, а перед гаструляцией уменьшается до 17.4. В случае заднего домена *gt* стандартное отклонение максимального уровня экспрессии со временем уменьшается с 24.5 до 15.4 (рис. 2ж, и).

На рис. 2з видно, что форма и уровень экспрессии в ранних областях экспрессии pair-rule гена *ftz* очень сильно варьируют между индивидуальными эмбрионами, но к концу цикла 14А картины экспрессии у всех эмбрионов приобретают форму 7-ми полос (рис. 2к). Подобная закономерность свойственна всем исследованным генам pair-rule. Полосы pair-rule формируются в разной последовательности, таким образом, в одном и том же временном классе могут наблюдаться совершенно различные картины экспрессии одного и того же гена. Кроме того, полосы также могут формироваться разными способами, а именно, на границе (склоне) уже существующей полосы, делением полосы надвое, или появляться заново в области, где отсутствует экспрессия. При этом, одна и та же полоса может формироваться у разных эмбрионов в широком временном диапазоне от 6 до 24 минут. Это очень существенный уровень временной вариабельности, если учитывать, что области экспрессии генов pair-rule полностью формируются в течение примерно 50 минут развития (Surkova et al., 2008).

Подобное уменьшение вариабельности картин экспрессии происходит к моменту завершения детерминации сегментов и формирования клеточных мембран, обосабливающих ядра в отдельные клетки.

Фильтрация пространственной вариабельности

Однако наиболее исследуемым и спорным типом вариабельности картин экспрессии генов сегментации, является позиционная вариабельность. Согласно теории позиционной информации, судьба клетки определяется ее положением в определенном пространственном поле зародыша, в котором существует градиент концентрации некой сигнальной молекулы, называемой морфогеном (Wolpert, 1969). Считывание информации о градиенте морфогена и ее интерпретация приводят к активации разных комбинаций генов в зависимости от уровня концентрации морфогена. Большое количество экспериментальных данных свидетельствуют о том, что у дрозофилы продукт материнского гена *bcd* является морфогеном (Driever, Nusslein-Volhard, 1988).

мРНК гена *bcd* локализована в антериорном полюсе яйца и ее белковый продукт путем диффузии формирует градиент вдоль основной оси эмбриона. Этот белок координирует формирование паттернов вдоль А–П оси в зависимости от уровней концентрации путем прямого взаимодействия с генами gap и pair-rule. Многие авторы указывают на невозможность точного позиционирования доменов геновмишеней путем прямого считывания информации, заложенной в морфогенетическом градиенте (Lacalli, Harrison, 1991). То есть, даже при очень точном считывании, позиционная ошибка генов-мишеней

должна оставаться такой же, как у градиента морфогена, но более вероятно, что молекулярный шум еще увеличит ее уровень. Особенно сильно подобная ошибка должна проявляться при удалении от источника градиента.

Однако, было показано, что позиционная ошибка градиента продукта материнского гена *bcd* существенно уменьшается ("фильтруется") на уровне зиготических генов gap и pair-rule. Из всех границ областей экспрессии генов-мишеней Bcd, формирующихся с большей точностью, наибольшее внимание исследователей было уделено низкой вариабельности задней границы антериорной области экспрессии гена *hb* (Houchmanzadeh et al., 2002, 2005; Gregor et al., 2007a; Hardway et al., 2008; He et al., 2008) (рис. 2д, е).

Подобная фильтрация имеет динамический характер, как и другие виды вариабельности: позиционная ошибка уменьшается у поздних картин экспрессии в сравнении с ранними (Surkova et al., 2008). В цикле дробления 13 уровень ошибки позиционирования генов gap еще достаточно высок, но все же значительно ниже, чем у градиента Bcd. Эта ошибка все еще завышена в начале цикла 14А, но к середине цикла она понижается и в дальнейшем остается стабильно низкой. В примере, приведенном на рис. 2, в начале цикла 14А стандартное отклонение положений границ областей экспрессии *Kr* и *gt* составляет соответственно 1.9 и 2.5% ДЭ, а в конце цикла – 1.0 и 1.2% ДЭ. Для сравнения, позиционная ошибка градиента Bcd в позиции, соответствующей 50% его максимальной концентрации в цикле 14А, составляет 4.6% ДЭ (рис. 2д).

Таким образом, позиционирование доменов экспрессии генов gap, являющихся мишенями действия материнского морфогена Bcd, происходит с точностью, превышающей ожидаемую при условии исключительного контроля положения областей экспрессии генов-мишеней градиентом морфогена.

Кросс-регуляция генов gap как механизм канализации экспрессии генов в бластодерме дрозофилы

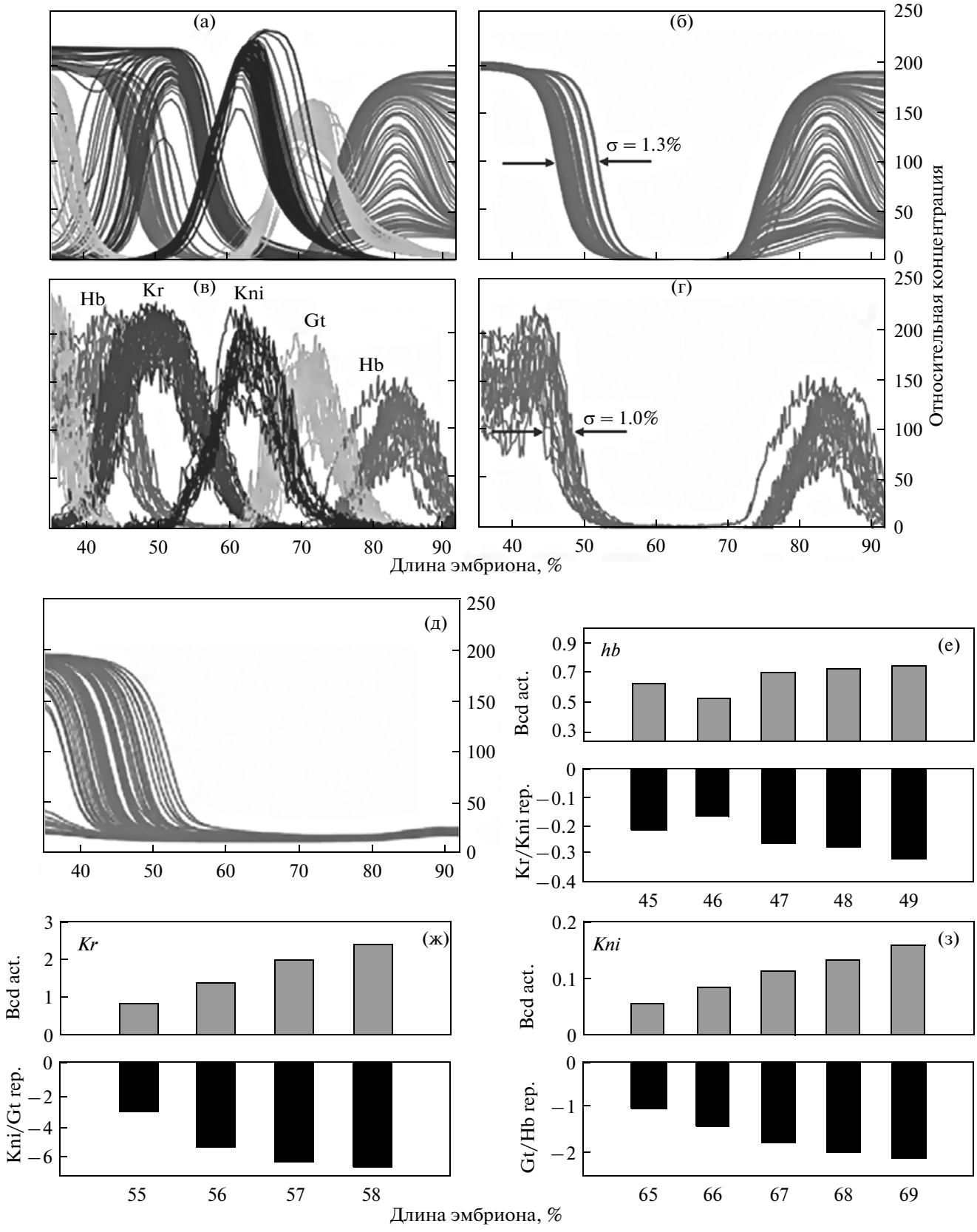
Для исследования механизмов фильтрации позиционной вариабельности материнского градиента Bcd на уровне зиготических генов нами были проведены численные эксперименты (Manu et al., 2009a) в рамках модели, описанной в раздале "Математическое моделирование".

В каждом из 88 численных экспериментов был использован паттерн Bcd конкретного индивидуального эмбриона. Все параметры генной сети оставались фиксированными, и только вклад Bcd варьировал. Уровень пространственной вариабельности границ областей экспрессии генов gap в модели сравнивали с вариабельностью профилей Bcd. Положение границ областей экспрессии генов gap определяли в точках, где уровень экспрессии достигал 50% от максимального; позиционной вариабельностью границы считалось стандартное отклонение ее позиции в 88 численных экспериментах. Позиционной вариабельностью профилей Bcd (x_{bcd}) считалось стандартное отклонение точки, где каждый профиль пересекал определенное пороговое значение концентрации (рис. 2д, е). Пороговым значением концентрации Bcd для конкретной границы домена gap являлась концентрация, при которой граница формировалась в генной сети с использованием медианного градиента Bcd (см. раздел "Математическое моделирование").

Модель правильно воспроизводит позиционную вариабельность 6-ти границ областей экспрессии генов gap: задней границы антериорной области экспрессии *hb*, задней границы центральной области экспрессии *Kr*, обеих границ постериорных областей экспрессии *kni* и *gt* (рис. 3а, б). Так, например, задняя граница антериорной области экспрессии *hb* в численных экспериментах имеет стандартное отклонение 1.3% длины эмбриона (ДЭ) и 1.0% ДЭ в экспериментальных данных (рис. 3), причем оба этих значения значительно меньше стандартного отклонения для пороговой концентрации Bcd, равного 4.6% ДЭ (рис. 2д). Четыре границы областей экспрессии, формирующихся на краях моделируемой области, имели высокую вариабельность, т.к. модель не учитывала регуляторов, действующих в головном и хвостовом отделе эмбриона, которые необходимы для формирования этих границ (Gaul, Jäckle, 1987; Kraut, Levine, 1991; Rivera-Pomar et al., 1995).

Канализация высокой вариабельности, присущей морфогену Bcd, в стабильную картину экспрессии генов gap является следствием регуляторных взаимодействий этих генов: модификация модели путем исключения регуляторных воздействий на ген *hb* со стороны других генов gap приводит к увеличению вариабельности задней границы антериорной области экспрессии *hb* до 4.3% ДЭ, т.е. практически достигает уровня вариабельности позиции пороговой концентрации Bcd (рис. 3д).

Идентификацию регуляторных взаимодействий, ответственных за канализацию вариабельности и формирование устойчивых границ экспрессии генов gap, осуществляли путем регуляторного анализа решений модели (Jaeger et al., 2004a, b; Manu et al., 2009a). Этот анализ показал, что каждая из правильно предсказываемых моделью границ областей экспрессии генов gap, формируется в результате действия активатора (Bcd или Cad) и двух репрессоров. Так, задняя граница антериорной области экспрессии гена *hb* формируется в результате активации Bcd и репрессии под действием Kr и Kni. Влияние варьирования концентрации Bcd на регуляцию этой границы исследовали, группируя совокупность численных решений системы уравнений (1) для каждо-


(а)
(б)
σ = 1.3%
(в)
Hb
Kr
Kni
Gt
Hb
(г)
σ = 1.0%
Относительная концентрация
Длина эмбриона, %
(д)
(е)
hb
Bcd act.
Kr/Kni rep.
(ж)
Kr
Bcd act.
Kni/Gt rep.
(з)
Kni
Bcd act.
Gt/Hb rep.
Длина эмбриона, %

го градиента Bcd у 88 индивидуальных эмбрионов по положению границы *hb* с интервалом, равным 1% ДЭ (рис. 3е), и вычисляя средние уровни активации Bcd и совместной репрессии под действием Kr и Kni внутри каждой группы. Оказалось, что при разных положениях границы *hb* уровни активации и репрессии остаются коррелированными, так, что эмбрионы, у которых граница *hb* формируется ближе к постериорному концу, имеют более высокие уровни активации Bcd и репрессии под действием Kr и Kni.

Данные результаты находятся в противоречии с ранее опубликованными данными о том, что стандартное отклонение положения границы экспрессии *hb* остается неизменным у одиночных мутантов по генам *Kr* или *kni*. Однако, у ранее не охарактеризованных двойных мутантов *Kr;kni,* стандартное отклонение положения задней границы антериорной области экспрессии *hb* удваивается, а вариабельность задней границы третьего домена экспрессии *gt* существенно увеличивается (рис. 4). Эти экспериментальные результаты подтверждают правильность выводов, полученных с помощью математического моделирования, опровергают утверждение о том, что Bcd вносит единственный вклад в регуляцию *hb* и свидетельствуют о том, что буферизация вариабельности формирования картин экспрессии генов gap является результатом специфичных регуляторных взаимодействий между этими генами.

Аналогичный баланс между уровнями активации и репрессии наблюдается при формировании задних границ областей экспрессии *Kr* и *kni* (рис. 3ж, з).

Динамические аттракторы как механизм канализации экспрессии генов и сдвигов областей экспрессии во времени

Наблюдаемое в системе генов сегментации уменьшение вариабельности картин экспрессии во времени (рис. 2) указывает на устойчивость траекторий развития эмбриона дрозофилы к возмущениям. Наличие количественных данных, описывающих временную динамику экспрессии генов сегментации, и корректной математической модели позволяет выйти за рамки метафорического представления эпигенетического ландшафта, предложенного Уоддингтоном, и охарактеризовать стабильность траекторий развития в раннем эмбрионе дрозофилы.

Исследование стабильности траекторий системы генов gap было проведено в контексте теории динамических систем (Manu et al., 2009b). В рассматриваемой системе из N генов и M ядер ($M \times N$ переменных), ее состояние можно описать точкой в $M \times N$-мерном пространстве концентраций, или фазовом пространстве. Концентрации белков gap меняются во времени, и, следовательно, численное решение уравнений – это траектория в этом фазовом пространстве. Динамическая система также может иметь решения, которые не меняются во времени. Подобные решения, называемые состояниями равновесия, представлены одной точкой в фазовом пространстве. Позиции точек равновесия в фазовом пространстве и свойства их устойчивости определяют стабильность общего численного решения, меняющегося во времени.

В окрестности точки равновесия в фазовом пространстве существуют принципиальные направления, по которым решения экспоненциально приближаются, либо удаляются от точки равновесия. Эти направления называются собственными векторами точки равновесия. *Аттрактор* (“узел”) – это точка равновесия, которая со временем притягивает все решения в некоторой окрестности фазового пространства, то есть все собственные вектора направлены к аттрактору (рис. 5б). Эта окрестная область называется *областью притяжения* аттрактора. Другими словами, если концентрации продуктов генов gap оказались в какой-то момент в области притяжения некоторого аттрактора, то спустя время концентрации примут значения, определяемые этим аттрактором. *Седловая точка* равновесия (“седло”) имеет собственные вектора, часть которых направлено к этой точке равновесия, а часть от нее (рис. 5в). В локальной окрестности седловой точки равновесия ее собственные вектора определяют так называемые *инвариантные многообразия* этой точки. Эти многообразия способны действовать в фазовом пространстве аналогично аттракторам, то есть притягивать к себе решения в отдалении от седловой точки.

Если система уравнений зависит от параметра, например, такого, как А–П позиция областей экспрессии генов gap, все решения уравнений, включая состояния равновесия, меняются при изменении значения параметра. Особенный интерес представ-

Рис. 3. Численное моделирование правильно предсказывает вариабельность границ областей экспрессии генов gap. (а) Результаты моделирования картин экспрессии *hb*, *Kr*, *kni* и *gt* во временном классе 8 (~3 мин до начала гаструляции) в численном эксперименте с использованием 88 индивидуальных эмбрионов (для сравнения с (в)). (в) Экспериментальные данные по экспрессии генов gap у 83 эмбрионов дикого типа во временном классе 8. (б, г) Вариабельность позиции постериорной границы переднего домена Hb в модели составляет 1.3% ДЭ (б), а в эксперименте 1% ДЭ (г). (д) Контрольный эксперимент *in silico* по моделированию влияния вариабельности Bcd на границу *hb* при выключенной кросс-регуляции генов gap. Использовались те же паттерны Bcd, как для картин экспрессии, показанных на рис. а и б. При отсутствии кросс-регуляции стандартное отклонение границы Hb увеличивается до 4.6% ДЭ. (е–з) Уровни активации и суммарной репрессии для постериорных границ *hb* (е), *Kr* (ж) и *kni* (з) скоррелированы. Результаты 88 численных экспериментов сгруппированы по положению соответствующих задних границ с интервалом, равным 1% ДЭ, и внутри каждой группы вычислены средние уровни активации (серые прямоугольники) и совместной репрессии (черные прямоугольники).

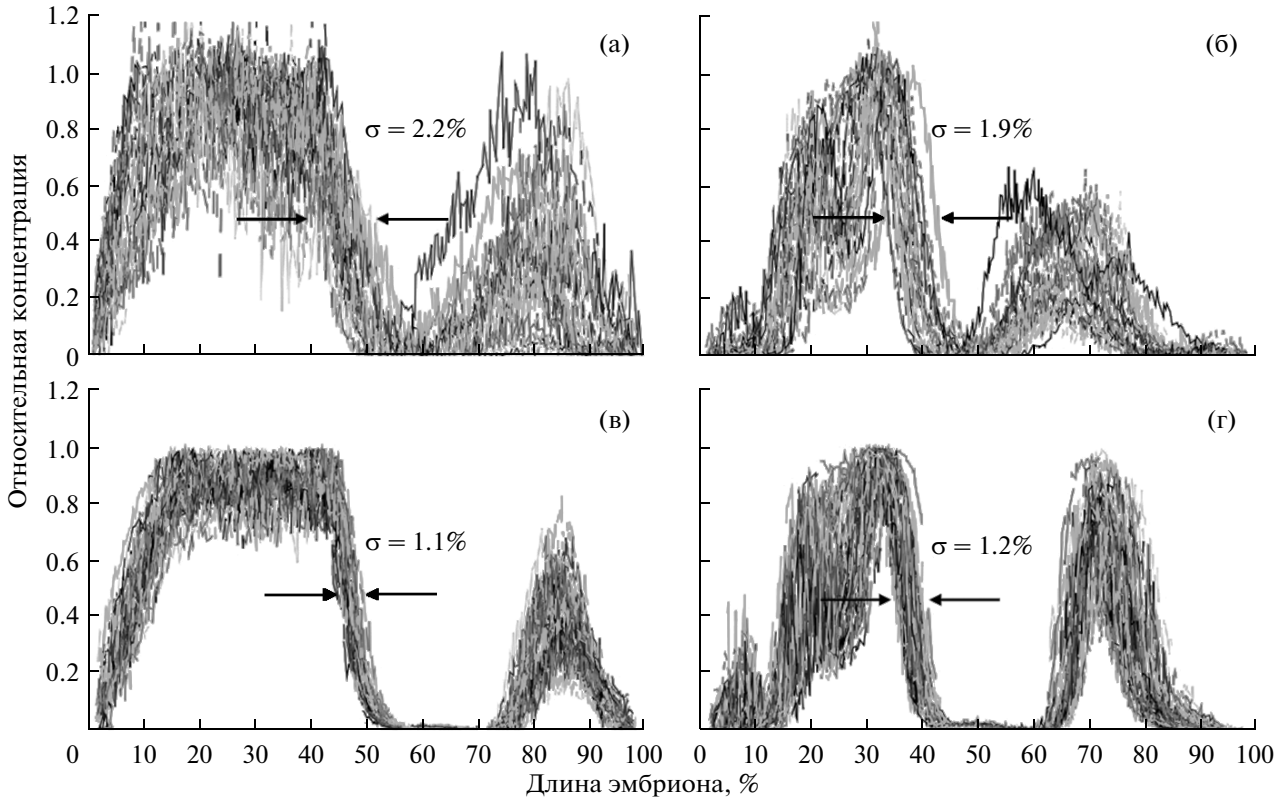
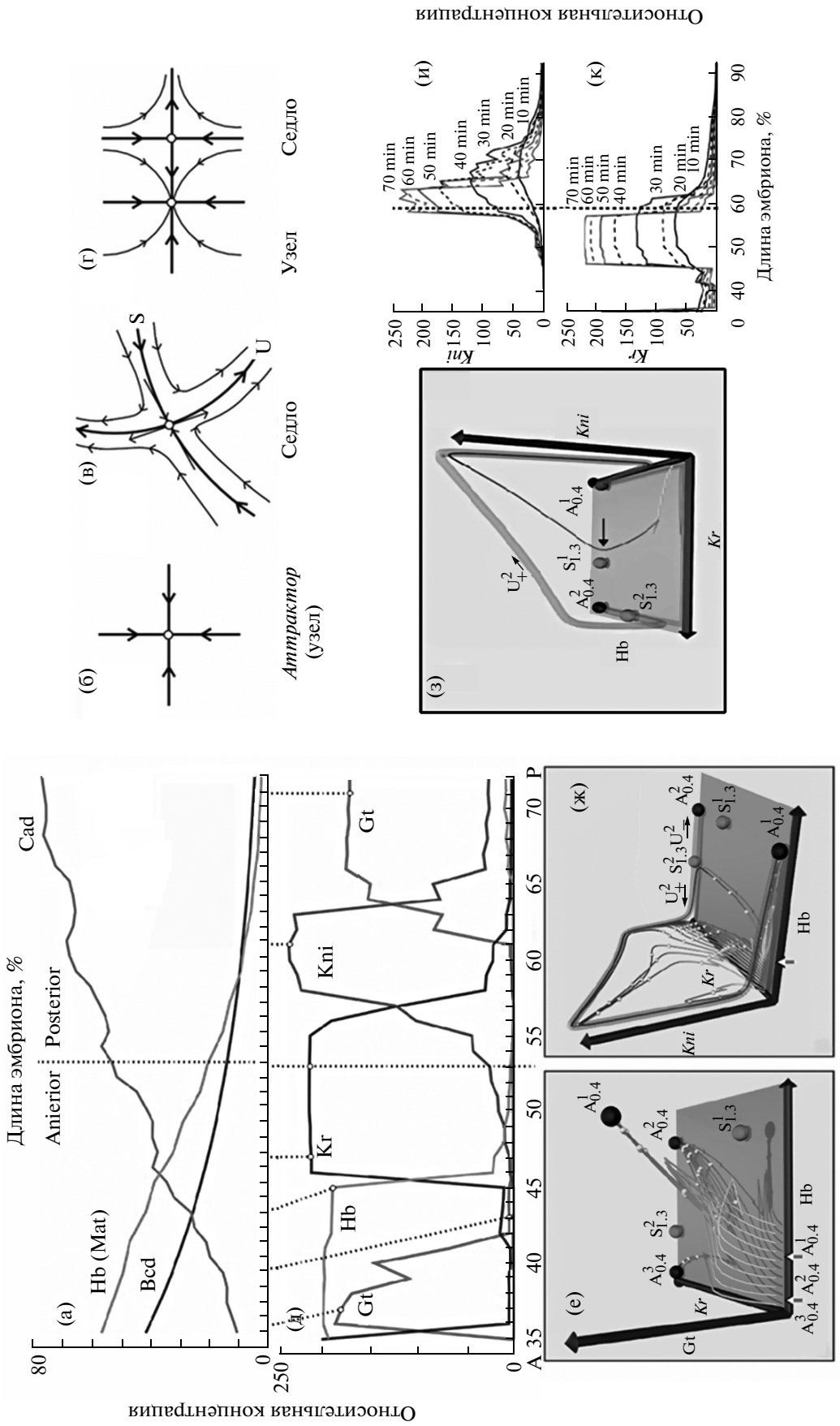


Рис. 4. Вариабельность задней границы антериорной области экспрессии *hb* находится под контролем Kr и Kni. Картины экспрессии *hb* (а) и *gt* (б) у 28 эмбрионов, мутантных по генам *Kr* и *kni*, и у 68 эмбрионов дикого типа (в и г соответственно). Показанные картины экспрессии нормированы на максимальный уровень экспрессии в антериорной области экспрессии *hb* (а, б) или в антериорной области экспрессии *gt* (б, г). Уровень экспрессии выражен в процентах от максимального уровня.

ляют резкие изменения в поведении решений при вариации параметра, при которых меняется общее количество точек равновесия или их устойчивость. Такие изменения называются *бифуркациями*. Путем бифуркаций происходят качественные изменения в динамике системы. Из многих существующих типов бифуркаций, исследуемой 4-мерной системе генов gap с медианным градиентом Bcd присущ только один тип – бифуркация “седло–узел”. В этой бифуркации при некотором значении параметров состояния равновесия аттрактор и седло сливаются друг с другом и оба перестают существовать или, наоборот, рождаются одновременно (рис. 5г).

Для каждого ядра эмбриона в А–П направлении были охарактеризованы аттракторы и области притяжения аттракторов, которые были рассчитаны ис-

Fig. 5. Динамические аттракторы как механизм канализации экспрессии генов gap, а также сдвигов областей экспрессии этих генов во времени. Материнские градиенты (а) и результаты моделирования картин экспрессии генов gap (д) в области 35–71% ДЭ (в модели с выключенной диффузией). Бифуркация в позиции 53% ДЭ, разделяющая антериорную и постериорную области, обозначена пунктирной линией. (б–г). Точки равновесия в фазовом пространстве: аттрактор (узел) (б), седловая точка (седло) с инвариантными многообразиями (в), седло и узел рядом друг с другом (г). При бифуркации типа “седло–узел” седловая точка и аттрактор в (г) постепенно сближаются (при изменении параметра в уравнениях модели), сливаются и перестают существовать. Если параметр меняется в другую сторону, то эти точки равновесия вместе появляются и постепенно отдаляются друг от друга. (е, ж) Антериорный и постериорный режимы канализации. Черные шарики – точечные аттракторы, серые – седловые точки равновесия. Траектории обозначены тонкими линиями, временная динамика показана градацией серого цвета на траекториях. белый цвет соотвествует циклу 13, черный – началу гаструляции. (е) Фазовый портрет ядра в позиции 37% ДЭ (проекция на оси Hb–Kr–Gt), иллюстрирующая антериорный динамический режим. (ж) Фазовый портрет ядра в позиции 57% ДЭ (проекция на оси Hb–Kr–Kni), иллюстрирующая постериорный динамический режим. Одномерное инвариантное многообразие показано в виде серой трубки. (з–к). Пространственные сдвиги областей экспрессии, обусловлены притяжением к многообразию. (и, к) Динамика концентраций белка в ядре в позиции 59% ДЭ, которое области экспрессии *Kr* и *kni* пересекают, когда сдвигаются в антериорном направлении в ходе цикла 14А. Позиция ядра обозначена вертикальной пунктирной линией. Низкие концентрации Kr и Kni соотвествуют началу цикла 14А, высокие – концу цикла. (з) Проекция фазового портрета этого ядра на оси Hb–Kr–Kni. Траектория ядра обозначена градиентом цвета, как на рис. (е, ж). Стрелкой обозначено промежуточное состояние ядра с высокой концентрацией Kr перед тем, как оно достигает состояния с высоким содержанием Kni перед гаструляцией.


Относительная концентрация
Длина эмбриона, %
Anterior
Posterior
(а)
Hb (Mat)
Bcd
Cad
(д)
Gt
Hb
Kr
Kni
(е)
(ж)
(з)
(б)
(в)
(г)
Аттрактор (узел)
Седло
Узел
Седло
S
U
(и)
(к)
Kni
Kr
70 min
60 min
50 min
40 min
30 min
20 min
10 min
Длина эмбриона, %

ходя из наблюдаемого разброса начальных условий - концентрации материнского Hb (См. раздел "Математическое моделирование"). Чтобы охарактеризовать переходные состояния решений, были рассчитаны инвариантные многообразия седловых точек. Анализ фазового пространства показал, что в эмбрионе дрозофилы существуют два типа формирования паттерна в зависимости от положения вдоль оси А–П (Manu et al., 2009b). Антериорный и постериорный динамические режимы разделяет бифуркация седло-узел в положении 53% ДЭ, что соответствует пику центрального домена Kr (рис. 5д).

В антериорной области, заключенной между пиком третьего домена Gt (рис. 2а) и пиком центрального домена Kr, состояние ядра в момент гаструляции близко к точечному аттрактору. Формирование паттерна в этой области происходит путем выбора одного состояния из множества возможных в фазовом пространстве модели и контролируется концентрациями Bcd и Cad путем определения размеров областей притяжения и положения аттракторов в фазовом пространстве модели. Концентрация материнского Hb отвечает за выбор конкретного аттрактора (рис. 5а). Согласно ранее полученным результатам, паттерн в передней области эмбриона формируется в результате синергетического взаимодействии Bcd и Hb; и проведенный анализ позволяет понять роль этих белков в антериорном паттернинге.

На рисунке 5е показан пример, характеризующий механизмы канализации в антериорной области. Приведен фазовый портрет ядра в А–П позиции 37% ДЭ, эта позиция соответствует пику третьего домена *gt* (рис. 2а) и передней области экспрессии *hb*. Так как фазовое пространство в каждом ядре 4–х мерно (по количеству исследуемых генов gap), показана его 3-х мерная проекция на оси Hb–Kr–Gt. Все траектории решений начинаются на оси Hb, в соответствии с начальными условиями во всех ядрах. Аттракторы обозначены черными шариками. Траектории показаны тонкими линиями, временная динамика показана градацией серого цвета на траекториях. Белый цвет соотвествует циклу 13, черный – началу гаструляции. Переход к черному цвету происходит очень близко к аттракторам, это значит, что решение во всех ядрах очень близко к точке равновесия перед гаструляцией. На рисунке видно, что изначальная вариабельность траекторий очень сильно уменьшается к моменту гаструляции, таким образом, траектории стабильны благодаря точечным аттракторам. Показанное ядро 37 в соответствии с концентрацией материнского Hb попадает в область притяжения аттрактора $A^1_{0.4}$ в состоянии Hb,Gt-ON (с высокими концентрациями Hb и Gt), что соответствует А–П позиции этого ядра относительно областей экспрессии этих генов (рис. 5е).

Всего в передней области эмбриона формируются три границы экспрессии генов gap: задняя граница третьего домена *gt*, задняя граница антериорного домена *hb* и передняя граница центрального домена *Kr*. Первая из них образуется в результате того, что аттрактор, притягивающий траектории развития в ядрах, расположенных в районе границы, переходит из состояния Gt-ON (с высокой концентрацией Gt) в состояние Gt-OFF. Образование перекрывающихся границ Hb и Kr в области 45–47% ДЭ является результатом переключения траекторий от одного аттрактора с состоянием Hb–ON (до 45% ДЭ) к другому с состоянием Kr-ON (после 47% ДЭ).

Задняя область эмбриона заключена между пиком центральной области экспрессии *Kr* и пиком постериорного домена экспрессии *gt* (Manu et al., 2009b) (рис. 5д). Хотя перед гаструляцией траектории в этой области не сходятся к одному аттрактору, они сходятся к одной траектории в фазовом пространстве, а именно, к одномерному инвариантному многообразию U^2_- седловой точки S^2, показанному на рисунке 5ж в виде серой трубки. Перед гаструляцией траектории близки к этому многообразию, это видно по изменению цвета на черный при приближении к многообразию. Данное многообразие в постериорной области играет ту же роль, что и аттракторы в антериорной, т.е. отвечает за стабильность траекторий и канализацию. Материнский Hb обеспечивает формирование паттерна в постериорной области, определяя какая часть многообразия U^2_- будет достигнута решением уравнений в том или ином ядре к моменту гаструляции: при высоких концентрациях материнского Hb решения уравнений приближаются к состоянию Kr-ON (с высокой концентрацией Kr и низкой концентрацией продуктов других генов gap), при промежуточных концентрациях Hb решения достигают состояния Kni-ON, а при низких концентрациях реализуется состояние Gt-ON. Т.к. материнский Hb убывает монотонно в зависимости от А-П позиции, это приводит к формированию паттернов в постериорной области. Если зафиксировать концентрацию Bcd в постериорном ядре и менять только концентрацию материнского Hb, на выходе модели получаются правильные картины экспрессии генов gap (Manu et al., 2009b). Это согласуется с ранее полученными экспериментальными данными о том, что материнский Hb может формировать паттерн в эмбрионе при отсутствии антериорных и терминальных систем, образуя постериорные картины экспрессии по длине всего эмбриона (Struhl et al., 1992). Таким образом, результаты моделирования подтверждают ранее продемонстрированную в экспериментах роль Hb как морфогена, действующего в постериорной области эмбриона, и позволяют понять механизм действия этого транскрипционного фактора.

Притяжение траекторий решений уравнений к инвариантному многообразию обеспечивает также механизм динамических сдвигов областей экспрес-

сии генов gap, который является ключевой особенностью формирования паттерна в задней области эмбриона (Jaeger et al., 2004a, b, Surkova et al., 2008). Этот механизм можно проиллюстрировать с помощью ядра в положении 59% ДЭ, которое задняя граница Kr и передняя граница Kni пересекают, когда сдвигаются к антериорному концу эмбриона в ходе цикла 14А. На рис. 5и, к показана временная динамика концентраций Kr и Kni в этой А–П позиции, обозначенной вертикальной пунктирной линией. На проекции фазового портрета этого ядра (рис. 5з) видно, что его траектория начинается на оси Hb и притягивается к многообразию U2+, достигая перед гаструляцией состояния Kni-ON (с высокой концентрацией Kni). При этом траектория проходит через следующие промежуточные состояния: вначале воз-растает концентрация Kr. Затем происходит постепенное увеличение концентрации Kni, сопровождающееся уменьшением концентрации Kr. Отметим, что траектория решений уравнений в этом ядре является результатом асимметричной репрессии между генами *kni* и *Kr*. Механизмы, обеспечивающие сдвиги областей экспрессии в ядрах, расположенных в районе задней границы области экспрессии *kni* и передней границы постериорной области экспрессии *gt*, аналогичны показанным на рис. 5з–к.

Клеточные деления как механизм выбора стационарных состояний в развивающейся биологической системе

Описанные выше результаты показывают, какую фундаментальную роль в биологических исследованиях играют такие абстрактные математические понятия, как аттракторы и их области притяжения. Точечные аттракторы и другие притягивающие инвариантные многообразия, подобные изображенным на рис. 5, служат организующим элементом для фазового портрета системы, задающим его основные геометрические особенности. В этих терминах канализация начальной вариабельности состояний развивающейся системы естественным образом представляется в виде траекторий, сходящихся к одному и тому же аттрактору с различных начальных условий. Максимальное количество возможных аттракторов является важным свойством такой системы. Если система является многоклеточным организмом, то ее состояние будет определяться состоянием каждой из ее клеток, и, таким образом, пространство состояний может быть очень велико. Однако, явление канализации предполагает, что существуют механизмы, контролирующие количество возможных стационарных состояний, достижимых биологической системой. Для объяснения этого явления необходимо учитывать влияние на динамику конкретных биологических процессов, таких как деления клеток.

В работе Gursky et al., 2006 на примере модели вида (1) (см. раздел “Математическое моделирование”) показано, что деление ядер играет динамическую роль в развитии эмбриона дрозофилы, которая состоит в редукции общего числа аттракторов, доступных для динамики генных продуктов во всех ядрах. Этот эффект является математическим следствием того, что размерность пространства состояний в модели меняется вместе с изменением числа ядер в эмбрионе (Gursky et al., 2006). Подобный эффект редукции числа достижимых аттракторов не зависит от конкретной реализации модели и, очевидно, будет иметь место в любой биологической системе, в которой происходит образование паттернов на фоне клеточного деления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре суммированы результаты изучения механизмов канализации вариабельности экспрессии генов сегментации, опубликованные в работах Surkova et al., 2008; Manu et al., 2009a, b.

Эти исследования показали, что канализация вариабельности в системе генов gap происходит в результате взаимной регуляции этих генов. Поскольку взаимная регуляция генов является имманентным свойством системы генов gap, полученные результаты доказывают, что канализация вариабельности также внутренне присуща этой системе.

Важно, что выполненные исследования продемонстрировали недостаточность градиента Bcd для формирования точно позиционируемых границ областей экспрессии генов gap, а также необоснованность двух других классов теоретических моделей, предложенных для объяснения точного позиционирования границы экспрессии гена *hb*. В этих исследованиях были высказаны гипотезы о том, что причиной буферизации вариабельности *hb* может быть активный транспорт (Aegerter-Wilmsen et al. 2005), или некий дополнительный градиент, направленный от заднего конца эмбриона к переднему (Howard et al., 2005; McHale et al., 2006; Houchmandzadeh et al., 2005). Отметим также, что в большинстве этих работ рассматривалась только граница *hb*, в то время как модель, предложенная в работе Manu et al., 2009a правильно воспроизводит уменьшение вариабельности градиента морфогена Bcd на уровне экспрессии не только *hb*, но и других генов gap.

Многие, подчас озадачивающие результаты, полученные в исследованиях вариабельности положения границ генов-мишеней Bcd, могут быть объяснены путем сопоставления результатов, полученных в рассмотренных в данном обзоре работах с данными о градиенте Bcd *in vivo* (Gregor et al., 2007b). Более наглядной характеристикой пространственной вариабельности, чем стандартное отклонение позиций пороговых концентраций белка, является непо-

средственно размах этих позиций вдоль оси А–П (рис. 2д, е). Размахи позиций Bcd *in vivo* и границы экспрессии *hb* у фиксированных эмбрионов составляют 10 и 5% длины эмбриона соответственно. Это очень важное наблюдение, поскольку очень многие экспериментальные воздействия могут увеличить размах позиций границы *hb* в два раза, делая его равным размаху позиций Bcd.

Прежде всего, полученные в работе Manu et al., 2009a результаты об удвоении размаха позиций границы экспрессии *hb* у двойных мутантов *Kr*;*Kni*- можно объяснить тем, что в этом случае Bcd является единственным регулятором *hb*, поскольку из-за мутаций действие других регуляторов, в норме уменьшающих вариабельность, отсутствует. Во-вторых, 9% размах позиций границы экспрессии *hb* наблюдается у репортерных конструктов с фрагментом промотора *hb*, который содержит только сайты присоединения Bcd (Bergmann et al., 2007). Наконец, делеция левого плеча третьей хромосомы удваивает вариабельность границы экспрессии *hb* (Houchmandzadeh et al., 2002). Мы считаем, что все эти экспериментальные воздействия выявляют немодифицированное действие Bcd на *hb* путем исключения других модуляторов.

Другие важные результаты могут быть объяснены, если принять во внимание, что максимальная точность градиента Bcd обратно пропорциональна корню квадратному из его концентрации (Berg, Purcell, 1977; Gregor et al., 2007a; Tostevin et al., 2007). Тогда граница экспрессии, находящаяся только под контролем Bcd, будет иметь тем меньшую вариабельность, чем ближе она находится к антериорному концу эмбриона. Это объясняет, почему синтетический конструкт с экспрессией, запускаемой Bcd, имеет такую же вариабельность границы области экспрессии, как и *hb* (Crauk, Dostatni, 2005). Конструкт образует границу экспрессии в положении 28.6% длины эмбриона, где, по *in vivo* данным, концентрация Bcd в два раза выше по сравнению с таковой на границе области экспрессии *hb*. Если считать, что стандартное отклонение вариабельности этой границы у мутантов *Kr-kni-*, равное 2.2%, отражает немодифицированый ответ на действие Bcd в положении 47% длины эмбриона, то в положении 29% длины эмбриона стандартное отклонение должно быть 1.3%, что близко к наблюдаемому значению в 1.6% (Crauk, Dostatni, 2005). Меньшее возрастание вариабельности задней границы передней области экспрессии *gt* по сравнению с таковой у границы экспрессии *hb*, обнаруженное в нашей работе, также можно объяснить, если учесть, что граница *gt* формируется в положении 40% длины эмбриона. В этом положении по данным *in vivo* концентрация Bcd в 1.69 раз выше таковой на границе экспрессии *hb*. Таким образом, у мутантов *Kr-kni-* стандартное отклонение вариабельности границы *gt* должно быть 1.7%, что близко к наблюдаемому значению 1.9% длины эмбриона.

Открытым остается вопрос о причине правильного предсказания вариабельности границ областей экспрессии генов gap в модели Manu et al., 2009a, несмотря на завышенность вариабельности градиента Bcd в данных по экспрессии генов у фиксированных эмбрионов (Surkova et al., 2008). По всей видимости, высокая степень канализации, присущая как этой модели, так и самой системе генов gap, делает теоретическую модель довольно нечувствительной к начальной вариации морфогена. Данные по вариабельности градиента Bcd *in vivo* получены у изогенной линии мух и в строго контролируемых температурных условиях, в то время как естественные популяции характеризуются генотипической изменчивостью и развиваются в присутствии температурных флуктуаций. Эти факторы изменяют форму градиента Bcd, но не влияют на положение границ областей экспрессии генов-мишеней (Houchmandzadeh et al., 2002; Lucchetta et al., 2005). Весьма вероятно, что у индивидуальных градиентов Bcd, использованных в работе Manu et al., 2009a, уровень вариабельности приближается к уровню, свойственному естественным популяциям.

Высокая вариабельность генов gap на ранних стадиях развития может быть обусловлена событиями, имеющими стохастическую природу. Так например, известно, что выбор ядер, в которых начинает активироваться транскрипция генов gap, является чисто случайным (Jaeger et al., 2007; Pritchard, Schubiger, 1996). Более того, градиенты белков Hb и Cad образуются в результате репрессии на уровне трансляции соответственно под действием Nanos и Bcd, количество молекул которых в эмбрионе может быть подвержено флуктуациям в силу их малого числа (Gregor et al., 2007a, b). Буферизация фенотипической вариации, обусловленной флуктуацией малого числа молекул, хотя и не принималась во внимание Уоддингтоном, может быть важной разновидностью канализации в биологических системах.

Остается до конца не ясным, насколько генетическая вариабельность вносит вклад в наблюдаемую раннюю вариабельность генов gap, поскольку линия мушек Oregon R, использованная в данной работе, является инбредной и условно изогенной. Тем не менее, скрещивания Hsp83 гетерозигот и мух Oregon R (Rutherford, Lindquist, 1998) продемонстрировали наличие у последних значительной скрытой генетической вариабельности, которая может быть переведена “в открытую форму” и закреплена как новый фенотипический признак в результате последовательных актов селекции. Поэтому, наблюдаемая в работе Surkova et al., 2008 фенотипическая вариабельность ранних картин экспрессии генов gap может быть частично обусловлена генотипической вариабельностью материнских или зиготических генов сегментации.

Важно подчеркнуть, что независимо от того, какую природу имеет ранняя вариабельность картин

экспрессии генов gap, дискретнтый и буферизованный ответ является отличительным признаком развивающейся системы, способной к канализации. В отсутствие молекулярных данных Уоддингтон пытался объяснить эти особенности ответа системы, предположив существование определенных, предпочтительных, стабильных траекторий развития, которые он называл креодами (Waddington, 1942; Rendel, 1959). Как показано в работе Manu et al., 2009b, траектории развития в системе генов gap стабильны из-за притяжения к аттракторам (в передней области эмбриона) или к инвариантному многообразию (в задней области). Ответ системы на начальную вариабельность является дискретным в силу того, что к моменту гаструляции каждая траектория развития может приблизиться только к одному аттрактору или состоянию инвариантного многообразия. Причиной буферизованного ответа системы является стабильность траекторий развития. Даже если предположить, что ген может быть только в двух состояниях (включен – выключен), реальное число аттракторов в системе генов gap (равное двум или трем) гораздо меньше максимально возможного (2^4), из чего следует, что в результате естественного отбора произошел выбор вполне определенных траекторий развития из большого числа возможных. Таким образом, на основании результатов моделирования, мы можем заключить, что траектории развития в системе генов gap являются креодами.

Доказательство корректности рассмотрения траекторий развития в системе генов gap как креодов, подтверждает правильность идей Уоддингтона (Waddington, 1942). Более того, анализ, выполненный в работах Surkova et al., 2008; Manu et al., 2009a, b, выявил новый тип стабильности, возникающий как результат притяжения к инвариантному многообразию и отличающийся от ранее описанных механизмов, таких как точечные аттракторы и предельные циклы, а также необходимый для объяснения важных биологических особенностей формирования паттерна в задней области эмбриона.

В настоящее время преобладающей точкой зрения на механизм формирования паттерна является представление о том, что границы областей экспрессии генов-мишений формируются в позициях фиксированных пороговых концентраций градиента Bcd (Gregor et al., 2007a; Driever, Nusslein-Volhard, 1988). Однако, в рамках такого представления невозможно объяснить как фильтрацию позиционной вариабельности на уровне экспрессии генов-мишеней (Houchmandzadeh et al., 2002; Surkova et al., 2008; Manu et al., 2009a), так и динамические сдвиги областей экспрессии генов gap в задней части эмбриона (Jaeger et al., 2004a, b). Идея о спецификации с помощью фиксированных порогов Bcd также не может объяснить точное позиционирование границ областей экспрессии генов gap в постериорном районе эмбриона, так как небольшое число молекул Bcd в ядрах этого района означает наличие большого уровня молекулярного шума (Gregor et al., 2007a, Tostevin et al., 2007). Результаты динамического анализа, выполненного в работе Manu et al., 2009b, указывают на то, что в области эмбриона, расположенной постериорнее пика центральной области экспрессии *Kr*, Bcd перестает участвовать в спецификации положения областей экспрессии генов-мишеней, поскольку в этой области геометрия фазового пространства качественно не зависит от положения вдоль оси А–П. Напротив, как показывают результаты динамического анализа, в этой области роль морфогена выполняет материнский Hb, что устраняет проблему высокого уровня молекулярного шума Bcd. О роли материнского Hb как морфогена в постериорной области эмбриона было известно давно (Hulskamp et al., 1990; Struhl et al., 1992), однако механизм участия Hb в формировании паттерна оставался не ясным. Как и в случае с Bcd, теория, основанная на пороговых концентрациях, в приложении к Hb (Yu and Small, 2008) неполна и требует постулирования возможности модификации уровней пороговых концентраций под действием генов-мишеней. Динамический анализ позволяет понять, что в основе формирования сложной пространственно-временной динамики системы генов gap лежат три простых механизма: изменения аттракторами своего положения в фазовом пространстве системы, а также выбор аттрактора или состояния на инвариантном многообразии в зависимости от начальных условий.

Особенно важно подчеркнуть, что многообразие U^2_- является геометрическим выражением ассиметричной репрессии между генами gap, в результате которой гены, области экспрессии которых расположены ближе к заднему концу эмбриона, репрессируют экспрессию генов, с перекрывающейся областью экспрессии, но расположенной дальше от заднего конца: *Kr* |- *kni*|- *gt*. То, какое состояние на инвариантном многообразии будет достигнуто траекторией перед гаструляцией зависит от начальной концентрации Hb: при высоких концентрациях Hb реализуется состояние Kr-ON (с высокой концентрацией Kr), при промежуточных – Kni-ON, а при низких концентрациях – состояние Gt-ON. Другими словами, постериорный паттеринг осуществляется путем запуска в сети генов gap регуляции по типу обратной связи, специфика которой зависит от концентрации материнского Hb в ядре. Этот механизм также лежит в основе сдвигов областей экспрессии генов gap, поскольку траектории повторяют инвариантное многообразие после приближения к последнему.

ЛИТЕРАТУРА

Суркова С.Ю., Мясникова Е.М., Козлов К.Н. и др. Методы получения количественных данных из конфокальных изображений картин экспрессии генов *in situ* // Цитология. 2008. Т. 50. № 4. С. 352–369.

Aegerter-Wilmsen T., Aegerter C.M., Bisseling T. Model for the robust establishment of precise proportions in the early Drosophila embryo // J. Theor. Biol. 2005. V. 234. P. 13–19.

Akam M. The molecular basis for metameric pattern in the Drosophila embryo // Development. 1987. V. 101. P. 1–22.

Ashyraliyev M., Siggens K., Janssens H. et al. Gene circuit analysis of the terminal gap gene huckebein // PLoS Comp. Biol.. 2009. V. 5. № 10. P. e1000548.

Berg H.C., Purcell E. Physics of chemoreception // Biophys. J. 1977. V. 20. P. 193–219.

Bergmann S., Sandler O., Sberro H. et al. Pre-steady-state decoding of the Bicoid morphogen gradient. PLoS Biology. 2007. V. 5. P. 232–242.

Carroll S., Winslow G., Twombly V., Scott M. Genes that control dorsoventral polarity affect gene expression along the anteroposterior axis of the Drosophila embryo // Development. 1987. V. 99. P. 327–332.

Clyde D.E., Corado M.S., Wu X. et al. A selforganizing system of repressor gradients establishes segmental complexity in Drosophila // Nature. 2003. V. 426. P. 849–853.

Crauk O., Dostatni N. Bicoid determines sharp and precise target gene expression in the *Drosophila* embryo // Current Biology. 2005. V. 15. P. 1888–1898.

DeLotto R., DeLotto Y., Steward R. et al. Nucleocytoplasmic shuttling mediates the dynamic maintenance of nuclear Dorsal levels during Drosophila embryogenesis // Development. 2007. V. 134. №. 23. P. 4233–4241.

Driever W., Nusslein-Volhard C. The Bicoid protein determines position in the Drosophila embryo in a concentration-dependent manner // Cell. 1988. V. 54. P. 95–104.

Gaul U., Jäckle H. Pole region-dependent repression of the Drosophila gap gene *Krüppel* by maternal gene products // Cell. 1987. V. 51. P. 549–555.

Gregor T., Tank D.W., Wieschaus E.F. et al. Probing the limits to positional information // Cell. 2007a. V. 130. P. 153–164.

Gregor T., Wieschaus E.F., McGregor A.P. et al. (2007b) Stability and nuclear dynamics of the bicoid morphogen gradient // Cell. 2007b. V. 130. P. 141–152.

Gursky V.V., Jaeger J., Kozlov K.N. et al. Pattern formation and nuclear divisions are uncoupled in *Drosophila* segmentation: Comparison of spatially discrete and continuous models // Physica D. 2004. V. 197. P. 286–302.

Gursky V. V., Kozlov K.N., Samsonov A.M. et al. Cell divisions as a mechanism for selection in stable steady states of multi-stationary gene circuits // Physica D. 2006. V. 218. № 1. P. 70–76.

Hardway H., Mukhopadhyay B., Burke T. et al. Modeling the precision and robustness of Hunchback border during Drosophila embryonic development // J. Theor. Biol. 2008. V. 254. P. 390–399.

He F., Wen Y., Deng J. et al. Probing intrinsic properties of a robust morphogen gradient in Drosophila // Dev. Cell. 2008. V. 15. P. 558–567.

Houchmandzadeh B., Wieschaus E., Leibler S. Establishment of developmental precision and proportions in the early Drosophila embryo // Nature. 2002. V. 415. P. 798–780.

Houchmandzadeh B., Wieschaus E., Leibler S. Precise domain specification in the developing Drosophila embryo // Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter. 2005. V. 72. № 6 Pt 1. P. 061920. *Howard M.*, ten Wolde P.R. Finding the center reliably: Robust patterns of developmental gene expression // Phys. Rev. Lett. 2005. V. 95. P. 208 103.

Hulskamp M., Pfeifle C., Tautz D. A morphogenetic gradient of Hunchback protein organizes the expression of the gap genes Kruppel and knirps in the early Drosophila embryo // Nature. 1990. V. 346. P. 577–580.

Jaeger J., Blagov M., Kosman D. et al. Dynamical analysis of regulatory interactions in the gap gene system of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2004a. V. 167. P. 1721–1737.

Jaeger J., Surkova S., Blagov M. et al. Dynamic control of positional information in the early Drosophila embryo // Nature. 2004b. V. 430. P. 368–371.

Jaeger J., Sharp D.H., Reinitz J. Known maternal gradients are not sufficient for the establishment of gap domains in *Drosophila melanogaster* // Mech. Dev. 2007. V. 124. P. 108–128.

Kosman D., Small S., Reinitz J. Rapid preparation of a panel of polyclonal antibodies to Drosophila segmentation proteins // Dev Genes Evol. 1998. V. 208. P. 290–294.

Janssens H., Kosman D., Vanario-Alonso C.E. et al. A high-throughput method for quantifying gene expression data from early Drosophila embryos // Dev Genes Evol. 2005. V. 215. P. 374–381.

Kozlov K.N., Myasnikova E., Samsonova A.A. et al. GCPReg package for registration of the segmentation gene expression data in Drosophila // Fly. 2009. V. 3, № 2. P. 151–156.

Kraut R., Levine M. Spatial regulation of the gap gene *giant* during *Drosophila* development // Development. 1991. V. 111. P. 601–609.

Lacalli T.C., Harrison L.G. From gradients to segments: Models for pattern formation in early Drosophila embryogenesis // Semin Dev Biol. 1991. V. 2. P. 107–117.

Lucchetta E.M., Lee J., Fu L. et al. Dynamics of *Drosophila* embryonic patterning network perturbed in space and time using microfluidics // Nature. 2005. V. 434. P. 1134–1138.

Manu, Surkova S., Spirov A.V. et al. Canalization of gene expression in the Drosophila blastoderm by gap gene cross regulation. PLoS Biology. 2009a. V. 7. № 3. P. e1000049.

Manu, Surkova S., Spirov A.V. et al. Canalization of gene expression and domain shifts in the Drosophila blastoderm by dynamical attractors // PLoS Comp. Biol. 2009b. V. 5. № 3, P. e1000303.

McHale P., Rappel W.J., Levine H. Embryonic pattern scaling achieved by oppositely directed morphogen gradients // Physical Biol. 2006. V. 3. P. 107–120.

Myasnikova E., Samsonova A., Kozlov K. et al. Registration of the expression patterns of Drosophila segmentation genes by two independent methods // Bioinformatics. 2001. V. 17. P. 3–12.

Pisarev A., Poustelnikova E., Samsonova M. et al. FlyEx, the quantitative atlas on segmentation gene expression at

cellular resolution // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. P. D560–D566.

Pritchard D.K., Schubiger G. Activation of transcription in *Drosophila* embryos is a gradual process mediated by the nucleocytoplasmic ratio // Genes Dev. 1996. V. 10. P. 1131–1142.

Rendel J.M. The canalization of the *scute p*henotype of *Drosophila* // Evolution. 1959. V. 13. P. 425–439.

Rivera-Pomar R., Lu X., Perrimon N. et al. Activation of posterior gap gene expression in the *Drosophila* blastoderm // Nature. 1995. V. 376. P. 253–256.

Rutherford S.L., Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution // Nature. 1998. V. 396. P. 336–342.

Saunders P.T. The Organism as a dynamical system // Thinking about Biology (SFI Studies in the Sciences of Complexity, Lecture Notes, F. Varela and W. Stein, eds.). Addison Wesley, Reading. 1993. V. 3. P. 41–63.

Slack J.M.W. Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? // Nature Rev. Genet. 2002. V. 3. P. 889–895

Sollars V., Lu X., Xiao L. et al. Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution // Nature Genet. 2002. V. 33. P. 70–74.

Struhl G., Johnston P., Lawrence P.A. Control of Drosophila body pattern by the Hunchback morphogen gradient // Cell. 1992. V. 69. P. 237–249.

Surkova S., Kosman D., Kozlov K. et al. Characterization of the *Drosophila* segment determination morphome // Dev. Biol. 2008. V. 313. P. 844–862.

Thom R. Topological models in biology // Topology. 1969. V. 8. P. 313–335.

Thom R. Mathematical Models of Morphogenesis. West Sussex, England: Ellis Horwood Limited, 1985.

Tostevin F., ten Wolde P.R., Howard M. Fundamental limits to position determination by concentration gradients // PLoS Comp Biol. 2007. V. 3. P. e78.

Waddington C.H. Genetic assimilation of an acquired character // Evolution. 1953. V. 7. P. 118–126.

Waddington C.H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters // Nature. 1942. V. 150. P. 563–565.

Waddington C.H. New Patterns in Genetics and Development. New York: Columbia University Press, 1962.

Waddington, C.H. Organisers and Genes. Cambridge: Cambridge University Press, 1940.

Waddington, C.H. The Strategy of the Genes. London: George Allen and Unwin, 1957.

Wolpert L.Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation // J Theor Biol. 1969. V. 25. P. 1–47.

Yu D., Small S. Precise registration of gene expression boundaries by a repressive morphogen in Drosophila // Current Biol. 2008. V. 18. P. 868–876.

Zeitlinger J., Zinzen R.P., Stark A. et al. Whole genome ChIP-chip analysis of Dorsal, Twist and Snail suggests integration of diverse patterning processes in the Drosophila embryo // Genes Dev. 2007. V. 21. P. 385–390.

Investigation into Stability Mechanisms of Embryonal Development in Fruit Fly *Drosophila*

S. Yu. Surkova[a], V. V. Gurskiy[b], John Reinitz[c], and M. G. Samsonova[a]

[a] *Department of Computational Biology, Center for Advanced Studies, St. Petersburg State Polytechnical University, Polytekhnicheskaya ul. 29, St. Petersburg, 195251 Russia*

e-mail: surkova@spbcas.ru

[b] *Physico-Technical Institute, Russian Academy of Sciences, Polytekhnicheskaya ul. 26, St. Petersburg, 194021 Russia*

[c] *University of Chicago, Chicago, 60637-1546 IL, United States*

Abstract—Living organisms well adapt themselves to changes in the environment and are robust to potential damage such as mutations. The epigenetic mechanism whereby the suppression of phenotypic variation is achieved has been dubbed canalization. This paper summarizes results of research that employed experimental and theoretical approaches to uncover the mechanisms of canalization of variation in expression of segmentation genes.

Keywords: developmental biology, mathematical modeling, canalization of development, fruit fly, segmentation

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 1, с. 20–29

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

УДК 577.218, 577.151.042

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ ДЕКОНДЕНСАЦИИ ХРОМАТИНА СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ТЕХНИКИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

© 2011 г. Е. В. Семенова, М. В. Филатов

Отделение молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН 188300 Гатчина, Ленинградская обл., Орлова роща

E-mail: filatov@omrb.pnpi.spb.ru

Поступила в редакцию 04.02.10 г.
Окончательный вариант 11.03.10 г.

Механизмы, обуславливающие радикальное изменение структуры хроматина мужских половых клеток в процессе оплодотворения, остаются во многом неясными. В данной работе представлены аргументы, указывающие на возможность существования энзимов с протеолитической активностью в ядрах зрелых сперматозоидов человека, и обсуждается предполагаемая роль этих неизвестных ранее эндогенных протеолитических активностей в декомпактизации хроматина сперматозоидов в оплодотворенной яйцеклетке. С помощью техники проточной цитометрии продемонстрировано, что обработка ядер сперматозоидов человека SH-содержащими реагентами не только разрушает дисульфидные связи между молекулами протаминов, что необходимо для их эффективного удаления, но также индуцирует специфическую эндогенную протеазную активность, следствием чего является достаточно быстрая деконденсация хроматина, сопровождающаяся протеолизом ядерных белков. Процесс деконденсации хроматина практически полностью блокируется различными ингибиторами сериновых протеаз и компонентами семенной жидкости.

С целью визуализации мест локализации белков с протеолитической активностью в ядрах мужских половых клеток использован оригинальный цитохимический подход – связывание флуоресцентно меченого ингибитора протеаз с исследуемым объектом.

Приведенные в работе факты позволяют предположить, что одним из факторов реорганизации структуры хроматина при формировании мужского пронуклеуса в процессе оплодотворения может быть эндогенная ядерная протеаза сперматозоида, активирующаяся под действием глутатиона или других SH-содержащих реагентов, которыми богата цитоплазма яйцеклетки.

Ключевые слова: ингибиторы протеаз, оплодотворение, проточная цитометрия, сперматозоиды человека, эндогенные ядерные протеазы.

Один из важнейших этапов процесса оплодотворения у человека – радикальная реорганизация структуры ядра мужских половых клеток после слияния с яйцеклеткой. Хроматин зрелых сперматозоидов отличается от хроматина других типов клеток не только по составу, но и по значительно более высокой степени компактизации: обычные гистоны почти на 85% замещаются специфическими основными белками протаминами, что ведет к практически полному отсутствию нуклеосомной организации ДНК; кроме того, дополнительная стабилизация достигается за счет формирования дисульфидных мостиков между молекулами протаминов. Очевидно, что после проникновения сперматозоида в яйцеклетку необходима обратная реорганизация хроматина и, следовательно, должны существовать факторы, обеспечивающие эффективность данного процесса, т.к. нарушение запрограммированной структурной перестройки хроматина сперматозоидов может привести к образованию дефектного мужского пронуклеуса и негативно повлиять на ранние стадии эмбриогенеза. В ооплазме инициируется декомпактизация плотно упакованного хроматина мужских половых клеток, сопровождающаяся заменой протаминов гистонами (Newport, 1987; Almouzni et al., 1990, 1991; Kleinchmidt, Steinbeisser, 1991; Almouzni, Wolffe, 1993; Bianchi et al., 1996; McLay, Clarke, 2003; van der Heijden et al., 2005; Ajduk et al., 2006). В результате генетический материал приобретает характерную для соматических клеток нуклеосомную структуру, что делает возможным его объединение в одном ядре с женским пронуклеусом и последующую адекватную экспрессию генетической информации. Однако молекулярно-клеточные механизмы, обуславливающие такую радикальную реорганизацию хроматина сперматозоидов, остаются во многом неясными.

Протеолиз играет весьма существенную роль при оплодотворении у млекопитающих. Известно, что протеолитические события сопровождают начальные этапы узнавания и взаимодействия яйцеклетки

и сперматозоида, лежат в основе разрушения спермийных митохондрий в ооците (Imschenetzky et al., 1999; Mochida et al., 2000; Sutovsky et al., 2000; Wojcik et al., 2000; Ziemba et al., 2002; Sutovsky, 2003; Yi et al., 2007; Chakravarty et al., 2008; Rawe et al., 2008; Zimmerman, Sutovsky, 2009). Протеазы участвуют и в реорганизации хроматина сперматозоида при формировании мужского пронуклеуса (Chang, Zirkin, 1978; Zirkin et al., 1980; Perreault, Zirkin, 1982; Marushige Y., Marushige K., 1983; Imschenetzky et al., 1997; 1999; Shimada et al., 2000; Concha et al., 2005; Monardes et al., 2005; Puchi et al., 2006; Gourdet et al., 2007; Iribarren et al., 2008; Morin et al., 2008). Что касается человека, то информация об обнаружении протеолитических ферментов в ядрах мужских половых клеток в литературе отсутствует.

В данной работе представлен ряд фактов, указывающих на то, что ядра зрелых сперматозоидов человека содержат энзимы, обладающие протеолитической активностью, определены условия их активации и места преимущественной локализации в ядре. Предполагается, что эти белки принимают участие в запрограммированной структурной перестройке хроматина в оплодотворенной яйцеклетке, по всей видимости, осуществляя протеолиз спермий-специфичных протаминов и белков ядерного матрикса, что способствует быстрой деконденсации хроматина и последующему восстановлению нуклеосомной организации мужского генома.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Стандартная процедура окрашивания клеток бромистым этидием для проточноцитометрических исследований

В каждом эксперименте использовались небольшие объемы семенного материала (0.5 мл). Сперматозоиды освобождали от семенной жидкости путем центрифугирования (5 мин. при 2000 об./мин) с последующей двукратной отмывкой в стандартном фосфатном буфере (150 мМ PBS, pH 7.0) (БиолоТ, С.-Петербург, Россия). Затем клетки переводили в тот же буфер (конечная концентрация 10^6 сперматозоидов в миллилитре), содержащий неионный детергент Triton X-100 (конечная концентрация 0.1%) (БиолоТ, С-Петербург, Россия) для разрушения цитоплазматической мембраны и освобождения ядер, стабильных в этих условиях. Окрашивание ядер интеркалирующим флуоресцентным красителем бромистым этидием (конечная концентрация 25 мкг/мл) (Sigma, St. Louis, MO, USA) проводили в течение 30 мин непосредственно перед проточноцитометрическим анализом.

Исследования проводились на сконструированном и собранном в ПИЯФ РАН проточном лазерном цитофлуориметре, измеряющем интенсивность флуоресценции и использующем в качестве источника света аргоновый лазер. Суспензия клеток подавалась при помощи шприцевого микронасоса под давлением в проточную камеру через сопло-инжектор. Гидродинамическое фокусирование обеспечивалось оболочечной струей по мере выхода клеток из сопла. Возбуждение флуоресценции осуществлялось аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Мощность излучения около 0.5 Вт. Горизонтальный размер лазерного фокального эллипса 80×10^{-6} м, вертикальный размер – 18×10^{-6} м. Диаметр потока суспензии равен 12×10^{-6} м в момент пересечения лазерного луча. Сигнал флуоресценции после прохождения серийного объектива 30/0.9, выделялся двухмиллиметровым стеклянным светофильтром КС-10 и фокусировался на фотокатод ФЭУ-84. Импульсы с ФЭУ усиливались спектрометрическим усилителем и подавались на многоканальный амплитудный анализатор, соединенный с компьютером. Условия проведения эксперимента позволяли нам регистрировать приблизительно 500 импульсов в секунду. Обработка полученных данных производилась с помощью специальной программы накопления и графического представления, написанной в ПИЯФ РАН.

Обработка ядер сперматозоидов SH-содержащими реагентами и различными ингибиторами протеаз

После трехкратной отмывки, позволяющей избавиться от нежелательных для последующего анализа компонентов семенной жидкости (различных протеаз и ингибиторов протеаз) и инкубации с детергентом в течение 15 минут при комнатной температуре, клетки делили на 3 аликвоты и снова центрифугировали дважды (10 мин при 5000 об./мин) в изотоническом фосфатном буфере, pH 7.0. С помощью данной процедуры мы отмывались от акросомальных протеолитических активностей. Затем ядра одной из аликвот ресуспендировали в том же буфере (150 мМ PBS, pH 7.0), а двух других аликвот в 10 мМ PBS, pH 8.5 (конечная концентрация 10^6 сперматозоидов в миллилитре). Все три аликвоты обрабатывались β-меркаптоэтанолом (конечная концентрация 20 мМ) (Сигма-Алдрич, Москва, Россия) или другими SH-содержащими реагентами (дитиотрейтол, цистеамин, восстановленный глутатион (dithiothreitol, cysteamine, reduced glutathione; Sigma, St. Louis, MO, USA)), а к третьей аликвоте, кроме того, добавлялся раствор какого-нибудь ингибитора протеаз серинового типа (фенилметилсульфонил флуорид (PMSF; Sigma, St. Louis, MO, USA), N-тозил-L-фенилаланин хлорометил кетон (N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone; Sigma, St Louis, MO, USA), бензамидин (benzamidine; Fluka, Buchs, Switzerland), ингибитор трипсина соевых бобов (SB-TI; Fluka, Buchs, Switzerland)) (конечная концентрация 5–25 мМ) или различные объемы семенной жидкости (разведение в 10, 100 и 1000 раз). В заключение ядра сперматозоидов окрашивались по стандартной методике.

Приготовление флуоресцентно меченого ингибитора трипсина соевых бобов

Ингибитор трипсина соевых бобов (SBTI; Fluka, Buchs, Switzerland) был растворен в 0.1 N содовом буфере (5 мМ Na_2CO_3, 90 мМ $NaHCO_3$; НеваРеактив, С.-Петербург, Россия), pH 8.9 до конечной концентрации 200 мг/мл. К раствору был добавлен флуорохром флуоресцеин изотиоцианат (FITC, isomer I; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (конечная концентрация 1 мг/мл), и при непрерывном помешивании смесь инкубировалась в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего была нанесена на колонку с G-50 Sephadex (Pharmacia, Uppsala, Sweden), уравновешенную водой. В заключении продукт был лиофильно высушен и проанализирован в соответствии с процедурой, предложенной Ваттом и Воссом (Watt, Voss, 1978). В среднем, по нашей оценке, с каждой молекулой ингибитора трипсина ковалентно связалось 3 остатка флуоресцеин изотиоцианата. Кроме того, обнаружено, что интенсивность флуоресценции меченного FITC ингибитора трипсина соевых бобов в фосфатном буфере не зависит от ионной силы раствора, но значительно возрастает при увеличении его pH (от 40 отн. ед. при pH 5.0 до 540 отн. ед. при pH 8.5). Измерения были проведены на спектрофлуориметре F-4010 фирмы "Hitachi" (Япония). Длина волны возбуждающего света 480 нм, максимум интенсивности флуоресценции зафиксирован при длине волны 520 нм.

Обработка сперматозоидов флуоресцентно меченым ингибитором трипсина соевых бобов

Сперматозоиды трижды отмывались в изотоническом фосфатном буфере (PBS), pH 7.0, обрабатывались 0.1% (v/v) Triton X-100 в том же буфере, и после 30-минутной инкубации при комнатной температуре снова трижды отмывались в 10 мМ PBS, pH 7.0. Затем клетки переводились в 10 мМ фосфатный буфер, pH 8.0 с добавлением 1% (v/v) бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma, St. Louis, MO, USA) для предотвращения неспецифического связывания и флуоресцентно меченого ингибитора трипсина соевых бобов (конечная концентрация 100 мкг/мл), и через 20 минут флуоресцирующие ядра наблюдались в микроскоп. Нами использовался флуоресцентный микроскоп Axioplan фирмы "Opton" (Германия).

В эксперименте по конкурентному связыванию концентрация немеченого ингибитора трипсина в 100 раз превышала концентрацию меченого ингибитора. Т.е. первоначально суспензия сперматозоидов в течение 20 минут инкубировалась с немеченым ингибитором трипсина соевых бобов (конечная концентрация 1мг/мл) и лишь затем к ней добавлялся меченый ингибитор трипсина.

В эксперименте по конкурентному связыванию компонентов семенной жидкости с эндогенными протеазами сперматозоидов использовалось десятикратное разведение семенной жидкости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исключительно плотная упаковка ДНК в ядрах сперматозоидов с помощью протаминов, дополнительно стабилизируемая внутри- и межмолекулярными дисульфидными мостиками, приводит к высоко эффективной ее экранировке от взаимодействия с различными ДНК-связывающими агентами (Haaf, Ward, 1995; Bottiroli et al., 1994; Kramer, Krawetz, 1997). В частности, окрашиваемость ДНК бромистым этидием существенно ниже в ядрах сперматозоидов по сравнению с соматическими клетками.

Инкубация ядер сперматозоидов в растворе, содержащем β-меркаптоэтанол, инициирует процесс декомпактизации хроматина, сопровождающийся постепенным увеличением размеров ядра (рис. 1). При этом доступность ДНК для связывания бромистого этидия существенно возрастает, что может быть зарегистрировано с помощью техники проточной цитофлуориметрии. Кинетика этого процесса представлена на рис. 2. Последующая инкубация приводит к полной потере целостности ядер и их механической деструкции. Аналогичные результаты были получены при использовании различных SH-содержащих реагентов, таких как дитиотрейтол, цистеамин, восстановленный глутатион и унитиол.

Следует отметить, что подобная реакция в значительной степени зависит от ионной силы и pH среды: оптимальными являются условия низкой ионной силы (10 мМ соли) и щелочных pH (8.0–8.5). В физиологических условиях процесс существенно заторможен.

Наблюдаемое раскрытие хроматина ядер спермиев человека может быть подавлено различными ингибиторами сериновых протеаз: фенилметилсульфонил флуоридом (PMSF), бензамидином, N-тозил-L-фенилаланин хлорометил кетоном, ингибитором трипсина соевых бобов (рис. 3). Этот факт свидетельствует об определяющей роли активируемой SH-содержащими реагентами эндогенной протеазы ядер сперматозоидов в декомпактизации хроматина. Результаты, полученные с помощью метода проточной цитометрии, подтверждаются данными белкового электрофореза: активация ассоциированной с хроматином протеазы приводит *in vitro* к постепенному протеолоизу, вплоть до полной деградации, практически всех ядерных белков сперматозоидов (данные не приводятся).

Интересным представляется тот факт, что исследуемая протеолитическая активность практически полностью блокируется компонентами семенной жидкости, даже при значительном ее разведении (рис. 3).

Предположение о ядерной локализации белков, обладающих протеазной активностью и участвую-

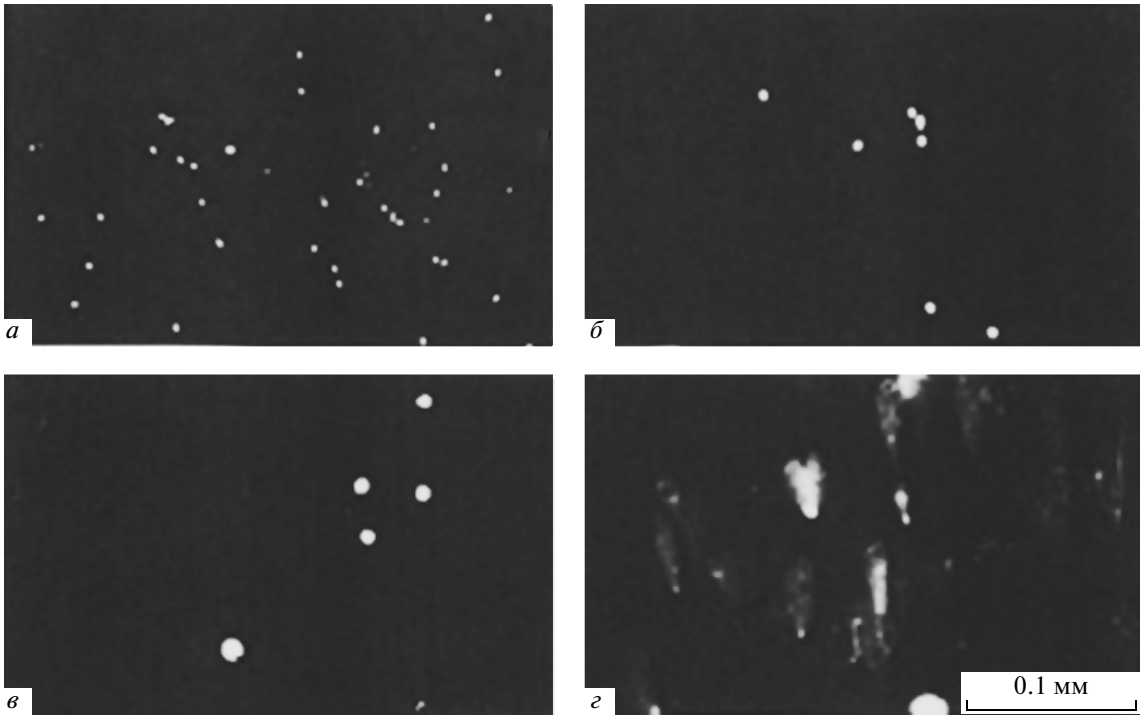


Рис. 1. Фотографии обработанных β-меркаптоэтанолом (конечная концентрация 20 мМ) и окрашенных бромистым этидием ядер сперматозоидов человека. Демонстрация деконденсации хроматина под действием эндогенной протеолитической активности, индуцированной SH-реагентом: *а* – необработанные ядра; *б* – время инкубации с β-меркаптоэтанолом 1 час; *в* – время инкубации с β-меркаптоэтанолом 2 часа; *г* – время инкубации с β-меркаптоэтанолом 24 часа (увеличение 200×).

щих в реорганизации хроматина мужских половых клеток при определенных условиях, может быть проверено прямой их визуализацией с помощью флуоресцентно меченого ингибитора протеаз. Известно, что протеазы образуют чрезвычайно стабильные, не менее стабильные, чем антиген–антитело, комплексы со своими ингибиторами (Tschesche, Macartney, 1981; Imajoh, Suzuki, 1985). Поэтому можно ожидать, что связывание флуоресцентно меченого ингибитора протеаз с исследуемым объектом обнаружит места локализации искомых протеаз. В наших исследованиях мы пометили соевый ингибитор трипсина флуоресцеин изотиоцианатом. Обработка ядер сперматозоидов этим ингибитором вызывает их флуоресцентное окрашивание, что указывает на ядерную локализацию рассматриваемых энзимов (рис. 4). Конкурентное связывание немеченого соевого ингибитора трипсина подавляло флуоресцентное окрашивание. Подавление окрашивания наблюдалось также при использовании для конкурентного связывания разведенной семенной жидкости, что подтверждает проточноцитометрические данные о наличии в ней белковых факторов, ингибирующих эндогенную протеолитическую активность сперматозоидов человека.

Для выяснения того, ассоциированы ли эндогенные протеолитические активности с хроматином ядер спермиев, был проделан следующий эксперимент: образец спермы делился на 3 равные части, обрабатывающиеся различными способами. В первой пробе клетки лизировали и инкубировали в среде, содержащей β-меркаптоэтанол, в малом объеме (в 8 раз меньшем, чем по стандартной методике). Во второй и третьей пробах клетки лизировали в большом избытке буфера (объем в 2 и 25 раз превосходил стандартный), после чего осаждали, еще раз промывали и только затем инкубировали в присутствии β-меркаптоэтанола. Т.к. процедура отмывки и существенное увеличение концентрации клеток не вызвали изменения положения пика на гистограмме распределения флуоресценции при проточноцитометрическом анализе, мы вправе сделать вывод о структурированности исследуемых протеолитических факторах в хроматин, поскольку известно, что зрелые спематозоиды практически лишены цитоплазмы и весь внутренний объем этих уникальных клеток заполнен высококонденсированным хроматином.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что протеолиз весьма существенен для сперматогенеза, оогенеза, оплодотворения и раннего эмбрионального развития у млекопитающих (Mochida et al., 2000; Wojcik et al., 2000; Ziemba et al., 2002; Sutovsky, 2003; Yi et al., 2007; Chakravarty et al., 2008; Rawe et al., 2008; Zimmerman, Sutovsky, 2009).

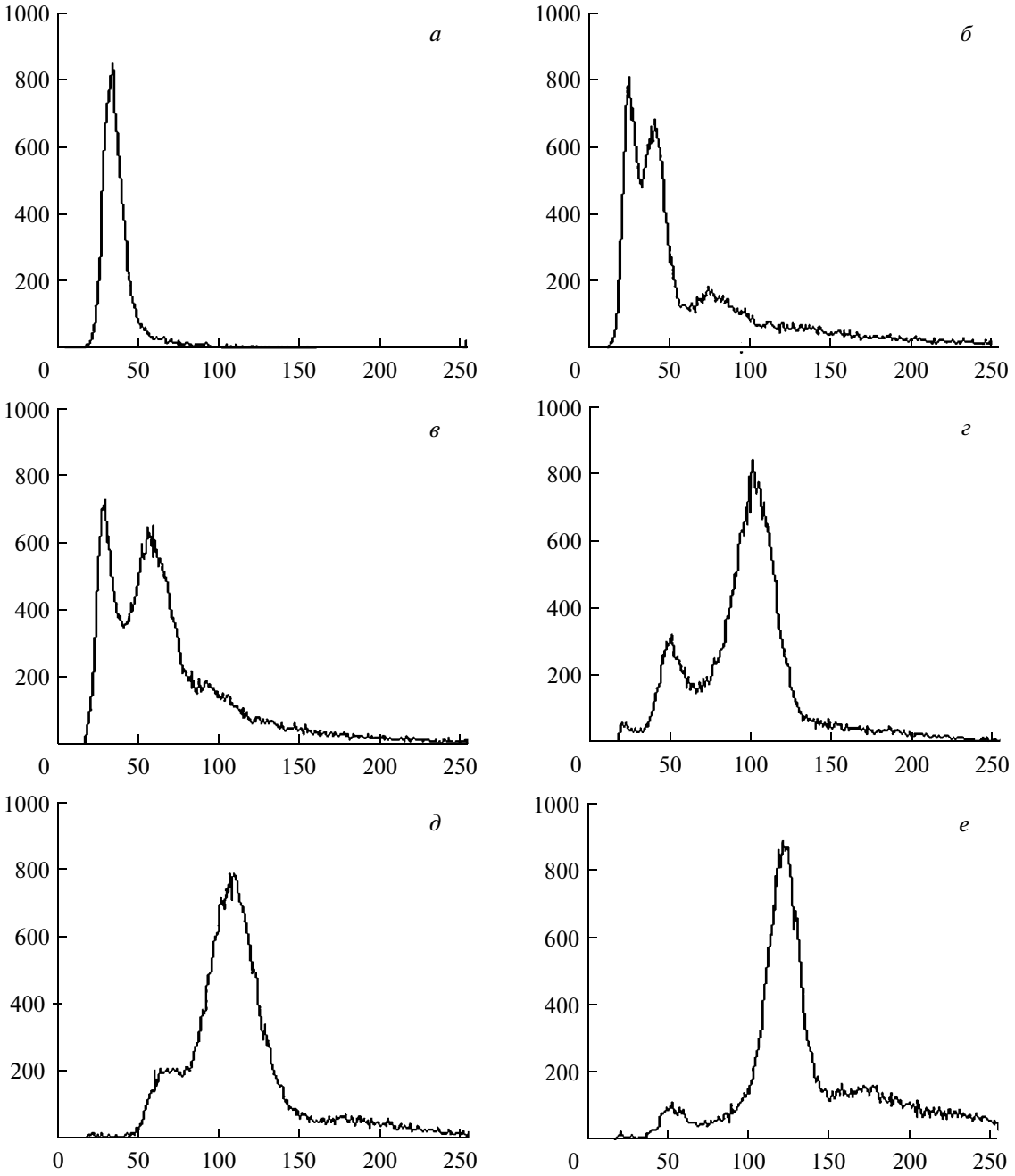


Рис. 2. Гистограмма распределения по интенсивности флуоресценции ядер сперматозоидов человека, обработанных β-меркаптоэтанолом и окрашенных бромистым этидием.

По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, отн. ед., по оси ординат – количество зарегистрированных событий.

Представлена кинетика процесса деконденсации хроматина под действием эндогенной протеолитической активности, индуцированной SH-реагентами. Время инкубации ядер сперматозоидов с β-меркаптоэтанолом: *а* – 0 минут; *б* – 15 минут; *в* – 30 минут; *г* – 60 минут; *д* – 90 минут; *е* – 120 минут.

На переднем полюсе головки мужской половой клетки под плазматической мембраной расположена особая структура – акросома. В процессе оплодотворения при контакте с яйцеклеткой оболочка акросомы разрывается и содержащиеся в ней протеолитические ферменты – гиалуронидаза и акрозин способствуют проникновению сперматозоида в яйцеклетку. Предполагается, что протеасомальные комплексы, обнаруженные в мужских половых клеток, так же играют важную роль при слиянии половых клеток (капацитация, индукция акросомального экзоцитоза, проникновение через зону пеллюцида) и на ранних стадиях развития зиготы (Sutovsky et al., 2000; Sutovsky, 2003; Yi et al., 2007; Chakravarty

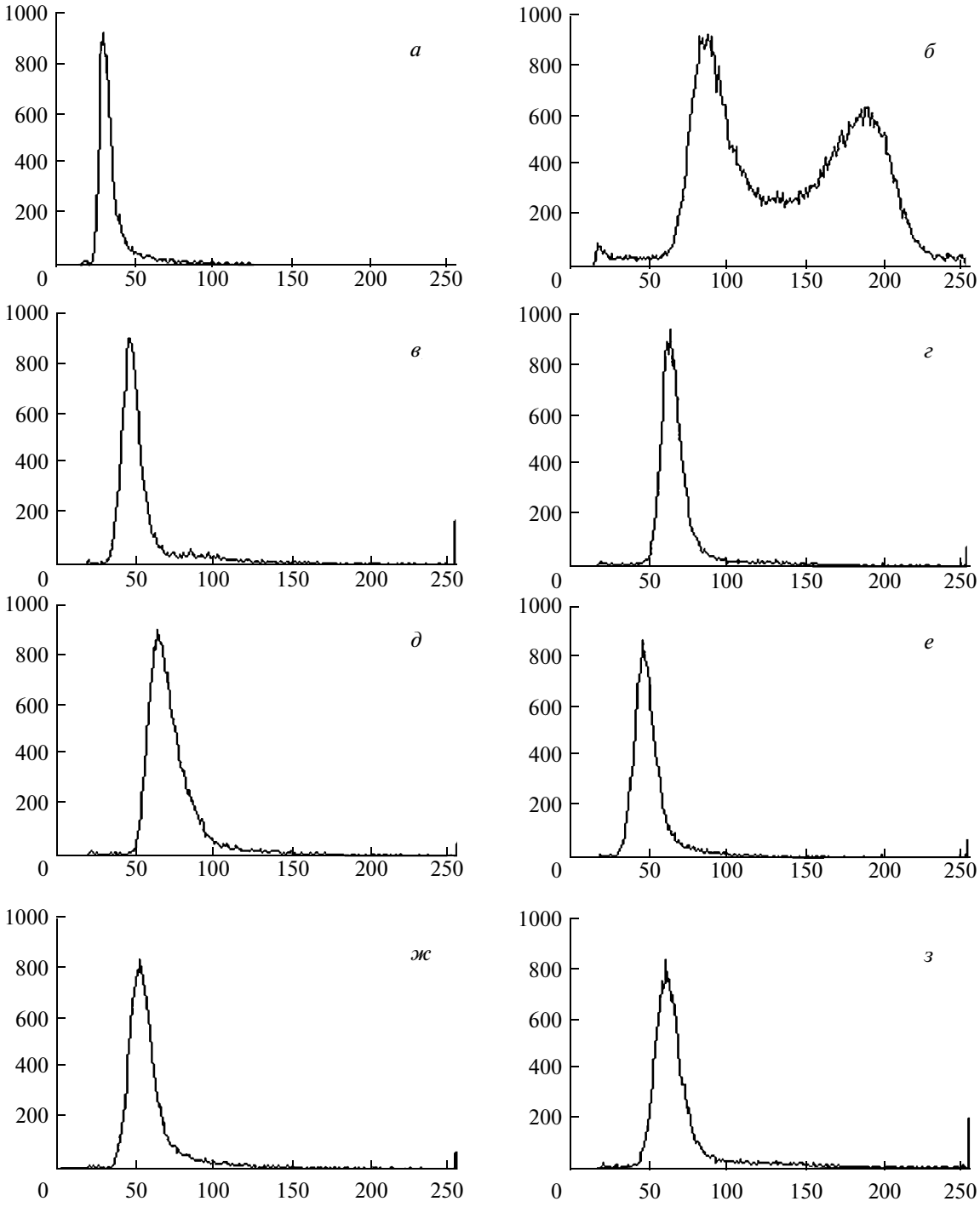


Рис. 3. Гистограмма распределения по интенсивности флуоресценции ядер сперматозоидов человека, окрашенных бромистым этидием и обработанных β-меркаптоэтанолом совместно с ингибиторами сериновых протеаз или различными концентрациями семенной жидкости.

По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, отн. ед., по оси ординат – количество зарегистрированных событий.

Демонстрация ингибирующего действия различных ингибиторов протеаз серинового типа и компонентов семенной жидкости на деконденсацию хроматина сперматозоидов, индуцируемую SH-реагентом: *а* – необработанные ядра; *б* – ядра, обработанные β-меркаптоэтанолом в течение 3-х часов; *в* – ядра, обработанные β-меркаптоэтанолом совместно с фенилметилсульфонил флуоридом (PMSF) в течение 3-х часов; *г* – ядра, обработанные β-меркаптоэтанолом совместно с бензамидином в течение 3-х часов; *д* – ядра, обработанные β-меркаптоэтанолом совместно с N-тозил-L-фенилаланин хлорометил кетоном в течение 3-х часов; *е* – ядра, обработанные β-меркаптоэтанолом совместно с ингибитором трипсина соевых бобов в течение 3-х часов; *ж* – ядра, обработанные β-меркаптоэтанолом совместно с разведенной в 10 раз семенной жидкостью в течение 3-х часов; *з* – ядра, обработанные β-меркаптоэтанолом совместно с разведенной в 1000 раз семенной жидкостью в течение 3-х часов.

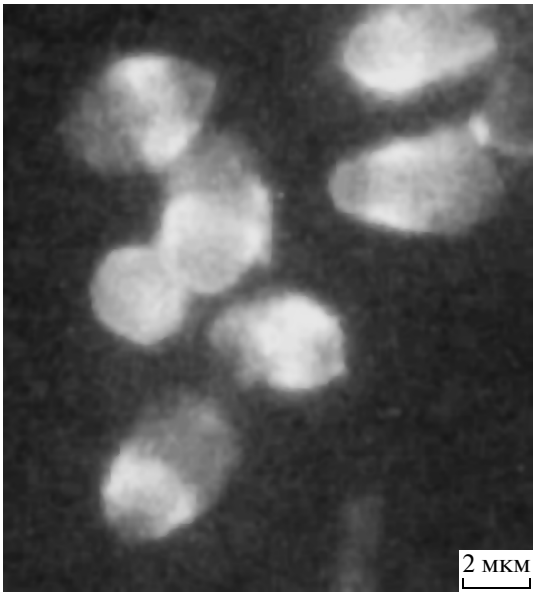


Рис. 4. Фотография обработанных ингибитором трипсина соевых бобов, меченным флуоресцеин изотиоцианатом (FITC, isomer I), сперматозоидов человека.
Демонстрация ядерной локализации эндогенной протеазы сперматозоидов человека (увеличение 1000×).

et al., 2008; Rawe et al., 2008; Zimmerman, Sutovsky, 2009). Причем, протеасомальная энзиматическая активность значительно снижена в популяции дефектных человеческих сперматозоидов (Ziemba et al., 2002; Rawe et al., 2008). Показано для быков и человека, что специфические протеасомные ингибиторы нарушают процессы формирования астера, пронуклеарного развития и объединения в одном ядре отцовского и материнского геномов (Rawe et al., 2008). При этом ингибиторы протеасом не оказывали никакого влияния на подвижность мужских половых клеток и акросомальную реакцию (Wojcik et al., 2000). Посредством иммуногистохимических исследований с помощью меченых моно- и поликлональных антител были определены места локализации протеасом в сперматозоидах человека. Протеасомальные антигены были зафиксированы в акросомальной и околоакросомальной областях, в шейном отделе и в непосредственной близости от центриолей, но не в ядрах и не в хвостах сперматозоидов (Wojcik et al., 2000; Biały et al., 2001; Ziemba et al., 2002; Rawe et al., 2008). Т.е. протеасомальные энзиматические активности пространственно удалены от конденсированного хроматина зрелых мужских половых клеток.

В нашей работе представлен ряд фактов, указывающих на то, что ядра зрелых сперматозоидов человека могут содержать энзимы, обладающие протеолитической активностью. Эти активности в присутствии SH-содержащих реагентов вызывают драматическую декомпактизацию хроматина сперматозоидов (рис. 1, 2), сопровождающуюся протеолизом спермий-специфичных протаминов и, возможно, белков ядерного матрикса, принимающих участие в сохранении иерархических уровней организации хроматина мужских половых клеток. Мы вправе сделать такой вывод, поскольку эксперименты проводились в условиях низкой ионной силы и в отсутствие каких-либо дополнительных веществ, способных столь радикальным образом воздействовать на исключительно плотно упакованный хроматин зрелых сперматозоидов. Используя флуоресцентно меченый ингибитор протеаз, прямо продемонстрирована ядерная локализация энзимов, обладающих протеолитической активностью (рис. 4).

Определенные нами условия активации исследуемых факторов декомпактизации хроматина сперматозоидов, в первую очередь наличие SH-содержащих реагентов, наводят на мысль о возможной структурированности энзимов, обладающих протеолитической активностью, в хроматин с помощью дисульфидных мостиков. Это предположение подтверждается несколькими примерами из литературы. В частности, в ядрах тимоцитов крысы обнаружены прочно связанные с гистонами протеазы, причем распад комплекса протеаза–гистон происходил только в присутствии дитиотрейтола (Газиев и др., 1992). Кроме того, продемонстрировано для различных клеток, что эндогенные протеазы неактивны, пока они иммобилизованы в структуру хроматина, и активируются при диссоциации (Anachkova, Russev, 1977; Lipinska et al., 1980).

Восстановленный глутатион и другие SH-содержащие вещества в достаточных количествах присутствуют в ооплазме и, следовательно, могут активировать ядерную протеазу сперматозоидов человека. Более того, структурная реорганизация хроматина мужских половых клеток находится в прямой зависимости от цитоплазматических факторов оплодотворенного ооцита, включая восстановленный глутатион (Perreault et al., 1988; Sutovsky, Schatten, 1997), и необходим свободный доступ этих молекул к хроматину сперматозоидов (Poccia, Collas, 1996). В частности показано, что в процессе формирования пронуклеуса у быков участвует глутатион ооплазмы, восстанавливающий дисульфидные связи, стабилизирующие структуру хроматина зрелых сперматозоидов (Sutovsky, Schatten, 1997).

Установленный нами факт, что компоненты семенной жидкости блокируют активность эндогенной протеазы сперматозоидов, не выглядит удивительным, т.к. известно несколько ингибиторов протеиназ, входящих в состав семенной жидкости человека (HSTPL, PCI, холестерол) (Hara et al., 1993; Zheng et al., 1994; Cross, 1996). Возможно, эти молекулы не только ингибируют развитие акросомальной реакции, как считалось до сих пор, но и предохраняют ядерные белки мужских половых клеток от преждевременной деградации. Следует подчерк-

нуть, что, по крайней мере, одно из этих природных веществ – HSTPI – трипсин-подобный ингибитор протеиназ (Hara et al., 1993).

Таким образом, логично предположить, что при оплодотворении отцовская эндогенная протеаза попадает в материнскую яйцеклетку в плотно ассоциированном с хроматином виде и может в дальнейшем принимать участие в запрограммированной структурной реорганизации мужского генома. Это предположение согласуется с результатами ряда работ, в которых показано для нескольких видов животных, что процесс деконденсации хроматина сперматозоидов в ооците инициируется SH-содержащими реагентами и сопровождается протеолизом спермий-специфичных белков (Marushige Y., Marushige K., 1975, 1978, 1983; Chang, Zirkin, 1978; Zirkin et al., 1980; Perreault, Zirkin, 1982; Imschenetzky et al., 1997; 1999; Shimada et al., 2000; Concha et al., 2005; Monardes et al., 2005; Puchi et al., 2006; Gourdet et al., 2007; Iribarren et al., 2008; Morin et al., 2008).

С точки зрения полученных нами результатов вызывают интерес исследования, посвященные ассоциированной с хроматином зигот морского ежа цистеиновой протеазе (Imschenetzky et al., 1997). Активность данной протеазы оказалась pH-зависимой: при pH 7.8–8.0 (pH оплодотворенной яйцеклетки) она расщепляет пять спермий-специфичных гистонов (аналогов протаминов), в то время как гистоны, характерные для стадий дробления, остаются интактными (Imschenetzky et al., 1997, 1999). По мнению авторов, ей принадлежит важная роль в замещении спермий-специфичных белков на соматические гистоны в процессе образования мужского пронуклеуса. Существенно, что трансформация первоначально плотно конденсированного хроматина сперматозоидов морских ежей в более рыхлую структуру, характерную для пронуклеуса, ингибировалась N-ethylmaleimide – веществом, блокирующим размыкание SH-групп (Imschenetzky et al., 1999). Для сперматозоидов другого вида морских животных (sand dollar) показано, что активация 26S протеасом зависит от роста внутриклеточного pH ооплазмы при оплодотворении (Chiba et al., 1999). Требование щелочных pH для индукции протеолитических активностей ядер сперматозоидов человека, возможно, является дополнительным подтверждением их участия в реорганизации хроматина при формировании мужского пронуклеуса, т.к. эти значения (8.0–8.5) совпадают с pH ооплазмы.

Очевидно, что дальнейшие исследования в этом направлении будут способствовать лучшему пониманию процесса оплодотворения у человека в целом. Поскольку даже незначительные дефекты в структурной организации ядер сперматозоидов вызывают нарушения реорганизации хроматина в ооците и последующих этапов эмбриогенеза, изучение функциональной роли при оплодотворении обнаруженных нами ядерных белков сперматозоидов человека, обладающих протеолитической активностью, возможно, поможет в будущем для диагностики и лечении некоторых видов мужского бесплодия.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят сотрудницу нашего отдела Л.С. Исаеву-Иванову за консультации и помощь в приготовлении флуоресцентно меченого ингибитора трипсина соевых бобов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Газиев А., Куцый М., Закржевская Д. Ассоциация протеиназ с гистонами ядер тимуса крысы // Мол. Биол. 1992. Т. 26. № 3. С. 532–539.

Ajduk A., Yamauchi Y., Ward M.A. Sperm chromatin remodeling after intracytoplasmic sperm injection differs from that of *in vitro* fertilization // Biol. Reprod. 2006. V. 75. № 3. P. 442–451.

Almouzni G., Clark D., Mechali M. et al. Chromatin assembly on replicating DNA *in vitro* // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18. P. 5767–5774.

Almouzni G., Mechali M., Wolffe A.P. Transcription complex disruption caused by a transition in chromatin structure // Mol. Cell Biol. 1991 V. 11. P. 655–665.

Almouzni G., Wolffe A.P. Nuclear assembly, structure and function: the use of *Xenopus in vitro* systems // Exp. Cell Res. 1993. V. 205. P. 1–15.

Anachkova B., Russev G. Endogenous proteolytic activity of chromatin // Acta. Biol. Med. Ger. 1977. V. 36. № 11–12. P. 1945–1950.

Biały L.P., Ziemba H.T., Marianowski P. et al. Localization of a proteasomal antigen in human spermatozoa: immunohistochemical electron microscopic study // Folia Histochem. Cytobiol. 2001. V. 39. № 2. P. 129–130.

Bianchi P.G., Manicardi G., Urner F. et al. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa // Mol. Hum. Reprod. 1996. V. 2. № 3. P. 139–144.

Bottiroli G., Croce A.C., Pellicciari C. et al. Propidium iodide and the thiol-specific reagent DACM as a dye pair for fluorescence resonance energy transfer analysis: an application to mouse sperm chromatin // Cytometry. 1994. V. 15. P. 106–116.

Chakravarty S., Bansal P., Sutovsky P. et al. Role of proteasomal activity in the induction of acrosomal exocytosis in human spermatozoa // Reprod. Biomed. Online. 2008. V. 16. № 3. P. 391–400.

Chang T.S., Zirkin B.R. Proteolytic degradation of protamine during thiol-induced nuclear decondensation in rabbit spermatozoa // J. Exp. Zool. 1978. V. 204. № 2. P. 283–289.

Chiba K., Alderton J.M., Hoshi M. et al. Activation of the proteasomes of sand dollar eggs at fertilization depends on the intracellular pH rise // Dev. Biol. 1999. V. 209. № 1. P. 52–59.

Concha C., Morin V., Bustos P. et al. Cysteine-protease involved in male chromatin remodeling after fertilization

co-localizes with alpha-tubulin at mitosis // J. Cell Physiol. 2005. V. 202. № 2. P. 602–607.

Cross N.L. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesteron: cholesterol is the major inhibitor // Biol. Reprod. 1996. V. 54. P. 138–145.

Gourdet C., Iribarren C., Morin V. et al. Nuclear cysteine-protease involved in male chromatin remodeling after fertilization is ubiquitously distributed during sea urchin development // J. Cell Biochem. 2007. № 1. V. 101. P. 1–8.

Haaf T., Ward D.C. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers // Exp. Cell Res. 1995. V. 219. P. 604–611.

Hara I., Matsuda Y., Kaneko S. et al. Human seminal plasma proteinase inhibitor: action toward some trypsin-like arginine amidases from humans // Arch. Androl. 1993. V. 31. P. 23–29.

van der Heijden G.W., Dieker J.W., Derijck A.A. et al. Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote // Mech. Dev. 2005. V. 122. № 9. P. 1008–1022.

Imajoh S., Suzuki K. Reversible interaction between Ca^{2+}-activated neutral protease (CANP) and its endogenous inhibitor // FEBS Lett. 1985. V. 187. P. 47–50.

Imschenetzky M., Diaz F., Montecino M. et al. Identification of a cysteine protease responsible for degradation of sperm histones during male pronucleus remodeling in sea urchins // J. Cell Biochem. 1997. V. 67. № 3. P. 304–315.

Imschenetzky M., Puchi M., Morin V. et al. Potential involvment of post-translational modifications as a mechanism modulating selective proteolysis after fertilization // J. Cell Biochem. 1999. V. 32/33. P. 149–157.

Iribarren C., Morin V., Puchi M. et al. Sperm nucleosomes disassembly is a requirement for histones proteolysis during male pronucleus formation // J. Cell Biochem. 2008. V. 103. № 2. P. 447–455.

Kleinchmidt J., Steinbeisser H. DNA dependent phosphorylation of histone H2A.X during nucleosome assembly in *Xenopus laevis* oocytes: involvment of protein phosphorylation in nucleosome spacing // EMBO J. 1991. V. 10. P. 103043–103050.

Kramer J.A., Krawetz S.A. RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome // Mol. Hum. Reprod. 1997. V. 3. P. 473–478.

Lipinska A., Krawczyk Z., Krajewska W. et al. Activity of chromatin-bound protease in histone fractions from rat liver and Morris hepatoma // Neoplasm. 1980. V. 27. № 4. P. 409–413.

Marushige Y., Marushige K. Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 403. № 1. P. 180–191.

Marushige Y., Marushige K. Dispersion of mammalian sperm chromatin during fertilization: an *in vitro* study // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 519. № 1. P. 1–22.

Marushige Y., Marushige K. Proteolysis of somatic type histones in transforming rat spermatid chromatin // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V. 761. № 1. P. 48–57.

McLay D.W., Clarke H.J. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals // Reproduction. 2003. V. 125. № 5. P. 625–633.

Mochida K., Tres L., Kierszenbaum A. Structural features of the 26S proteasome complex isolated from rat testis and sperm tail // Mol. Reprod. Dev. 2000. V. 57. № 2. P. 176–184.

Monardes A., Iribarren C., Morin V. et al. During male pronuclei formation chromatin remodeling is uncoupled from nucleus decondensation // J. Cell Biochem. 2005. V. 96. № 6. P. 235–241.

Morin V., Sanchez A., Quiñones K. et al. Cathepsin L inhibitor I blocks mitotic chromosomes decondensation during cleavage cell cycles of sea urchin embryos // J. Cell Physiol. 2008. V. 216. № 3. P. 790–795.

Newport J. Nuclear reconstitution *in vitro*: stages of assembly around protein-free DNA // Cell. 1987. V. 48. P. 205–217.

Perreault S.D., Barbee R.R., Slott V.L. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes // Dev. Biol. 1988. V. 125. № 1. P. 181–186.

Perreault S.D., Zirkin B.R. Sperm nuclear decondensation in mammals: role of sperm-associated proteinase *in vivo* // J. Exp. Zool. 1982. V. 224. № 1. P. 253–257.

Poccia D., Collas P. Transforming sperm nuclei into male pronuclei *in vivo* and *in vitro* // Curr. Top. Dev. Biol. 1996. V. 34. P. 25–88.

Puchi M., Quiñones K., Concha C. et. al. Microinjection of an antibody against the cysteine-protease involved in male chromatin remodeling blocks the development of sea urchin embryos at the initial cell cycle // J. Cell Biochem. 2006. V. 98. № 2. P. 335–342.

Rawe V.Y., Díaz E.S., Abdelmassih R. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans // Hum Reprod. 2008. V. 23. № 3. P. 573–580.

Rousseaux J., Rousseaux-Prevost R. Molecular localization of free thiols in human sperm chromatin // Biol. Reprod. 1995. V. 52, N 5. P. 1066–1072.

Shimada A., Kikuchi K., Noguchi J. et al. Protamine dissociation before decondensation of sperm nuclei during *in vitro* fertilization of pig oocytes // J. Reprod. Fertil. 2000. V. 120. № 2. P. 247–256.

Sutovsky P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone // Microscopy Res. and Techn. 2003. V. 61. № 1. P. 88–102.

Sutovsky P., Moreno R.D., Ramalho-Santos J. et al. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos // Biol. Reprod. 2000. V. 63. № 2. P. 582–90.

Sutovsky P., Schatten G. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization // Biol. Reprod. 1997. V. 56. № 6. P. 1503–1512.

Tschesche H., Macartney H. A new principle of regulation of enzymic activity. Activation and regulation of human polymorphonuclear leukocyte collagenase via disulfide-thiol exchange as catalysed by the glutathione cycle in a peroxidase-coupled reaction to glucose metabolism // Eur. J. Biochem. 1981. V. 120. P. 183–190.

Watt R., Voss E. Characterization of affinity-labeled fluorescyl ligand to specifically-purified rabbit IgG antibodies // Immunochem. 1978. V. 15. P. 875–882.

Wojcik C., Benchaib M., Lornage J. et al. Proteasomes in human spermatozoa // Int. J. Androl. 2000. V. 23. № 3. P. 169–177.

Yi Y.J., Manandhar G., Oko R.J. et al. Mechanism of sperm-zona pellucida penetration during mammalian fertilization: 26S proteasome as a candidate egg coat lysin // Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 2007. V. 63. P. 385–408.

Zheng X., Geiger M., Ecke S. et al. Inhibition of acrosin by protein C inhibitor and localization of protein C inhibitor to spermatozoa // Am. J. Physiol. 1994. V. 267. № 2. P. 466–472.

Ziemba H., Biały L.P., Fracki S. et al. Proteasome localization and ultrastructure of spermatozoa from patients with varicocele-immunoelectron microscopic study // Folia Histochem. Cytobiol. 2002. V. 40. № 2. P. 169–170.

Zimmerman S., Sutovsky P. The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization // J. Reprod Immunol. 2009. V. 83. № 1–2. P. 19–25.

Zirkin B.R., Chang T.S., Heaps J. Involvement of an acrosinlike proteinase in the sulfhydryl-induced degradation of rabbit sperm nuclear protamine // J. Cell Biol. 1980. V. 85. № 1. P. 116–121.

Study of Chromatin Decondensation Factors in Human Spermatozoids by Flow Cytometry

E. V. Semenova and M. V. Filatov

Division of Molecular and Radiation Biophysics, Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Gatchina, Leningrad oblast, Orlova Roshcha, 188300 Russia

e-mail: filatov@omrb.pnpi.spb.ru

Abstract—To date, the mechanisms responsible for radical change of chromatin structure in male germ cells during fertilization are unclear. Evidence suggesting the existence of proteolytic nuclear enzymes in mature human spermatozoids are presented in this work. The possible role of these previously unknown proteases in decondensation of chromatin of spermatozoids in a fertilized ovum is discussed. Application of the flow cytometry technique has shown that treatment of human spermatozoid nuclei with SH-reagents leads not only to destruction of disulfide bonds between protamine molecules that is necessary for their effective utilization but also induces specific endogenous proteolytic activity that consequently results in rather fast decondensation of chromatin followed by proteolytic cleavage of nuclear proteins. A chromatin decondensation process can be almost totally blocked by serine protease inhibitors and components of seminal fluid.

An original cytochemical approach of binding of fluorescently labeled protease inhibitor to the target of investigation has been used in order to visualize the localization of proteases in male germ cell nuclei.

The results of our study suggest that one of the factors of chromatin reorganization involved in the formation of male pronucleus is endogenous nuclear protease of spermatozoids, which is activated by glutathione or other SH-components of ovum cytoplasm.

Keywords: protease inhibitors, fertilization, flow cytometry, human spermatozoids, endogenous nuclear proteases

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 1, с. 30–50

ФИЗИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

УДК 616-036.8-053.9:575.1

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2011 г. А. М. Вайсерман, В. П. Войтенко, Л. В. Мехова

ГУ "Институт геронтологии" АМН Украины 04114 Киев, ул. Вышгородская, д. 67

E-mail: vaiserman@geront.kiev.ua

Поступила в редакцию 18.01.10 г.
Окончательный вариант получен 11.04.10 г.

В большом количестве исследований показано, что организм наиболее чувствителен к различным воздействиям на протяжении периода пре- и постнатального развития. Эти воздействия приводят к тому, что изменения на протяжении критических периодов созревания, связанные с онтогенетической пластичностью, приводят к перманентным изменениям в структуре и функции определенных органов и систем организма. Предполагается, что основным молекулярным механизмом "онтогенетического программирования" являются изменения, происходящие на эпигенетическом уровне (включающие изменения в генетической экспрессии, которые возникают без изменений в структуре ДНК). В обзоре рассмотрены экспериментальные и эпидемиологические доказательства того, что эпигенетические процессы играют важную роль также на поздних этапах жизни и могут в значительной степени определять особенности старения и предрасположенность к возраст-зависимым заболеваниям, в том числе раку, кардиоваскулярным и нейродегенеративным заболеваниям, а также диабету 2 типа.

Ключевые слова: возраст-зависимые заболевания, программирование, старение, эпигенетические модификации.

До недавнего времени предполагалось, что риск возникновения тех или иных возраст-зависимых заболеваний зависит от генетической предрасположенности и средовых факторов, являющихся триггерами патологических процессов (включая доступность пищевых ресурсов, инфекции, физическую активность, социальное поведение и др.). Доминировало мнение, что на генетическом уровне предрасположенность к заболеваниям зависит от изменений линейной структуры ДНК в результате мутаций (делеций, тамдемных дупликаций, амплификаций генов и т.д.), приводящих к искажению регулирования экспрессии генов (Kroll, 2004; Liu, Freedman, 2005; Moore, 2005; Scher, Sawyers, 2005; Tusie, 2005; Soussi et al., 2006; Garg, 2006). Генетическая эпидемиология и сейчас является ключевым компонентом эпидемиологической парадигмы (Khoury, 1997, 2003; Burke, Press, 2006). Известно, что развитие многих заболеваний, например, муковисцидоза (цистического фиброза), практически полностью зависит от единичной генетической мутации (Strausbaugh, Davis, 2007).

В то же время, риск возникновения многих заболеваний не может быть сведен только к определенным генетическим детерминантам. В некоторых случаях воздействие тех или иных средовых факторов приводит к увеличению темпа мутирования, числа генетических повреждений и, вследствие этого, к возникновению определенных заболеваний (Smith et al., 1998; Ha et al., 2002; Jones et al., 2002; Meng et al., 2005). Средовые факторы могут также влиять на генетическую экспрессию, не влияя на последовательность нуклеотидных оснований, входящих в состав ДНК (т.е., индуцируя определенные эпигенетические изменения). К эпигенентическим модификациям относят митотически (иногда – и мейотически) наследуемые изменения, не изменяющие последовательности нуклеотидов в составе ДНК. В отличие от первичной структуры ДНК организма, которая окончательно фиксируется в процессе оплодотворения и в дальнейшем может изменяться только за счет мутаций, эпигенетические метки достаточно динамичны, крайне чувствительны к различным средовым влияниям и могут изменяться на протяжении всей жизни (Fraga et al., 2005a, b; Fraga et al., 2007; Fraga, Esteller, 2007; Bjornsson et al., 2008;). Индуцированные средовыми воздействиями эпигенетические изменения ДНК могут быть адаптивными, обусловливающими лучшее функционирование организма в изменяющемся окружении (Gravina, Vijg, 2009), но могут также являться причиной различных заболеваний (Jiang et al., 2004; Godfrey et al., 2007; Dolinoy et al., 2007b; Foley et al., 2009; Szyf, 2009).

Существенный вклад в рассматриваемую проблему внес английский исследователь Конрад Уод-

дингтон, автор ряда концепций зародышевого развития (Уоддингтон, 1947, 1964). Ему же принадлежит термин "эпигенетика", введенный в 40-х годах XX столетия для описания изменений экспрессии генов в ходе развития. Уоддингтон подвергал куколок дрозофил тепловому шоку и наблюдал изменение паттернов жилкования крыльев у взрослых мух (Waddington, 1957). Измененные фенотипы воспроизводились в популяции на протяжении долгого времени после устранения индуцировавшего их стимула. Это дало возможность предположить, что воздействие определенного средового фактора на протяжении критических периодов развития может продуцировать фенотипические изменения, которые сохраняются на протяжении всей жизни и даже могут переходить в последующие поколения. Уоддингтон назвал этот феномен "генетической ассимиляцией". В современной литературе чаще используют термин "эпигенетика".

Эпигенетику можно определить как процесс взаимодействия генотипа организма со средой при формировании фенотипа. Она изучает механизмы, при помощи которых на основе генетической информации, заключенной в одной клетке (зиготе) за счет различной экспрессии генов в различных типах клеток может осуществляться развитие многоклеточного организма, состоящего из дифференцированных клеток (Akhtar, Cavalli, 2005). Нужно отметить, что многие исследователи до сих пор относятся к эпигенетике скептически, поскольку в ее рамках допускается вероятность негеномного наследования в качестве адаптивного ответа на средовые изменения, что противоречит доминирующей в настоящее время геноцетрической парадигме (Jaenisch, Bird, 2003; Godfrey et al., 2007).

Механизмы эпигенетического регулирования

Изучение эпигенетических механизмов – достаточно активно развивающаяся в последние годы область научных исследований. Основными механизмами эпигенетического контроля считаются метилирование ДНК, ремоделирование хроматина, регуляция на уровне РНК (в частности, РНК-интерференция), прионизация белков и инактивация Х-хромосом (Morris, 2005; Cheung, Lau, 2005; Esteller, 2005).

Наиболее хорошо изученным к настоящему времени эпигенетическим механизмом является метилирование цитозиновых оснований ДНК (Holliday, 1989; Ванюшин, 2006). Начало интенсивным исследованиям роли метилирования в регуляции генетической экспрессии, в том числе при старении, было положено еще в 70-е годы прошлого века пионерскими работами Ванюшина Б.Ф. и Бердышева Г.Д. с соавт. (Ванюшин, 1974; Ванюшин и др., 1974, 1979, 1980; Ванюшин, Бердышев, 1977; Vanyushin et al., 1970). Процесс метилирования ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции С5 цитозинового кольца (Bird, 2007; Chandler, 2007). Метилирование ДНК, в основном, присуще эукариотам. У человека метилировано около 1% геномной ДНК. За процесс метилирования ДНК отвечают три фермента, называемые ДНК-метилтрансферазами 1, 3а и 3b (DNMT1, DNMT3a и DNMT3b, соответственно). Предполагается, что DNMT3a и DNMT3b – это *de novo* метилтрансферазы, которые осуществляют формирование паттерна метилирования ДНК на ранних стадиях развития, а DNMT1 осуществляет метилирование ДНК на более поздних этапах жизни организма. Функция метилирования заключается в активации/инактивации гена. Метилирование приводит к подавлению активности гена, а деметилирование – к его активации. Показано, что даже незначительные изменения в уровне метилирования ДНК могут существенно изменять уровень генетической экспрессии (Boyes, Bird, 1992; Hsieh, 1994). Как отмечал в 1989 году Р. Холлидей, метильная группа выполняет роль "предохранителя". Чем меньше метильных групп – тем более клетка дифференцирована. Чем выше степень метилирования ДНК, тем ниже степень дифференцировки, тем клетка моложе (Holliday, 1989). Классическим примером деметилирования, широко упоминаемым в литературе, является онтогенез некоторых видов лососевых рыб. Практически мгновенное старение рыб этого вида непосредственно после нереста сопровождается массивным деметилированием ДНК.

Другим достаточно хорошо изученным эпигенетическим механизмом является модификация гистонов. Одними из наиболее изученных являются пост-трансляционные модификации N-концевых хвостиков гистонов путем их ацетилирования. Сниженная аффинитивность (сродство) ацетилированных гистонов с ДНК приводит к разрыхлению структуры хроматина и, соответственно, к увеличению траскрипционной активности генов. Напротив, деацетилирование гистонов связано со снижением транскрипционной активности и гетерохроматизацией. Модификация гистонов и метилирование ДНК совместно определяют особенности упаковки хроматина, от которой, в свою очередь, зависит то, какие гены или наборы генов транскрибируются. Однако, до сих пор не выяснено, влияют ли средовые факторы на "гистоновый код" и на метилирование ДНК сходным образом.

В последнее время большое внимание привлечено к изучению роли в процессах регуляции генетической активности малых интерферирующих РНК (si-RNA) (Verdel et al., 2004; Matzke, Birchler, 2005). Интерферирующие РНК могут изменять стабильность и трансляцию мРНК путем моделирования функций полисом и структуры хроматина.

Эпигенетика и развитие

Метилирование является очень динамичным процессом, особенно на протяжении раннего эмбриогенеза. Процессы, связанные с метилированием, определяют инактивацию Х-хромосом, геномный импринтинг и клеточную дифференцировку. Механизмы глобального эпигенетического перепрограммирования генома клетки в ходе клеточного цикла хорошо изучены в экспериментальных исследованиях, осуществленных на клеточных культурах (Brown et al., 2007; Kangaspeska et al., 2008; Metivier et al., 2008). Во время индивидуального развития млекопитающих первоначально метилированные геномы сперматозоидов и яйцеклеток уже к началу восьмиклеточной стадии бластоцитов подвергаются глобальному деметилированию. На стадии имплантации эмбриона паттерны метилирования восстанавливаются *de novo*. На протяжении жизни взрослого организма паттерны метилирования специфичны для каждого типа клеток и тканей. Показано, однако, что изменения метилирования ДНК могут происходить даже в полностью дифференцированных постмитотических клетках. Например, в нейронах были выявлены модификации метилирования ДНК, связанные с напряженной мозговой деятельностью (обучением, запоминанием и т.д.) (Martinowich et al., 2003). Искажение этих паттернов во взрослой жизни связано со старением и развитием заболеваний (Monk et al., 1987; Kafri et al., 1992; Issa, 2000).

В большом количестве работ получены подтверждения того, что индуцированные воздействием определенных средовых стимулов эпигенетические изменения являются наследуемыми. Эпигентические метки могут переноситься не только в дочерние клетки в ходе соматических делений (Bird, 2007), но в некоторых случаях, они сохраняются в ходе эпигенетического ремоделирования в процессе гаметогенеза и раннего эмбриогенеза и могут быть перенесены от предков к потомкам (Chong, Whitelaw, 2004; Saze, 2008; Johannes et al., 2009). Этот процесс был неоднократно продемонстрирован в экспериментальных исследованиях, но существуют также доказательства перенесения эпигенетических маркеров в следующие поколения и для человека (Suter, 2004). Таким образом, эпигенетические модификации могут наследоваться как в ходе митотических, так и мейотических делений (Rakyan et al., 2002; Rakyan et al., 2003; Anway et al., 2005).

Прогностический адаптивный ответ

Большинство систем человеческого организма начинают развиваться вскоре после начала беременности и полностью созревают только через недели, месяцы или даже годы после рождения. Организм наиболее чувствителен к внешним воздействиям (включая гипоксию, повышенный или пониженный уровень материнской заботы, инфекции, гормональное воздействие, влияние химических препаратов и токсинов) на протяжении относительно долгого процесса внутриутробного развития и периодов постнатального и (вероятно) препубертатного созревания. Эти воздействия приводят к тому, что изменения на протяжении критических периодов созревания, связанные с онтогенетической пластичностью, приводят к перманентным изменениям в структуре и функции определенных органов и систем организма (Bateson et al., 2004; Godfrey et al., 2007; Gluckman, Hanson, 2004a; Delcuve et al., 2009; Waterland, 2009).

Этот процесс “онтогенетического программирования” или “импринтинга” (Barker et al., 1993; Gluckman, Hanson, 2004; Godfrey et al., 2007) является адаптивным, поскольку позволяет осуществлять подготовку организма к ожидающим его в будущем средовым условиям (Jaenisch, Bird, 2003; Bateson et al., 2004; Godfrey et al., 2007; Dolinoy et al., 2007b; Gluckman, Hanson, 2007). Глюкман и Хансон назвали подобный вид адаптации “прогностическим адаптивным ответом” (predictive adaptive response – PAR) (Gluckman, Hanson, 2004a, b). В соответствии с концепцией PAR, если условия обитания до и после рождения совпадают, его реализация приводит к увеличению приспособленности организма. Если же эти условия отличаются (прогноз оказывается неверным), это может впоследствии приводить к возникновению различных патологий (Gluckman, Hanson, 2004a, b; Wells, 2007). Так, если внутриутробное развитие людей происходит при качественно или количественно неполноценном питании, они рождаются со сниженным весом и измененным обменом веществ. Люди с подобным “запасливым” (thrifty) типом метаболизма лучше выживают в условиях голодания, однако в условиях полноценного питания быстро набирают вес и впоследствии склонны к различным проявлениям метаболического синдрома (Hales, Barker, 2001; Bateson et al., 2004). Последний сценарий в наши дни становится все более распространенным, поскольку изменения стиля жизни, произошедшие в последние годы, часто находятся в конфликте с программируемыми на протяжении раннего развития прогностическими адаптивными изменениями.

Многие авторы считают, что основным молекулярным механизмом прогностического адаптивного ответа являются изменения, происходящие на эпигенетическом уровне. Так, Тсшентке с соавт. обнаружили, что, если яйца домашних птиц во время инкубации подвергать температурному стрессу, вылупляющиеся птицы демонстрируют на протяжении всей последующей жизни изменения в термосенситивности нейронов гипоталамуса. Авторы связывают эти изменения с возникновением у стрессирован-

ных птиц эпигенетической температурной адаптации (Tzschentke, Plagemann, 2006; Tzschentke, 2007).

В жизнь современного человека все больше входят синтетические химикаты и искусственные репродуктивные технологии, которые могут индуцировать онтогенетическое программирование с непредсказуемыми результатами на поздних этапах жизни. Вполне возможно, что эти факторы в значительной степени объясняют эпидемический характер распространения различных хронических патологий, наблюдающийся в последние десятилетия. Понимание того, каким образом средовые факторы влияют на эпигенетические процессы, приводя к онтогенетическому программированию, может обеспечить новые подходы к ранней диагностике, предупреждению и лечению этих заболеваний.

Эпигеном и старение

В последние годы накоплено много доказательств того, что эпигенетические процессы играют важную роль на поздних этапах жизни, в частности, при старении происходят широкомасштабные изменения паттернов метилирования (Gravina, Vijg, 2009). Предполагается, что эти процессы находятся под генетическим контролем (Bjornsson et al., 2008). Обычно наибольшее количество метилированых цитозиновых оснований наблюдается в ДНК, изолированной из эмбрионов или новорожденных животных, и это количество постепенно уменьшается с возрастом (Richardson, 2003). Ассоциированное с возрастом снижение уровня метилирования ДНК обнаружено в культивируемых лимфоцитах мышей, хомяков и людей (Wilson, Jones, 1983; Singhal et al., 1987; Wilson et al., 1987). Оно имеет систематический характер, но может быть ткане- и геноспецифичным (Richardson, 2002; Zhang et al., 2002; Richardson, 2003; Siegmund et al., 2007). Например, Тра с соавт. (Tra et al., 2002) при сопоставлении более чем 2000 локусов в Т-лимфоцитах, изолированных из периферической крови новорожденных, а также людей среднего и старшего возраста, выявили, что 23 из этих локусов с возрастом подвергаются гиперметилированию и 6 – гипометилированию, причем сходные изменения характера метилирования выявлены и в других тканях: поджелудочной железе, легких и пищеводе. Процесс возрастного деметилирования может быть ускорен при определенных патологических условиях, в частности при различных возраст-зависимых заболеваниях человека, таких, как рак и болезни иммунной системы (Issa, 2000; Liu et al., 2003; Schumacher, 2010). Выраженные эпигенетические искажения выявлены у больных прогерией Хатчинсона-Гилфорда (Scaffidi, Misteli, 2005).

Предполагается, что деметилирование с возрастом приводит к хромосомным перестройкам за счет активации мобильных генетических элементов (МГЭ), которые обычно подавляются при помощи метилирования ДНК (Barbot et al., 2002; Bennett-Baker et al., 2003). Систематическое снижение с возрастом уровня метилирования может, по крайней мере, отчасти, быть причиной возникновения многих комплексных заболеваний, которые нельзя объяснить с помощью классических генетических воззрений (Petronis, 2001; Wang et al., 2008). Еще одним процессом, происходящим в онтогенезе параллельно с деметилированием и влияющим на процессы эпигенетического регулирования, является конденсация хроматина (гетерохроматинизация), приводящая к снижению с возрастом генетической активности (Лежава, 1980, 2001; Sharma et al., 2006). В ряде работ возраст-зависимые эпигенетические изменения были продемонстрированы также в половых клетках; направление этих изменений, по всей видимости, является ген-специфичным (Flanagan et al., 2006).

Близнецовые исследования

Изменения эпигенетического профиля с возрастом были изучены во многих работах, осуществленных на близнецах. Как известно, монозиготные близнецы являются генетически идентичными, в то время как дизиготные имеют приблизительно 50% одинаковых генов. Степень конкордантности у монозиготных близнецов в отношении всех сложных заболеваний является меньшей, нежели 100%, но существенно большей в сравнении с дизиготными близнецами (Schumacher, Petronis, 2006). На модели монозиготных близнецов было продемонстрировано, что в ходе старения возникает “эпигенетический дрейф” на уровне как метилирования ДНК, так и модификации гистонов, который приводит к нарастающим с возрастом фенотипическим различиям (Fraga et al., 2005a; Kristiansen et al., 2005; Kaminsky et al., 2009; Schumacher, 2010). Обычно подобные исследования осуществляют при помощи метода микрочипов (microarray), позволяющего определять паттрены метилирования ДНК (Schumacher et al., 2006). В получившей широкую известность работе Фрага с соавт. (Fraga et al., 2005a) изучены возрастные изменения метилирования ДНК и ацетилирования гистонов у монозиготных близнецов разного возраста. Эпигенетические различия на ранних этапах жизни у них практически отсутствовали, что свидетельствует о том, что монозиготные близнецы при рождении являются не только генетически, но и эпигенетически идентичными. Однако с возрастом внутрипарные различия в паттернах метилирования ДНК увеличивались и оказывались тем большими, чем большим являлся возраст близнецов (Fraga et al., 2005a). Примечательно, что степень эпигенетических расхождений между близнецами зависела от различий в условиях их жизни (среды обитания, сти-

ля жизни и т.д.). Недостатком этих близнецовых исследований является то, что паттерны метилирования сопоставляли у разных людей (т.е., исследование было поперечным). В недавней работе Бьорнссон с соавт. (Bjornsson et al., 2008) осуществили лонгитудинальное наблюдение паттернов метилирования ДНК у одних и тех же людей (не близнецов) на протяжении многих лет их жизни. Исследование было осуществлено на двух популяциях: Исландии и штата Юта (США). Глобальные изменения метилирования были выявлены на протяжении 11–16-летнего промежутка времени у приблизительно 20% обследованных людей, причем в популяции штата Юта эти изменения демонстрировали явную семейную кластеризацию, проявляющуюся как в увеличении, так и в снижении уровня метилирования определенных генов, хотя более выраженной была тенденция к возрастному гипометилированию. Авторы высказали предположение, что подобная семейная кластеризация может свидетельствовать о различиях в генетических локусах, вовлеченных в регуляцию метилирования ДНК. Эти данные очень важны для понимания потенциальных механизмов, при помощи которых те или иные средовые факторы могут влиять на возраст-зависимые паттерны генетической экспрессии (Poulsen et al., 2007).

Гипотеза эпигенетического дрейфа

Эпигеном является высоко динамичной, но, в то же время, и жестко контролируемой структурой. Потеря контроля над эпигеномом с возрастом может быть одной из главных причин старения и возникновения возрастзависимых заболеваний. Недавно Акселем Шумахером предложена новая эволюционная эпигенетическая гипотеза старения ("гипотеза эпигенетического дрейфа"), предлагающая теоретический базис для объяснения многих возрастных феноменов, которые не могут быть объяснены при помощи классических представлений о природе старения (Schumacher, 2010). В соответствии с этой гипотезой предполагается, что старение является следствием прогрессивного накопления эпигенетических повреждений вследствие ограниченной мощности репарационной системы. Возраст-зависимый эпигенетический дрейф является естественным феноменом, проявляющимся у всех здоровых индивидов, но с возрастом он может становиться неблагоприятным для жизнедеятельности, приводя к развитию комплексных заболеваний. Эпигенетический дрейф был выявлен в тканях здоровых людей, но в тканях, полученных от пациентов с болезнью Альцгеймера, он оказался существенно более выраженным (Fraga et al., 2005; Wang et al., 2008).

А. Шумахер высказал предположение, что, в то время как темп накопления генетических мутаций увеличивается с возрастом линейно, уровень накопления эпимутаций после того, как достигнут определенный порог клеточной эпигенетической дерегуляции, увеличивается экспоненциально. Достигая порога, эти изменения вследствие "резонансного эффекта" могут нарушать генетический и эпигенетический гомеостаз, приводя, таким образом, к значительно более быстрому эпигенетическому дрейфу. Его темп может определяться не только единичными изменениями в геноме, но также может зависеть от общегеномных системных механизмов.

Можно предположить, что те или иные средовые влияния могут приводить к возникновению длительно сохраняющихся "эпигенетических отпечатков", особенно в постмитотических клетках (нейронах и т.д.). Эти отпечатки могут оказываться вредными для организма даже по прошествии многих лет после воздействия. Например, выявлено, что влияние на крыс в период их развития металлов-ксенобиотиков, в частности свинца, приводит к отстроченной свехэкспрессии гена APP, который играет критическую роль в развитии болезни Альцгеймера. Этот эффект проявляется даже через 20 месяцев после воздействия (Zawia, Basha, 2005).

Для лучшего понимания процессов, связанных с "эпигенетическим дрейфом", А. Шумахер предлагает осуществлять исследования не только возрастзависимых заболеваний, но также изучать эпигенетические паттерны у долгожителей. Если, средовые изменения играют ключевую роль в эпигенетическом дрейфе, можно предположить, что долгоживущие индивиды являются носителями большего количества негативных возрастных эпимутаций в сравнении с другими членами популяции. Однако, определенные комплексные особенности их эпигенотипа могут защищать их от повреждающего эффекта этих эпимутаций (Schumacher, 2010).

Роль эпигенетических факторов в этиологии возраст-зависимых заболеваний

Нарушения, происходящие в эпигеноме ("эпимутации") (Holliday, 1991) являются причиной развития многих заболеваний (Jiang et al., 2004; Godfrey et al., 2007; Dolinoy et al., 2007b). Предполагается, что эпимутации возникают в 100 раз чаще, чем генетические мутации (Bennett-Baker et al., 2003; Goyal et al., 2006). Они могут возникать как случайно, так и специфическим образом в ответ на определенные изменения среды. Наибольшее количество эпимутаций возникает на ранних этапах развития, сопровождающихся быстрым клеточным ростом и эпигенетическим ремоделированием.

Во многих исследованиях показано, что предрасположенность к ряду возраст-зависимых заболеваний зависит от условий раннего онтогенеза. В большом количестве работ, осуществленных в разных

странах, подтверждены ассоциации между низким весом при рождении и повышенным риском коронарных заболеваний сердца, гипертензии, инсульта, депрессии, диабета 2 типа и остеопороза на поздних этапах жизни (Barker et al., 1993; Ravelli et al., 1998; Dennison et al., 2001; Thompson et al., 2001; Gluckman, Hanson, 2004; Fernandez-Twinn, Ozanne, 2006; Godfrey et al., 2007; Dolinoy et al., 2007b). Авторы данных исследований высказывают мнение, что выявленные ими ассоциации в значительной степени зависят от процессов, происходящих на эпигенетическом уровне.

Отклонения от нормального эпигенетического профиля обнаружены при злокачественных новообразованиях различных локализаций (Feinberg et al., 2006; Ballestar, Esteller, 2008) и, по всей видимости, они играют важную роль в этиологии других возраст-зависимых хронических заболеваний, включая ожирение, диабет 2 типа, коронарные заболевания сердца (Bjornsson, 2004; Schumacher, Petronis, 2006; Hatchwell, Greally, 2007), а также астму (Miller, Ho, 2008), аллергию (Steinke et al., 2008), аутизм (Schanen, 2006), маниакально-депрессивные расстройства и шизофрению (Abdolmaleky et al., 2004; Abdolmaleky et al., 2005a; Abdolmaleky et al., 2006; Abdolmaleky et al., 2008; Mill et al., 2008). Изменения эпигенетического профиля также были обнаружены при некоторых негативных последствиях для здоровья, сопряженных с применением современных репродуктивных технологий (Niemitz, Feinberg, 2004).

Таким образом, предрасположенность к заболеваниям является результатом комплексного взаимодействия между генетическими факторами и эпигенетическими маркерами, фиксирующимися в эпигеноме в ответ на воздействие определенных эндогенных и экзогенных факторов (Jaenisch, Bird, 2003). Хорошо известные существенные эпидемиологические различия в уровне распространенности возраст-зависимых заболеваний в разных популяциях являются очевидным доказательством того, что провоцировать развитие этих заболеваний могут определенные средовые триггеры. В частности, "вестернизированный" образ жизни может быть существенным компонентом при развитии возрастных заболеваний мозга. Сходная ситуация наблюдается и в отношении других комплексных заболеваний, в том числе рака (Schumacher, 2010). Исследования, осуществленные на мигрантах, показали, что распространненость рака увеличивается вследствие миграции, что предполагает важный вклад смены окружающих средовых условий в развитие этого заболевания (Hemminki et al., 2006). Очевидно, для расширения представлений того, как среда (пищевые и поведенческие особенности разных популяций и т.д.) влияет на распространенность возраст-зависимых заболеваний, необходимы дальнейшие интенсивные кросс-культуральные исследования.

Злокачественные новообразования

Наиболее четко эпигентическая этиология продемострирована для злокачественных новообразований. Увеличение уровня метилирования генов-супрессоров опухолевого роста в ракових тканях в сопоставлении с нераковыми иногда достигает 100 процентов (Esteller, 2007). Показано, что развитие онкопатологии может быть остановлено при изменении метилирования определенных генетических сайтов в раковых клетках (Cadieux et al., 2006; Schulz et al., 2006; Ehrlich, 2006; Wilson et al., 2007). Специфические профили метилирования также ассоциированы с факторами, которые позволяют прогнозировать развитие рака (Cho et al., 2007). Особенностью эпигенетических процессов, происходящих в раковых клетках, является то, что наряду с глобальным деметилированием ДНК (которое обычно связывают с хромосомной нестабильностью) в них одновременно происходит гиперметилирование определенных промоторов генов-супрессоров рака (Esteller, 2007). Кроме того, эти изменения в метилировании ДНК ассоциированы с модификацией гистонов. Например, уровень триметилирования лизинов H4-гистона в положении 20 (K20-H4), осуществляющегося в клетках в процессе дифференцировки (Biron et al., 2004) и увеличивающегося как с возрастом (Prokocimer et al., 2006), так и при различных прогериях (Shumaker et al., 2006), в раковых клетках обычно снижен (Fraga, Esteller, 2005). Считается, что снижение уровня триметилирования K20-H4 в раковых клетках может быть следствием снижения уровня экспрессии K20-H4-специфической метилтрансферазы Suv4-20h (Pogribny et al., 2006), гена супрессора RB (Isaac et al., 2006), а также дерегуляции других гистон-модифицирующих энзимов. К настоящему времени еще не известно, изменяется ли уровень экспрессии этих гистон-модифицирующих энзимов с возрастом. Примечательно, что, как показано в ряде исследований, уровень экспрессии двух маркеров модификации гистонов (моно-ацетилированного K16-H4 и ацетилированного K9-H3), ассоциированных с "anti-aginig" гистоновой диацетилазой SIRT1, изменяется в процессе канцерогенеза (Pruitt et al., 2006). Искажение регуляции SIRT1 продемонстрировано при карциномах легких, лимфомах и саркомах мягких тканей мышей (Chen et al., 2005), а также при раке легких (Yeung et al., 2004), простаты (Kuzmichev et al., 2005) и лейкемии (Bradbury et al., 2005) у людей. В ряде работ выявлено, что регуляция гистонов, осуществляющаяся при помощи всех перечисленных факторов (SIRT1, K16-H4 и K9-H3) (Vaquero et al., 2004), радикально изменяется при различных типах онкозаболеваний (Fraga, Esteller, 2005). Так, продемонстрировано, что снижение ацетилирования K9-H3 ассоциировано с увеличением риска повторного рака простаты (Seligson et al., 2005). Показано, что рако-

вые клетки имеют сниженный уровень ацетиллирования K16-H4 (Fraga, Ballestar, et al., 2005b; Kapoor-Vazirani, et al., 2008). Предполагают, что снижение ацетилирования K16-H4 при раке может быть следствием дерегуляции K16-H4-специфичной гистон-ацетилтрансферазы hMOF (Pfister et al., 2008). К настоящему времени взаимосвязь между увеличенной активностью SIRT1 при раке и ее сниженной активностью при старении понята недостаточно и, по мнению ряда авторов, представляет собой многообещающую область исследований для дальнейшего понимания природы возрастных процессов (Sasaki et al., 2006). При исследовании членов семей с четко установленной семейной предрасположенностью к раку, в их половых клетках были идентифицированы эпимутации в генах, отвечающих за репарацию ошибочно спаренных нуклеотидов (мисматч-репарацию) MLH1 (Suter et al., 2004) и MSH2 (Chan et al., 2006). Независимо от того, отражают ли эти эпимутации истинное трансгенерационное генетическое наследование, они могут индуцировать карциногенез тем же образом, что и генетические мутации в аналогичных локусах. Было показано, что приблизительно половина генов-супрессоров опухолей, которые обусловливают случаи семейного рака, при спорадических формах рака также демонстрируют эпигенетическую репрессию (Jones, Baylin, 2002).

Значимые различия в уровне метилирования, наблюдаемые между раковыми и нераковыми тканями, не были обнаружены для других комплексных заболеваний в тех случаях, когда разница в уровне метилирования определенных сайтов у больных людей по сравнению со здоровыми не превышала 10% (Chan et al., 2004; Kitazawa, Kitazawa, 2007). Интерпретации функциональных последствий подобных изменений поэтому проблематична.

Кардиоваскулярные заболевания

Кардиоваскулярные заболевания (КВЗ) являются ведущей причиной смертности, особенно в постсоветских странах. Если в развитых странах они являются причиной смертей в 27% случаев, а в развивающихся странах – в 21% случаев (Lopez et al., 2006), то по данным Государственного комитета статистики Украины, КВЗ являются причиной смерти 63% населения (Статистический ежегодник Украины, 2008). Менее чем 5% риска развития КВЗ детерминируется генетической составляющей; таким образом, эпигенетические факторы и факторы образа жизни детерминируют большую часть вариаций (Willett, 2002).

Наиболее очевидна связь между эпигенетическими факторами и КВЗ при гипергомоцистеинемии (нарушении обмена серосодержащих аминокислот, приводящем к повышению концентрации аминокислоты гомоцистеина в крови). Гипергомоцистеинемия является общепризнанным фактором риска КВЗ. Механизмы, определяющие взаимосвязь гипергомоцистеинемии с КВЗ, еще не выяснены, однако, поскольку известно, что увеличенная концентрация гомоцистеина приводит к нарушению одноуглеродного метаболизма и, соответственно, метилирования ДНК, предполагается, что ведущую роль в этой ассоциации играют именно эпигенетические механизмы (Castro et al., 2006). В ряде работ было показано, что изменения метилирования ДНК (как гипо-, так и гиперметилирование), связанные с определенными факторами питания, могут являться первичным звеном атерогенеза (Ying, 2000; Lund et al., 2004).

Диабет 2 типа

Недавний мета-анализ публикаций в системе *Medline* позволил выявить, что эпигенетические факторы наиболее часто приводятся в качестве самого вероятного механизма диабета 2 типа (Wren, Garner, 2005). В ряде исследований было показано, что на риск развития диабета 2 типа у людей может влиять характер питания в родительском и даже пред-родительском поколениях (Kaati et al., 2002; Pembrey et al., 2006). Доказательства этой взаимосвязи были обнаружены в экспериментальных исследованиях, в которых было продемонстрировано, что пренатальное и раннее постнатальное питание может влиять на эндокринные функции поджелудочной железы и экспрессию генов в ее клетках (Vadlamudi et al., 1995; Waterland, Garza, 2002). Во многих работах было показано, что ген COX7A1, вовлеченный в метаболизм глюкозы, демонстрирует увеличение метилирования с возрастом (Ronn et al., 2008). Поскольку риск диабета 2 типа увеличивается с возрастом, авторы представленной работы предполагают, что увеличение метилирования промотора гена COX7A1 с возрастом может быть одной из причин развития диабета 2 типа.

Ожирение

Во многих экспериментальных исследованиях показано, что отклонения от нормального эпигенетические профиля могут являться причиной ожирения (Waterland, 2005). Так, клонированные мыши имеют нормальный вес при рождении, но часто на поздних этапах жизни склонны к ожирению в сравнении с неклонированными (Tamashiro et al., 2002). Сходный феномен у клонированных овец (“синдром больших потомков”) также связывают с эпигенетическими изменениями (Young et al., 2001). В последние годы активно изучаются эпигенетические маркеры, ассоциированные с заболеваниями, связанными с нарушениями пищеварения у людей (Frieling et al., 2007, 2008).

Болезнь Альцгеймера

Ванг с соавт. (Wang et al., 2008) в своем недавнем исследовании при помощи MALDI-TOF масс-спектроскопии выявили связь между возрастными эпигенетическими изменениями в промоторах 12 генов, предположительно имеющих отношение к возникновению болезни Альцгеймера, и предрасположенностью к этому заболеванию. Изучая посмертные образцы тканей мозга у людей, умерших в возрасте 65–85 лет, они обнаружили, что, если у людей, у которых болезнь Альцгеймера была выявлена в относительно молодом возрасте, изменения эпигенетических маркеров в сопоставлении с контролем (молодыми здоровыми людьми) были незначительными, то у людей с поздней манифестацией заболевания (late-onset Alzheimer's disease – LOAD), эти изменения оказались значительно более выраженными. Авторы высказывают мнение, что возраст начала заболевания и его течение могут в значительной степени быть обусловлены "эпигенетическим дрейфом". В недавнем исследовании монозиготных близнецов в парах, дискордантных по болезни Альцгеймера, у близнецов с болезнью Альцгеймера было выявлено существенное глобальное деметилирование ДНК в клетках определенных участков мозга, в сравнении с контролем (их близнецами без болезни Альцгеймера) (Mastroeni et al., 2009). Показано, что содержание играющего важную роль в возникновении болезни Альцгеймера бета-амилоидного белка ассоциировано с деметилированием цитозиновых оснований ДНК (Tohgi et al., 1999).

Эпигенетическое программирование: роль факторов среды и образа жизни

Питание. Важный вклад в раннее программирование хронических заболеваний имеют особенности материнского питания на протяжении внутриутробного развития человека. От количественного и качественного состава пищи в значительной мере зависит эпигенетический профиль развивающегося организма (Heijmans et al., 2009). Недавно были изучены долговременные последствия голода в Голландии, связанного с эмбарго на поставки продовольствия, введенного немецкими оккупационными властями в 1943–1944 годах (Dutch Hunger Winter). Выявлено, что потомкам матерей, голодавших в период беременности, на поздних этапах жизни свойственна повышенная предрасположенность к диабету 2 типа, ожирению и кардиоваскулярным заболеваниям (Roseboom et al., 2001; Painter et al., 2005). Эти данные подтверждают, что индуцированные неполноценными условиями развития эпигенетические изменения могут фиксироваться (импринтироваться) и приводить к выраженным фенотипическим последствиям на протяжении всей жизни. Особенно важным в этом отношении может быть период раннего эмбриогенеза, поскольку именно в этом периоде происходит фиксация основных эпигенетических маркеров (Reik et al., 2001). Примечательным в этом отношении представляется недавнее исследование Хейманса с соавт., в ходе которого было выявлено, что у людей, чье раннее внутриутробное развитие проходило на фоне голода в Голландии, через 60 лет после периода голода существенно снижен уровень метилирования гена инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2) в сравнении с их сверстниками из регионов, не подвергшихся голоду (Heijmans et al., 2008). Изменения в характере метилирования позже были выявлены и для ряда других генов, играющих важную роль при развитии, а также при метаболических и кардиоваскулярных заболеваниях. У людей, родившихся на фоне голода, был достоверно снижен уровень метилирования гена *INSIGF,* и повышен – генов *IL10, LEP, ABCA1, GNASAS* и *MEG3* (Tobi et al., 2009).

Показано, что с уровнем метилирования ДНК прямо коррелирует доступность определенных микроэлементов и витаминов, вовлеченных в одноуглеродный метаболизм (таких, как фолаты, метионин, холин и витамин B12), которые являются основными донорами метильных групп и ко-факторами, вовлеченными в процесс метилирования. Выявлено, что диета с недостаточным количеством фолата приводит к геномной нестабильности (Jacob 1999) и гипометилированию ДНК (Friso, Choi, 2002), недостаток в пище фолата и метионина может привести к искаженному импринтингу инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2) (Waterland et al., 2006).

Уотерланд и Джиртл впервые продемонстрировали, что добавление доноров метильных групп в корм самок мышей агути до и на протяжении беременности, а также непосредственно после родов, увеличивает уровень метилирования ДНК метастабильного эпиаллеля *Avy* (*viable yellow agouti)*, обусловливающего желтую окарску их шерсти (Waterland, Jirtle, 2003). Вследствие этого цвет шерсти у новорожденных мышат становился таким же, как у мышей дикого типа – бурым. Эти же исследователи в дальнейшем выявили у мышей при добавлении в корм доноров метильных групп эпигенетическую пластичность другого метастабильного эпиалеля, *AxinFu*. "Окна чувствительности" ограничивались не только ранним эмбриогенезом, но захватывали и средне-гестационную стадию (Waterland et al., 2006).

В ряде популяционных исследований продемонстрирована выраженная корреляция между содержанием в пище людей фолата и предрасположенностью к коронарным заболеваниям сердца и раку (Fanapour et al., 1999; Herrmann, 2001; Wu, Wu, 2002; Muskiet, 2005). Пациенты с атеросклеротическими поражениями сосудов часто имеют повышенный уровень гомоцистеина и S-аденозилгомоцистеина и

сниженный уровень метилирования ДНК (Castro et al., 2003), а низкий уровень фолата приводит к гипергомоцистеинемии, которая подавляет активность ключевых ингибиторов одноуглеродного метаболизма (Muskiet, 2005; Leopardi et al., 2006). Выявлены ассоциации между количеством потребляемых фолатов и мутацией гена, кодирующего метилентетрагидрофолат редуктазу (*MTHFR*) – фермент, играющий ключевую роль в метилировании ДНК. Это исследование продемонстрировало взаимосвязь между эпигенетическими факторами, связанными с особенностями питания, и генетической предрасположенностью к модуляции генетической экспрессии (Friso, Choi, 2002).

Современная "вестернизированная" диета содержит большое количество жиро- и сахаросодержащих продуктов. Известно, что богатое жирами питание на протяжении беременности кореллирует с увеличенным уровнем эстрогенов во время внутриутробного развития и предрасположенностью к раку груди у потомков женского пола. Например, у крыс *Sprague–Dawley* в ходе нормального старения происходит прогрессивное гиперметилирование и, соответственно, снижение транскрипционной активности гена эстрогенового рецептора в клетках молочной железы, что может являться защитным механизмом, препятствующим клеточной пролиферации и канцерогенезу. Однако, кормление беременных самок пищей, содержащей большое количество жира, вызывает гипометилирование промотора этого рецептора и повышенную экспрессию эстрогенового рецептора в грудных железах их потомков, что приводит к более высокой предрасположенности к раку груди (Yenbutr et al., 1998).

В ряде работ выявлено, что риск развития сахарного диабета 2 типа на поздних этапах онтогенеза зависит от уровня глюкозы во время развития. Предполагается, что эти процессы зависят от эпигенетической "памяти", которая может сохраняться в тканях, являющихся мишенями для инсулина и глюкозы (Dabelea et al., 2000). Различные паттерны метилирования ДНК были обнаружены в промоторах генов, вовлеченных в метаболизм глюкозы (Yokomori et al., 1999).

Недавно в ряде исследований получены доказательства позитивного влияния на здоровье изофлавоноидов (относящихся к классу фитоэстрогенов), обнаруженных во многих пищевых продуктах, особенно полученных из сои. Активность этих продуктов связана как с эстрогеновыми рецепторами, так и с другими факторами (Lamartiniere et al., 2002; Valachovicova et al., 2004). Предполагается, что фитоэстрогены могут являться эффективным средством противодействия некоторым заболеваниям человека, в частности, эстроген-зависимым видам рака, остеопорозу и кардиоваскулярным заболеваниям (Day et al., 2002). Показано, что добавление в корм некоторых фитоэстрогенов, особенно во время раннего развития, может приводить к антиканцерогенному эффекту в отношении некоторых гормонозависимых видов рака. Так, следствием добавления в корм крыс фитоэстрогенов эквола и куместрола стало гиперметилирование (и, соответственно, репрессия) протоонкогена *c-H-ras* в поджелудочной железе животных (Lyn-Cook et al., 1995). Добавление генистейна (эстрогеноподобного полифенола, содержащегося в сое) в корм беременным самкам привело к изменению цвета шерсти, а также – предотвращению ожирения у потомков мышей *агути*. Эти выраженные фенотипические изменения были ассоциированы с увеличенным уровнем метилирования шести цитозин-гуаниновых сайтов ретротранспозона, влияющего на транскрипционный статус гена *агути* (Dolinoy et al., 2006). Кроме того, добавление в корм генистейна на протяжении неонатального развития мышей привело к возникновению существенных отклонений в репродуктивной системе самок (Jefferson et al., 2007). Выявлено, что добавление в пищу взрослым крысам генистейна приводит к гиперметилированию определенных генов в простате крыс (Day et al., 2002). В большом количестве работ продемонстрирована связь генистейна со снижением репродуктивной способности женщин, уменьшенным риском рака и торможением процесса накопления жира. Предполагается, что генистейн может влиять на уровень метилирования ДНК определенных генов, включая некоторые онкосупрессоры (Day et al., 2002; Fang et al., 2005; Dolinoy et al., 2006). Высказано предположение, что именно с повышенным уровнем содержания генистейна в диете, обогащенной продуктами, полученными из сои, может быть связан известный феномен более низкой предрасположенности жителей Азии к онкозаболеваниям, а также увеличение распространенности рака среди выходцев из Азии, иммигрировавших в США (Dolinoy et al., 2006).

Другим натуральным компонентом, оказывающим выраженный модулирующий эффект на метилирование ДНК, является полифенол эпигаллокатехин-3-галлат (*EGCG*), содержащийся в зеленом чае (Lee et al., 2005). Выявленно, что *EGCG* ингибирует ДНК-метил-трансферазу и реактивирует специфические гены, связанные с развитием рака простаты и толстой кишки в человеческих клеточных линиях (Fang et al., 2003). По мнению некоторых исследователей, некоторые компоненты пищи могут также влиять на эпигеном посредством модификации гистонов хроматина (Davis, Ross, 2007; Herceg, 2007).

Во многих эпидемиологических исследованиях получены подтверждения того, что индуцированные теми или иными пищевыми факторами эпигенетические изменения могут передаваться в последующие поколения (Bygren et al., 2001; Golding et al.,

2001; Kaati et al., 2002; Pembrey et al., 2006; Kaati et al., 2007). В последние годы в экспериментах на модельных организмах активно изучаются эпигенетические механизмы, лежащие в основе подобных трансгенерационных эффектов (Pembrey et al., 2006). Так, показано, что ограничение белкового компонента в рационе матерей-крыс на протяжении беременности приводит к тому, что у их потомков в течение нескольких поколений происходит деметилирование промоторов генов, вовлеченных в метаболизм глюкозы в печени, почках и легких (Lillycrop et al., 2005; Burdge et al., 2007).

Данные подобных исследований проливают свет на патофизиологию заболеваний, связанных с индуцированными теми или иными пищевыми факторами эпигенетическими изменениями. Они могут открыть пути для разработки новых стратегий предотвращения заболеваний путем модификации характера питания в популяциях, подверженных риску. Высказано предположение, что стабильность эпигенома можно поддерживать при помощи определенных диетических комбинаций (Fenech, 2005). Разработка подобных подходов может оказаться в будущем перспективным средством профилактики хронических заболеваний.

Ксенобиотики

К ксенобиотикам относят чужеродные для живых организмов химические вещества, в норме не являющиеся компонентами биотического круговорота и, как правило, включающиеся в него в связи с хозяйственной деятельностью человека. К ним относятся: пестициды, минеральные удобрения, моющие средства (детергенты), радионуклиды, синтетические красители, полиароматические углеводороды, свободные металлы и др. В ряде исследований выявлено, что негативное влияние на здоровье людей тяжелых металлов, таких, как хром, кадмий, свинец, мышьяк и никель, может быть связано не только с их токсическими эффектами, но и с индуцированными ими эпигенетическими изменениями (Herceg, 2007). Например, воздействие хрома на самцов мышей, привело к гипометилированию ДНК сперматозоидов и было ассоциировано с увеличенным риском возникновения рака и других патологий у их потомков (Yu et al., 1999; Cheng et al., 2004). Потребление избыточных количеств тяжелых металлов привело к гипометилированию промотора гена рибосомальной РНК 45S в сперматозоидах крыс. Высказано предположение, что данная эпимутация может увеличивать риск рака у потомков (Shiao et al., 2005). Кратковременная обработка клеток печени крыс кадмием ингибировала цитозин(С5)-ДНК-метилтрансферазную активность, в то время как длительное воздействие этим металлом привело к онкогенной трасформации и увеличению цитозин(С5)-ДНК-метилтрансферазной активности и метилирования ДНК (Takiguchi et al., 2003). Негативные последствия потребления избыточных количеств тяжелых металлов (никеля, кадмия и мышьяка) у грызунов были сходны с эффектами метилдефицитной диеты (отсутствием в пище холина и фолата) (Poirier, Vlasova, 2002). Ионы этих металлов, как и соответствующая диета, ингибировали активность ДНК-метилтрансферазы, приводя, по мнению авторов, к гипометилированию ассоциированных с онкопатологией генов. Воздействие мышьяка во время внутриутробного развития мышей во многих случаях приводило к развитию рака печени, легких, почек и мочеточников (Waalkes et al., 2004a). На основе этих исследований мышьяк был признан в качестве полного трансплацентарного канцерогена у мышей. Эпидемиологические исследования соответствуют данным экспериментальных работ и демонстрируют, что существует широкий спектр патологий, коррелирующих с избыточным потреблением людьми мышьяка, в том числе рак, атеросклероз, неврологические патологии и кардиоваскулярные заболевания (Waalkes et al., 2004b). Было продемонстрировано, что свинец и никель также могут приводить к трансплацентарным канцерогенным эффектам, модулируя эпигенетические процессы (Salnikow, Costa, 2000; Silbergeld et al., 2000). В ряде исследований было показано, что воздействие тяжелых металлов может также приводить к модификации гистонов и ремоделированию хроматина (Salnikow, Costa, 2000; Chen et al., 2006).

Еще одним средовым загрязнителем, который, как было показано, может нарушать нормальное развитие экспериментальных животных, является 2,3,7,8-тетрахлородибензо-п-диоксин (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin – TCDD) (Couture et al., 1990). Показано, что воздействие TCDD на преимплантационные эмбрионы мышей приводит к замедлению их внутриутробного роста, и этот эффект коррелирует с изменением паттерна метилирования импринтированных генов H19 и IGF2 (Wu et al., 2004). TCDD также индуцирует модификации гистонов в нормальных эпителиальных клетках человека (Bradley et al., 2007). Также было выявлено, что подобным образом могут действовать и другие средовые загрязнители, в том числе эфир-фталат (Foster, 2006), полихлорированные дефинилы (Desaulniers et al., 2005; McLachlan et al., 2006) и побочные продукты дезинфекции хлором (Tao et al., 2005).

Эндокринные дезинтеграторы

Предрасположенность к возрастзависимым заболеваниям может в значительной степени определяться не только влиянием экзогенных средовых факторов, но и эндогенными факторами, такими, как стероидные гормоны. Работами последних лет

выявлено, что эти гормоны могут существенно влиять на эпигенетические процессы и на онтогенетическую пластичность (Anway et al., 2005; Anway et al., 2006; Ho, Tang, 2007). Поэтому неудивительно, что, как показано в работах последних лет, на эпигенетические процессы могут оказывать выраженное влияние эндокринные дезинтеграторы – химикаты, которые искажают процессы нормального синтеза, транспорта и элиминации гормонов. Одним из наиболее хорошо изученных из них является синтетический эстроген диэтилстилбестрол (DES), который был широко использован в период с 1938 по 1971 года для лечения женского бесплодия. У людей и экспериментальных животных воздействие диэтилбестрола на протяжении "окон чувствительности" во время раннего развития приводит к нарушению дифференциации репродуктивной системы, а также к онкозаболеваниям разной локализации в органах, чувствительных к DES. В ряде исследований была выявлена связь между воздействием диэтилстилбестрола во время беременности женщин и увеличенной предрасположенностью к раку репродуктивной системы у их дочерей (Veurink et al., 2005). Показано, что пренатальное воздействие диэтилстилбестрола приводит к увеличению риска рака шейки матки и влагалища, проблем с вынашиванием у женщин и дисфункцией яичек у мужчин (Rubin, 2007). Неонатальное воздействие диэтилстилбестрола индуцирует деметилирование определенных CpG-сайтов в промоторе гена лактоферрина (Li et al., 1997), а также экзона-4 онкогена *c-fos* у мышей (Li et al., 2003). Пренатальное воздействие этого ксеноэстрогена на мышей увеличивает вес печени и приводит к гиперметилированию рибосомальной РНК (Alworth et al., 2002). Внутриутробное воздействие бисфенола А (миметика эстрогенов) приводит к морфологическим и функциональным изменениям репродуктивной системы и молочных желез, а на более поздних этапах жизни – к бесплодию и развитию рака легких и простаты (Maffini et al., 2006; Welshons et al., 2006). Показано, что у экспериментальных животных внутриутробное или неонатальное воздействие бисфенолом А сопровождается увеличением массы тела, изменением репродуктивной функции, увеличением риска развития онкозаболеваний, а также специфическими изменениями метилирования ДНК (Ho et al., 2006; Prins et al., 2007; Dolinoy et al., 2007a).

Исследования на животных показали, что длительное влияние антиандрогена винклозолина ассоциируется с изменениями в характере метилирования ДНК некоторых генов (Chang et al., 2006) и уменьшенной фертильностью потомков мужского пола на протяжении нескольких поколений (Anway et al., 2005). В серии недавних исследований обнаружено, что внутриутробное воздействие на самцов мышей винклозолина индуцирует эпигенетические изменения, которые могут воспроизводиться на протяжении четырех поколений (Anway et al., 2005; Anway et al., 2006; Crews et al., 2007). Эти эпигенетические модификации определенных последовательностей ДНК коррелируют с ослаблением сперматогенеза и сниженной фертильностью у взрослых животных (Anway et al., 2005), отклонениями в простате, легких, почках, яичках и имунной системе (Anway et al., 2006), а также с измененным половым поведением (Crews et al., 2007).

Алкоголь

В ряде эпидемиологических исследований показано, что регулярное потребление алкоголя приводит к изменению уровня активности метилтрансферазы и метилирования многих генов (Abdolmaleky et al., 2005b; Bonsch et al., 2006), в том числе промоторов генов-супрессоров опухолевого роста (Bleich et al., 2006), и к подавлению, вследствие этого, их активности. В частности, важная роль эпигенетических изменений, индуцированных регулярным потреблением алкоголя, продемонстрирована при раке прямой кишки (van Engeland et al., 2003) и гипергомоцистоинемии (Cravo, Camilo, 2000; Bonsch et al., 2004) у хронических алкоголиков. Показано, что алкоголь влияет на биодоступность, содержащегося в пищевых продуктах фолата и ингибирует фолат-зависимые биохимические реакции (Cravo, Camilo, 2000; Abdolmaleky et al., 2005b; Mason, Choi, 2005).

Курение

В ряде популяционных и экспериментальных исследований показано, что воздействие никотина может приводить как к увеличению уровня метилирования генов-супрессоров опухолей, так и к снижению уровня метилирования онкогенов (Belinsky et al., 2002; Pulling et al., 2004; Liu et al., 2007). Индукция этих изменений также зависит от модуляций активности ДНК-метилтрансферазы (Liu et al., 2007).

Материнская забота и перинатальный стресс

В ряде исследований были получены доказательства того, что даже слабые влияния в раннем онтогенезе, которые не вызывают явных морфологических нарушений, могут приводить к долговременным отклонениям в развитии нервной и эндокринной систем (Дыгало и др., 1990; Науменко и др., 1990; Носенко, 1999; Резников и др., 2004). Было показано, что различные физиологические влияния на протяжении неонатального периода развития могут приводить к стойким изменениям экспрессии генов и, соответственно, к изменениям в спектре транкрибируемых РНК (Салганик и др., 1979). Одним из наиболее интересных направлений при изучении индуцированных в раннем онтогенезе эпигенетических изменений является исследование последствий раз-

личий в паттернах материнской заботы по отношению к новорожденным крысам (Weaver et al., 2005; Szyf et al., 2008). Показано, что низкий уровень материнской заботы, в том числе облизывания (licking) и очищения шерсти (grooming) на протяжении постнатального онтогенеза сопровождается снижением уровня метилирования промотора глюкокортикоидного рецептора (и, соответственно, увеличенной активностью данного гена) в гипоталамусе и с модификацией стресс-ответа у молодых крыс (Meaney et al., 2007). Этот эффект может быть обратимым при определенных фармакологических или пищевых воздействиях на взрослых крыс (Weaver et al., 2005). Показано, что раннее отнятие крысят от матери, приводящее к гиперсекреции кортикостерона во взрослом состоянии, обусловлено снижением метилирования гена, кодирующего выброс вазопрессина, что приводит к усилению секреции вазопрессина паравентрикулярными ядрами гипоталамуса и, вследствие этого, к стимуляции секреции АКТГ (McGowan et al., 2009). Иными словами, стресс на протяжении раннего онтогенеза через эпигенетические эффекты программирует работу постмитотических нейронов гипоталамуса на протяжении всей жизни. Подобные эффекты были также обнаружены в отношении гена эстрогенового рецептора альфа (Champagne et al., 2006).

Продемонстрировано, что пренатальний стресс у млекопитающих может стимулировать длительно сохраняющиеся изменения в мозговых структурах и функциях и в гипоталамо-питуитарно-адреналовой оси (Носенко, 1999; Резников и др., 2004). Так, применение стресса "вынужденной неподвижности" на протяжении третьей недели беременности самок крыс приводило к тому, что пренатально стрессированные новорожденные крысы демонстрировали более длительную продолжительность секреции кортикостерона после применения аналогичного стресса в возрасте 90 суток. Продемонстрировано, что от влияний, которыt испытает организм в период внутриутробного развития, в значительной мере зависит формирование адаптационных механизмов. Показано, что пренатальный стресс может приводить к изменениям в реактивности гипоталамо-гипофизарно-надпочечной системы и к нарушению картины общего адаптационного синдрома (Дыгало и др., 1990; Науменко и др., 1990).

В исследованиях на людях выявлено, что носители варианта гена, кодирующего белок из семейства нейрофилинов, изменяющего эффективность связывания кортизола с его рецептором, при условии раннего средового программирования, чаще получают диагноз посттравматического стрессового расстройства (Murgatroyd, 2009). Подобных исследований на людях проведено еще мало, но, с учетом четко установленной зависимости от стресса возраста возникновения и течения различных заболеваний (Hammen, 2005; Mohr, Pelletier, 2006; Post, Leverich, 2006; Thrall et al., 2007;Stojanovich, Marisavljevich, 2008), можно предположить, что такие исследования имеют большую потенциальную значимость.

Инфекции

Показано, что эпигенетический профиль экспериментальных животных может быть существенно изменен под влиянием бактериальных инфекций (Bobetsis et al., 2007). Обнаружено, что общим фактором у людей, инфицированных *Helicobacter pylori,* является отклонение от нормы характеристик метилирования генов желудочной мукозы, этот же фактор является ранней причиной рака желудка (Miyazaki et al., 2007; Kitajima et al., 2008; Perri et al., 2007). Инфицирование *Campylobacter rectus* на протяжении беременности приводит к импринтированию измененного профиля метилирования инсулиноподобного фактора роста 2 в плаценте (Bobetsis et al., 2007). Сходные изменения метилирования ДНК под воздействием вирусных и гельминтных инфекций были отмечены в человеческих клеточных линиях (Pang et al., 1992; Mikovits et al., 1998; Habib et al., 1999; Fang et al., 2001; Gutierrez et al., 2004; Limpaiboon et al., 2005; Northrop et al., 2006; Zhu et al., 2007). Таким образом, изменение эпигенетического профиля в ответ на те или иные инфекции может играть важную роль при развитии иммуно-ассоциированных патологий и многих форм рака (например, рака желудка).

Прогнозы и перспективы

В последние годы уже практически ни у кого не возникает сомнений, что эпигенетические факторы играют ключевую роль в развитии возраст-зависимых заболеваний. Некоторые авторы даже считают эпигенетику "эпицентром современной медицины" (Feinberg, 2008). Современные генетико-эпидемиологические исследования являются основным источником знаний о совместном вкладе генотипа и определенных средовых воздействий в риск развития заболеваний. Обогащение их эпигенетическими подходами может помочь прояснить функциональный базис, лежащий в основе таких совместных эффектов. Разработка генетико-эпигенетической модели развития заболеваний позволит обеспечить стартовую позицию для включения эпигенетических данных в генетические исследования (Bjornsson et al., 2004; Feinberg, 2008). Для выхода на следующий уровень познания процессов в данной сфере дальнейшие исследования должны быть сосредоточены на уровне целостного генома и возможности комплексного "онтогенетического репрограммирования". В настоящее время началась реализация широкомасштабных научных проектов в этой области, например, направленных на изучение чувствитель-

ности эпигенома к эстрогенным влияниям. Дальнейший прогресс в данной сфере исследований связывают с применением современных технологических платформ, таких, как масс-спектрометрия, биоинформационный анализ, пиросеквенирование и т.д.

Период сверхвысокой чувствительности в раннем онтогенезе у людей продолжается достаточно долго (в течение месяцев и даже лет), поэтому окружающая среда может оказывать существенное влияние на процессы, связанные с эпигенетическим программированием. Кроме того, некоторые фенотипические изменения могут проявиться только спустя многие годы после их возникновения на эпигенетическом уровне. Более глубокое познание эпигенетических процессов, по всей видимости, приведет к пересмотру основополагающих представлений о природе заболеваний. Поскольку эти процессы являются потенциально обратимыми, расшифровка эпигенетических механизмов, приводящих к развитию болезней, позволит разработать превентивные стратегии, позволяющие эффективно противодействовать им. Эти стратегии могут включать различные изменения в режиме питания, образе жизни, а также применение определенных фармакологических средств. Будущие клинические практики, направленные на улучшение здоровья людей, вероятно, будут эволюционировать от современной паллиативной помощи к персонализированной превентивной медицине, в значительной степени основанной на определении эпигенетических маркеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК в клетках различных организмов // Успехи соврем. биологии. 1974. Т. 77. № 2. С. 68–90.

Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика // Генетика. 2006. Т. 42. № 9. С. 1186–1199.

Ванюшин Б.Ф., Бердышев Г.Д. Молекулярно-генетические механизмы старения // М.: Медицина, 1977. 295 с.

Ванюшин Б.Ф., Зиньковская Г.Г., Бердышев Г.Д. Возрастное уменьшение уровня метилирования ДНК у крупного рогатого скота // Молекулярная биология. 1980. Т. 14. С. 857–866.

Ванюшин Б.Ф., Романенко Е.Б. Изменение метилирования ДНК крыс в онтогенезе и под влиянием гидрокортизона // Биохимия. 1979. Т. 44. С. 78–85.

Ванюшин Б.Ф., Тушмалова Н.А., Гуськова Л.В. Метилирование ДНК мозга как показатель участия генома в механизмах индивидуально приобретенной памяти // Докл. Акад. наук СССР. 1974. Т. 219. С. 742–744.

Дыгало Н.Н., Юдин Н.С., Калинина Т.С., Науменко Е.В. Генетико-физиологические механизмы гормональной модификации стрессовой реактивности // Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние. 1990. С. 136–148.

Лежава Т.А. Гетерохроматинизация – один из ведущих факторов старения // Цитология и генетика. 1980. Т. 14. № 3. 71–76.

Лежава Т.А. Функциональные особенности хромосом человека и старение // Успехи геронтологии. 2001. Вып. 8. С. 34–43.

Науменко Е.В., Дыгало Н.Н., Маслова Н.Н. Длительная модификация стрессорной реактивности воздействиями в пренатальном онтогенезе. Онтогенетические и генетико – эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса // Новосибирск: Наука. 1990. С. 40 – 54.

Носенко Н.Д. Механизмы гормон-медиаторного импринтинга нейроэндокринной регуляции репродукции и стресс-реактивности: Автореф. докт. дис: 03.00.13 // Ин-т эндокринол. Киев. 1999. 34 с.

Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д. и др. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология // Черновцы: Медакадемія. 2004. 351 с.

Салганик Р.И., Грязнова И.М., Маркель А.Л. и др. Ферментативный “импринтинг” как следствие воздействия генетических индукторов ферментов в раннем периоде после рождения животных // ДАН СССР. 1979. Т. 245. № 2. С. 473–476.

Статистический ежегодник Украины за 2007 год. Гос. комитет статистики Украины; ред. А.Г. Осауленко // Киев: Консультант. 2008. 571 с.

Уоддингтон К. Организаторы и гены // М.: ИЛ, 1947.

Уоддингтон К. Морфогенез и генетика // М.: Мир, 1964.

Abdolmaleky H.M., Cheng K.H., Faraone S.V. et al. Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder // Hum. Mol. Genet. 2006. V. 15. P. 3132–3145.

Abdolmaleky H.M., Cheng K.H., Russo A. et al. Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 2005a. V. 134B. P. 60–66.

Abdolmaleky H.M., Thiagalingam S., Wilcox M. Genetics and epigenetics in major psychiatric disorders: dilemmas, achievements, applications, and future scope // Am. J. Pharmacogenomics. 2005b. V. 5. P. 149–160.

Abdolmaleky H.M., Smith C.L., Faraone S.V. et al. Methylomics in psychiatry: modulation of gene-environment interactions may be through DNA methylation // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 2004. V. 127B. P. 51–59.

Abdolmaleky H.M., Smith C.L., Zhou J.R. et al. Epigenetic alterations of the dopaminergic system in major psychiatric disorders // Methods Mol. Biol. 2008. V. 448. P. 187–212.

Akhtar A., Cavalli G. The epigenome network of excellence // PloS Biol. 2005. V. 3. 177 p.

Alworth L.C., Howdeshell K.L., Ruhlen R.L. et al. Uterine responsiveness to estradiol and DNA methylation are altered by fetal exposure to diethylstilbestrol and methoxychlor in CD-1 mice: effects of low versus high doses // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2002. V. 183. P. 10–22.

Anway M.D., Cupp A.S., Uzumcu M. et al. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility // Science. 2005. V. 308. P. 1466–1469.

Anway M.D., Leathers C., Skinner M.K. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult onset disease // Endocrinology. 2006. V. 147. P. 5515–5523.

Ballestar E., Esteller M. Epigenetic gene regulation in cancer // Adv. Genet. 2008. V. 61. P. 247–267.

Barbot W., Dupressoir A., Lazar V., Heidmann T. Epigenetic regulation of an IAP retrotransposon in the aging mouse: progressive demethylation and de-silencing of the element by its repetitive induction // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. P. 2365–2373.

Barker D.J., Osmond C., Simmonds S.J., Wield G.A. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life // BMJ. 1993. V. 306. P. 422–426.

Bateson P., Barker D., Clutton-Brock T. et al. Developmental plasticity and human health // Nature. 2004. V. 430. P. 419–421.

Belinsky S.A., Palmisano W.A., Gilliland F.D. et al. Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers // Cancer Res. 2002. V. 62. P. 2370–2377.

Bennett-Baker P.E., Wilkowski J., Burke D.T. Age-associated activation of epigenetically repressed genes in the mouse // Genetics. 2003. V. 165. P. 2055–2062.

Bird A. Perceptions of epigenetics // Nature. 2007. V. 447. P. 396–398.

Biron V.L., McManus K.J., Hu N. et al. Distinct dynamics and distribution of histone methyl-lysine derivatives in mouse development // Dev. Biol. 2004. V. 276. P. 337–351.

Bjornsson H.T., Fallin M.D., Feinberg A.P. An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease // Trends Genet. 2004. V. 20. P. 350–358.

Bjornsson H.T., Sigurdsson M.I., Fallin M.D. et al. Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering // JAMA. 2008. V. 299. P. 2877–2883.

Bleich S., Lenz B., Ziegenbein M. et al. Epigenetic DNA hypermethylation of the HERP gene promoter induces downregulation of its mRNA expression in patients with alcohol dependence // Alcohol Clin. Exp. Res. 2006. V. 30. P. 587–591.

Bobetsis Y.A., Barros S.P., Lin D.M. et al. Bacterial infection promotes DNA hypermethylation // J. Dent. Res. 2007. V. 86. P. 169–174.

Bonsch D., Lenz B., Fiszer R. et al. Lowered DNA methyltransferase (DNMT-3b) mRNA expression is associated with genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism // J. Neural Transm. 2006. V. 113. P. 1299–1304.

Bonsch D., Lenz B., Reulbach U. et al. Homocysteine associated genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism // J. Neural Transm. 2004. V. 111. P. 1611–1616.

Boyes J., Bird A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein // EMBO J. 1992. V. 11. P. 327–333.

Bradbury C.A., Khanim F.L., Hayden R. et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors // Leukemia. 2005. V. 19. P. 1751–1759.

Bradley C., van der Mee R, Roodi N. et al. Carcinogen-induced histone alteration in normal human mammary epithelial cells // Carcinogenesis. 2007. V. 28. P. 2184–2192.

Brown S.E., Fraga M.F., Weaver I.C. et al. Variations in DNA methylation patterns during the cell cycle of HeLa cells // Epigenetics. 2007. V. 2. P. 54–65.

Burdge G.C., Slater-Jefferies J., Torrens C. et al. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations // Br. J. Nutr. 2007. V. 97. P. 435–439.

Burke W., Press N. Genetics as a tool to improve cancer outcomes: ethics and policy // Nat. Rev. Cancer. 2006. V. 6. P. 476–482.

Bygren L.O., Kaati G., Edvinsson S. Longevity determined by paternal ancestors' nutrition during their slow growth period // Acta Biotheor. 2001. V. 49. P. 53–59.

Cadieux B., Ching T.T., VandenBerg S.R. et al. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation // Cancer Res. 2006. V. 66. P. 8469–8476.

Castro R., Rivera I., Blom H.J. et al. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview // J. Inherit. Metab. Dis. 2006. V. 29. P. 3–20.

Castro R., Rivera I., Struys E.A. et al. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease // Clin. Chem. 2003. V. 49. P. 1292–1296.

Champagne F.A., Weaver I.C., Diorio J. et al. Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor-alpha1b promoter and estrogen receptor-alpha expression in the medial preoptic area of female offspring // Endocrinology. 2006. V. 147. P. 2909–2915.

Chan T.L., Yuen S.T., Kong C.K. et al. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer // Nat. Genet. 2006. V. 38. P. 1178–1183.

Chan Y., Fish J.E., D'Abreo C. et al. The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 35087–35100.

Chandler V.L. "Paramutation: From Maize to Mice" // Cell. 2007. V. 128. P. 641–645.

Chang H.S., Anway M.D., Rekow S.S. et al. Transgenerational epigenetic imprinting of the male germline by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination // Endocrinology. 2006. V. 147. P. 5524–5541.

Chen H., Ke Q., Kluz T. et al. Nickel ions increase histone H3 lysine 9 dimethylation and induce transgene silencing // Mol. Cell Biol. 2006. V. 26. P. 3728–3737.

Chen W.Y., Wang D.H., Yen R.C. et al. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses // Cell. 2005. V. 123. P. 437–448.

Cheng R.Y., Hockman T., Crawford E. et al. Epigenetic and gene expression changes related to transgenerational carcinogenesis // Mol. Carcinog. 2004. V. 40. P. 1–11.

Cheung P., Lau P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants // Mol. Endocrinol. 2005. V. 19. P. 563–573.

Cho N.Y., Kim B.H., Choi M. et al. Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features // J. Pathol. 2007. V. 211. P. 269–277.

Chong S., Whitelaw E. Epigenetic germline inheritance // Curr. Opin. Genet. Dev. 2004. V. 14. P. 692–696.

Couture L.A., Abbott B.D., Birnbaum L.S. A critical review of the developmental toxicity and teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: recent advances toward understanding the mechanism // Teratology. 1990. V. 42. P. 619–627.

Cravo M.L., Camilo M.E. Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: relations to folic acid and vitamins B(6) and B(12) status // Nutrition. 2000. V. 16. P. 296–302.

Crews D., Gore A.C., Hsu T.S. et al. Transgenerational epigenetic imprints on mate preference // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 5942–5946.

Dabelea D., Hanson R.L., Lindsay R.S. et al. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships // Diabetes. 2000. V. 49. P. 2208–2211.

Davis C.D., Ross S.A. Dietary components impact histone modifications and cancer risk // Nutr. Rev. 2007. V. 65. P. 88–94.

Day J.K., Bauer A.M., DesBordes C. et al. Genistein alters methylation patterns in mice // J. Nutr. 2002. V. 132. P. 2419–2423.

Delcuve G.P., Rastegar M., Davie J.R. Epigenetic control // J. Cell Physiol. 2009. V. 219. P. 243–250.

Dennison E.M., Arden N.K., Keen R.W. et al. Birthweight, vitamin D receptor genotype and the programming of osteoporosis // Pediatr. Perinat. Epidemiol. 2001. V. 15. P. 211–219.

Desaulniers D., Xiao G.H., Leingartner K. et al. Comparisons of brain, uterus, and liver mRNA expression for cytochrome p450s, DNA methyltransferase-1, and catechol-o-methyltransferase in prepubertal female Sprague–Dawley rats exposed to a mixture of aryl hydrocarbon receptor agonists // Toxicol. Sci. 2005. V. 86. P. 175–184.

Dolinoy D.C., Huang D., Jirtle R.L. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2007a. V. 104. P. 13056–13061.

Dolinoy D.C., Weidman J.R., Jirtle R.L. Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease // Reprod. Toxicol. 2007b. V. 23. P. 297–307.

Dolinoy D.C., Weidman J.R., Waterland R.A. et al. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome // Environ Health Perspect. 2006. V. 114. P. 567–572.

Ehrlich M. Cancer-linked DNA hypomethylation and its relationship to hypermethylation // Curr. Top Microbiol. Immunol. 2006. V. 310. P. 251–274.

Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2005. V. 45. P. 629–656.

Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome // Hum. Mol. Genet. 2007a. V. 16. P. 50–59.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps // Nat. Rev. Genet. 2007b. V. 8. P. 286–298.

Fanapour P.C., Yug B., Kochar M.S. Hyperhomocysteinemia: an additional cardiovascular risk factor // WMJ. 1999. V. 98. P. 51–54.

Fang J.Y., Mikovits J.A., Bagni R. et al. Infection of lymphoid cells by integration-defective human immunodeficiency virus type 1 increases de novo methylation // J. Virol. 2001. V. 75. P. 9753–9761.

Fang M.Z., Jin Z., Wang Y. et al. Promoter hypermethylation and inactivation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in esophageal squamous cell carcinomas and its reactivation in cell lines // Int. J. Oncol. 2005. V. 26. P. 615–622.

Fang M.Z.,Wang Y., Ai N. et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines // Cancer Res. 2003. V. 63. P. 7563–7570.

Feinberg A.P., Ohlsson R., Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer // Nat. Rev. Genet. 2006. V. 7. P. 21–33.

Feinberg A.P. Epigenetics at the epicenter of modern medicine // JAMA. 2008. V. 299. P. 1345–1350.

Fenech M. The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis // Mutagenesis. 2005. V. 20. P. 255–269.

Fernandez-Twinn D.S., Ozanne S.E. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome // Physiol. Behav. 2006. V. 88. P. 234–243.

Flanagan J.M., Popendikyte V., Pozdniakovaite N. et al. Intra- and interindividual epigenetic variation in human germ cells // Am. J. Hum. Genet. 2006. V. 79. P. 67–84.

Foley D.L., Craig J.M., Morley R. et al. Prospects for Epigenetic Epidemiology // American Journal of Epidemiology. 2009. V. 169. P. 389–400.

Foster P.M. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters // Int. J. Androl. 2006. V. 29. P. 140–147.

Fraga M.F., Agrelo R., Esteller M. Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language // Ann. NY Acad. Sci. 2007. V. 1100. P. 60–74.

Fraga M.F., Ballestar E., Paz M.F. et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005a. V. 102. P. 10604–10609.

Fraga M.F., Ballestar E., Villar-Garea A. et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer // Nat. Genet. 2005b. V. 37. P. 391–400.

Fraga M.F., Esteller M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications // Cell Cycle. 2005. V. 4. P. 1377–1381.

Fraga M.F., Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks // Trends Genet. 2007. V. 23. P. 413–418.

Frieling H., Bleich S., Otten J. et al. Epigenetic downregulation of atrial natriuretic peptide but not vasopressin mRNA expression in females with eating disorders is related to impulsivity // Neuropsychopharmacology. 2008. V. 33. P. 2605–2609.

Frieling H., Gozner A., Romer K.D. et al. Global DNA hypomethylation and DNA hypermethylation of the alpha synuclein promoter in females with anorexia nervosa // Mol. Psychiatry. 2007. V. 12. P. 229–230.

Friso S., Choi S.W. Gene-nutrient interactions and DNA methylation // J. Nutr. 2002. V. 132. P. 2382–2387.

Garg V. Insights into the genetic basis of congenital heart disease // Cell Mol. Life Sci. 2006. V. 63. P. 1141–1148.

Gluckman P.D., Hanson M.A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease // Science. 2004a. V. 305. P. 1733–1736.

Gluckman P.D., Hanson M.A. The developmental origins of the metabolic syndrome // Trends Endocrinol. Metab. 2004b. V. 15. P. 183–187.

Godfrey K.M., Lillycrop K.A., Burdge G.C. et al. Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease // Pediatr. Res. 2007. V. 61. P. 5–10.

Golding J., Pembrey M., Jones R. et al. ALSPAC – the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. I. Study methodology // Paediatr. Perinat. Epidemiol. 2001. V. 15. P. 74–87.

Goyal R., Reinhardt R., Jeltsch A. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase // Nucleic. Acids Res. 2006. V. 34. P. 1182–1188.

Gravina S., Vijg J. Epigenetic factors in aging and longevity // Pflugers Arch. 2009. (in press).

Gutierrez M.I., Siraj A.K., Khaled H. et al. CpG island methylation in Schistosoma- and non-Schistosoma-associated bladder cancer // Mod. Pathol. 2004. V. 17. P. 1268–1274.

Ha M., Yoo K.Y., Cho S.H. Glycophorin A mutant frequency in radiation workers at the nuclear power plants and a hospital // Mutat. Res. 2002. V. 501. P. 45–56.

Habib M., Fares F., Bourgeois C.A. et al. DNA global hypomethylation in EBV-transformed interphase nuclei // Exp. Cell Res. 1999. V. 249. P. 46–53.

Hammen C. Stress and depression // Annu. Rev. Clin. Psychol. 2005. V. 1. P. 293–319.

Hatchwell E., Greally J.M. The potential role of epigenomic dysregulation in complex human disease // Trends Genet. 2007. V. 23. P. 588–595.

Heijmans B.T., Tobi E.W., Lumey L.H., Slagboom P.E. The epigenome: Archive of the prenatal environment // Epigenetics. 2009. V. 4. P. 1–6

Heijmans B.T., Tobi E.W., Stein A.D. et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 17046–17049.

Hemminki K., Lorenzo Bermejo J., Forsti A. The balance between heritable and environmental aetiology of human disease // Nat. Rev. Genet. 2006. V. 7. P. 958–965.

Herceg Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors // Mutagenesis. 2007. V. 22. P. 91–103.

Herrmann W. The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview // Clin. Chem. Lab. Med. 2001. V. 39. P. 666–674.

Ho S.M., Tang W.Y. Techniques used in studies of epigenome dysregulation due to aberrant DNA methylation: an emphasis on fetal-based adult diseases // Reprod. Toxicol. 2007. V. 23. P. 267–282.

Ho S.M., Tang W.Y., Belmonte de Frausto J. et al. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4 // Cancer Res. 2006. V. 66. P. 5624–5632.

Holliday R. DNA methylation and epigenetic mechanisms // Cell Biophys. 1989. V. 15. P. 15–20.

Holliday R. Mutations and epimutations in mammalian cells // Mutat. Res. 1991. V. 250. P. 351–363.

Hsieh C.L. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density // Mol. Cell Biol. 1994. V. 14. P. 5487–5494.

Cobiac L. Epigenomics and nutrition. Forum Nutr. 2007. V. 60. P. 31–41.

Isaac C.E., Francis S.M., Martens A.L. et al. The retinoblastoma protein regulates pericentric heterochromatin // Mol. Cell Biol. 2006. V. 26. P. 3659–3671.

Issa J.P. CpG-island methylation in aging and cancer // Curr. Top Microbiol. Immunol. 2000. V. 249. P. 101–118.

Jacob R.A. Evidence that diet modification reduces in vivo oxidant damage // Nutr. Rev. 1999. V. 57. P. 255–258.

Jaenisch R., Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals // Nat. Genet. 2003. V. 33. P. 245–254.

Jefferson W.N., Padilla-Banks E., Newbold R.R. Disruption of the female reproductive system by the phytoestrogen genistein // Reprod. Toxicol. 2007. V. 23. P. 308–316.

Jiang Y.H., Bressler J., Beaudet A.L. Epigenetics and human disease // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2004. V. 5. P. 479–510.

Johannes F., Porcher E., Teixeira F.K. et al. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits // PLoS Genet. 2009. In press.

Jones I.M., Galick H., Kato P. et al. Three somatic genetic biomarkers and covariates in radiation-exposed Russian cleanup workers of the Chernobyl nuclear reactor 6–13 years after exposure // Radiat. Res. 2002. V. 158. P. 424–442.

Jones P.A., Baylin S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer // Nat. Rev. Genet. 2002. V. 3. P. 415–428.

Kaati G., Bygren L.O., Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period // Eur. J. Hum. Genet. 2002. V. 10. P. 682–688.

Kaati G., Bygren L.O., Pembrey M. et al. Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity // Eur. J. Hum. Genet. 2007. V. 15. P. 784–790.

Kafri T., Ariel M., Brandeis M. et al. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line // Genes Dev. 1992. V. 6. P. 705–714.

Kaminsky Z.A., Tang T., Wang S.C. et al. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins // Nat. Genet. 2009. V. 41. P. 240–245.

Kangaspeska S., Stride B., Me'tivier R. et al. Transient cyclical methylation of promoter DNA // Nature. 2008. V. 452. P. 112–115.

Kapoor-Vazirani P., Kagey J.D., Powell D.R., Vertino P.M. Role of hMOF-dependent histone H4 lysine 16 acetylation in the maintenance of TMS1/ASC gene activity // Cancer Res. 2008. V. 68. P. 6810–6821.

Khoury M.J. Genetic epidemiology and the future of disease prevention and public health // Epidemiol. Rev. 1997. V. 19. P. 175–180.

Khoury M.J. Human Genome Epidemiology: A Scientific Foundation for Using Genetic Information to Improve Health and Prevent Disease // New York, NY: Oxford University Press. 2003.

Kitajima Y., Ohtaka K., Mitsuno M. et al. Helicobacter pylori infection is an independent risk factor for Runx3 methylation in gastric cancer // Oncol. Rep. 2008. V. 19. P. 197–202.

Kitazawa R., Kitazawa S. Methylation status of a single CpG locus 3 bases upstream of TATA-box of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) gene promoter modulates cell- and tissue-specific RANKL expression and osteoclastogenesis // Mol. Endocrinol. 2007. V. 21. P. 148–158.

Kristiansen M., Knudsen G.P., Bathum L. et al. Twin study of genetic and aging effects on X chromosome inactivation // Eur. J. Hum. Genet. 2005. V. 13. P. 599–606.

Kroll T.G. Molecular events in follicular thyroid tumors // Cancer Treat Res. 2004. V. 122. P. 85–105.

Kuzmichev A., Margueron R., Vaquero A. et al. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 1859–1864.

Lamartiniere C.A., Cotroneo M.S., Fritz W.A. et al. Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate // J. Nutr. 2002. V. 132. P. 552–558.

Lee W.J., Shim J.Y., Zhu B.T. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids // Mol. Pharmacol. 2005. V. 68. P. 1018–1030.

Leopardi P., Marcon F., Caiola S. et al. Effects of folic acid deficiency and MTHFR C677T polymorphism on spontaneous and radiation-induced micronuclei in human lymphocytes // Mutagenesis. 2006. V. 21. P. 327–333.

Li S., Hansman R., Newbold R. et al. Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-fos expression and hypomethylation in its exon-4 in mouse uterus // Mol. Carcinog. 2003. V. 38. P. 78–84.

Li S., Washburn K.A., Moore R. et al. Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus // Cancer Res. 1997. V. 57. P. 4356–4359.

Lillycrop K.A., Phillips E.S., Jackson A.A. et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring // J. Nutr. 2005. V. 135(6). P. 1382–1386.

Limpaiboon T., Khaenam P., Chinnasri P. et al. Promoter hypermethylation is a major event of hMLH1 gene inactivation in liver fluke related cholangiocarcinoma // Cancer Lett. 2005. V. 217. P. 213–219.

Liu H., Zhou Y., Boggs S.E. et al. Cigarette smoke induces demethylation of prometastatic oncogene synuclein-gamma in lung cancer cells by downregulation of DNMT3B // Oncogene. 2007. V. 26. P. 5900–5910.

Liu L., Wylie R.C., Andrews L.G. et al. Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection // Mech. Ageing Dev. 2003. V. 124. P. 989–998.

Liu Y., Freedman B.I. Genetics of progressive renal failure in diabetic kidney disease // Kidney Int. 2005. V. 99. P. 94–97.

Lopez A.D., Mathers C.D., Ezzati M. et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data // Lancet. 2006. V. 367. P. 1747–1757.

Lumey L.H., Stein A.D. In utero exposure to famine and subsequent fertility: The Dutch Famine Birth Cohort Study // Am. J. Public. Health. 1997. V. 87. P. 1962–1966.

Lund G., Andersson L., Lauria M. et al. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 29147–29154.

Lyn-Cook B.D., Blann E., Payne P.W. et al. Methylation profile and amplification of proto-oncogenes in rat pancreas induced with phytoestrogens // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1995. V. 208. P. 116–119.

Maffini M.V., Rubin B.S., Sonnenschein C., Soto A.M. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A // Mol. Cell Endocrinol. 2006. V. 254–255. P. 179–186.

Martinowich K., Hattori D., Wu H. et al. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation // Science. 2003. V. 302. P. 890–893.

Mason J.B., Choi S.W. Effects of alcohol on folate metabolism: implications for carcinogenesis // Alcohol. 2005. V. 35. P. 235–241.

Mastroeni D., McKee A., Grover A. et al. Epigenetic differences in cortical neurons from a pair of monozygotic twins discordant for Alzheimer's disease // PLoS ONE. 2009. V. 4. P. 6617.

Matzke M.A., Birchler J.A. RNAi-mediated pathways in the nucleus // Nat. Rev. Genet. 2005. V. 6. P. 24–35.

McGowan P.O., Sasaki A., D'Alessio A.C. et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse // Nature Neuroscience. 2009. V. 12. P. 342 – 348.

McLachlan J.A., Simpson E., Martin M. Endocrine disrupters and female reproductive health // Best Pract. Res. Clin. Endocrino Metab. 2006. V. 20. P. 63–75.

Meaney M.J., Szyf M., Seckl J.R. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health // Trends Mol. Med. 2007. V. 13. P. 269–277.

Meng Z., Qin G., Zhang B. DNA damage in mice treated with sulfur dioxide by inhalation // Environ. Mol. Mutagen. 2005. V. 46. P. 150–155.

Metivier R., Gallais R., Tiffoche C. et al. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter // Nature. 2008. V. 452. P. 45–50.

Mikovits J.A., Young H.A., Vertino P. et al. Infection with human immunodeficiency virus type 1 upregulates DNA methyltransferase, resulting in *de novo* methylation of the gamma interferon (IFN-gamma) promoter and subsequent downregulation of IFN-gamma production // Mol. Cell. Biol. 1998. V. 18. P. 5166–5177.

Mill J., Tang T., Kaminsky Z. et al. Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis // Am. J. Hum. Genet. 2008. V. 82. P. 696–711.

Miller R.L., Ho S.M. Environmental epigenetics and asthma: current concepts and call for studies // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2008. V. 177. P. 567–573.

Miyazaki T., Murayama Y., Shinomura Y. et al. E-cadherin gene promoter hypermethylation in *H. pylori*-induced enlarged fold gastritis // Helicobacter. 2007. V. 12. P. 523–531.

Mohr D.C., Pelletier D. A temporal framework for understanding the effects of stressful life events on inflammation in patients with multiple sclerosis // Brain Behav. Immun. 2006. V. 20. P. 27–36.

Monk M., Boubelik M., Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development // Development. 1987. V. 99. P. 371–382.

Moore M.A. Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal // Exp. Hematol. 2005. V. 33. P. 719–737.

Morris K.V. siRNA-mediated transcriptional gene silencing: the potential mechanism and a possible role in the histone code // Cell Mol. Life Sci. 2005. V. 62. P. 3057–3066.

Murgatroyd C., Patchev A.V., Wu Y. et al. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress // Nature Neuroscience. 2009. V. 12. P. 1559–1566.

Muskiet F.A. The importance of (early) folate status to primary and secondary coronary artery disease prevention // Reprod. Toxicol. 2005. V. 20. P. 403–410.

Niemitz E.L., Feinberg A.P. Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation // Am. J. Hum. Genet. 2004. V. 74. P. 599–609.

Northrop J.K., Thomas R.M., Wells A.D. et al. Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN-gamma loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells // J. Immunol. 2006. V. 177. P. 1062–1069.

Pang Y., Norihisa Y., Benjamin D. et al. Interferon-gamma gene expression in human B-cell lines: induction by interleukin-2, protein kinase C activators, and possible effect of hypomethylation on gene regulation // Blood. 1992. V. 80. P. 724–732.

Pembrey M.E., Bygren L.O., Kaati G. et al. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans // Eur. J. Hum. Genet. 2006. V. 14. P. 159–166.

Perri F., Cotugno R., Piepoli A. et al. Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of *H. pylori* infected patients and effect of eradication // Am. J. Gastroenterol. 2007. V. 102. P. 1361–1371.

Petronis A. Human morbid genetics revisited: relevance of epigenetics // Trends Genet. 2001. V. 17, P. 142–146.

Pfister S., Rea S., Taipale M. et al. The histone acetyltransferase hMOF is frequently downregulated in primary breast carcinoma and medulloblastoma and constitutes a biomarker for clinical outcome in medulloblastoma // Int. J. Cancer. 2008. V. 122, P. 1207–1213.

Pogribny I.P., Ross S.A., Tryndyak V.P. et al. Histone H3 lysine 9 and H4 lysine 20 trimethylation and the expression of Suv4-20h2 and Suv-39h1 histone methyltransferases in hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats // Carcinogenesis. 2006. V. 27. P. 1180–1186.

Poirier L.A., Vlasova T.I. The prospective role of abnormal methyl metabolism in cadmium toxicity // Environ. Health Perspect. 2002. V. 110. P. 793–795.

Post R.M., Leverich G.S. The role of psychosocial stress in the onset and progression of bipolar disorder and its comorbidities: the need for earlier and alternative modes of therapeutic intervention // Dev. Psychopathol. 2006. V. 18. P. 1181–1211.

Poulsen P., Esteller M., Vaag A., Fraga M.F. The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases // Pediatr. Res. 2007. V. 61. P. 38–42.

Prins G.S., Birch L., Tang W.Y. et al. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging // Reprod. Toxicol. 2007. V. 23. P. 374–382.

Prokocimer M., Margalit A., Gruenbaum Y. The nuclear lamina and its proposed roles in tumorigenesis: projection on the hematologic malignancies and future targeted therapy // J. Struct. Biol. 2006. V. 155. P. 351–360.

Pruitt K., Zinn R.L., Ohm J.E. et al. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation // PLoS Genet. 2006. V. 2. P. 40.

Pulling L.C., Vuillemenot B.R., Hutt J.A. et al. Aberrant promoter hypermethylation of the death-associated protein kinase gene is early and frequent in murine lung tumors induced by cigarette smoke and tobacco carcinogens // Cancer Res. 2004. V. 64. P. 3844–3848.

Rakyan V.K., Blewitt M.E., Druker R. et al. Metastable epialleles in mammals // Trends Genet. 2002. V. 18. P. 348–351.

Rakyan V.K., Chong S., Champ M.E. et al. Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 2538–2543.

Ravelli A.C., Van Der Meulen J.H., Michels R.P. et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine // Lancet. 1998. V. 351. P. 173–177.

Reik W., Dean W., Walter J. Epigenetic reprogramming in ammalian development // Science. 2001. V. 293. P. 1089–1093.

Richardson B. Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer // J. Nutr. 2002. V. 132. P. 2401–2405.

Richardson B. Impact of aging on DNA methylation // Ageing Res. Rev. 2003. V. 2. P. 245–261.

Ronn T., Poulsen P., Hansson O. et al. Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle // Diabetologia. 2008. V. 51. P. 1159–1168.

Rubin M.M. Antenatal exposure to DES: lessons learned future concerns // Obstet. Gynecol. Surv. 2007. V. 62. P. 548–555.

Salnikow K., Costa M. Epigenetic mechanisms of nickel carcinogenesis // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 2000. V. 19. P. 307–318.

Sasaki T., Maier B., Bartke A., Scrable H. Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal // Aging Cell. 2006. V. 5. P. 413–422.

Saze H. Epigenetic memory transmission through mitosis and meiosis in plants // Semin. Cell Dev. Biol. 2008. V. 19. P. 527–536.

Scaffidi P., Misteli T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome // Nat. Med. 2005. V. 11. P. 440–445.

Schanen N.C. Epigenetics of autism spectrum disorders // Hum. Mol. Genet. 2006. V. 15. P. 138–150.

Scher H.I., Sawyers C.L. Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis // J. Clin. Oncol. 2005. V. 23. P. 8253–8261.

Schulz W.A., Steinhoff C., Florl A.R. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease // Curr. Top Microbiol. Immunol. 2006. V. 310. P. 211–250.

Schumacher A. Epigenetics of Aging In book: Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics // Tollefsbol, T.O. (ed.). 2010. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands (In press).

Schumacher A., Kapranov P., Kaminsky Z. et al. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34. P. 528–542.

Schumacher A., Petronis A. Epigenetics of complex diseases: from general theory to laboratory experiments // Curr. Top Microbiol. Immunol. 2006. V. 310. P. 81–115.

Seligson D.B., Horvath S., Shi T. et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence // Nature. 2005. V. 435. P. 1262–1266.

Sharma R., Nakamura A., Takahashi R. et al. Carbonyl modification in rat liver histones: decrease with age and increase by dietary restriction // Free Radic. Biol. Med. 2006. V. 40. P. 1179–1184.

Shiao Y.H., Crawford E.B., Anderson L.M. et al. Allelespecific germ cell epimutation in the spacer promoter of the 45S ribosomal RNA gene after Cr(III) exposure // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2005. V. 205. P. 290–296.

Shumaker D.K., Dechat T., Kohlmaier A. et al. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. V. 103. P. 8703–8708.

Siegmund K.D., Connor C.M., Campan M. et al. DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons // PLoS ONE. 2007. V. 2. P. 895.

Silbergeld E.K., Waalkes M., Rice J.M. Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. Am. J. Ind. Med. 2000. V. 38. P. 316–323.

Singhal R.P., Mays-Hoopes L.L., Eichhorn G.L. DNA methylation in aging of mice // Mech. Ageing Dev. 1987. V. 41. P. 199–210.

Smith S.J., Li Y., Whitley R. et al. Molecular epidemiology of p53 protein mutations in workers exposed to vinyl chloride // Am. J. Epidemiol. 1998. V. 147. P. 302–308.

Soussi T., Ishioka C., Claustres M., Beroud C. Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience // Nat. Rev. Cancer. 2006. V. 6. P. 83–90.

Steinke J.W., Rich S.S., Borish L. Genetics of allergic disease // J. Allergy Clin. Immunol. 2008. V. 121. P. 384–416.

Stojanovich L., Marisavljevich D. Stress as a trigger of autoimmune disease // Autoimmun. Rev. 2008. V. 7. P. 209–213.

Strausbaugh S.D., Davis P.B. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology // Clin. Chest. Med. 2007. V. 28. P. 279–288.

Suter C.M., Martin D.I., Ward R.L. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers // Nat. Genet. 2004. V. 36. P. 497–501.

Szyf M. Early life, the epigenome and human health // Acta Paediatr. 2009. V. 98. P. 1082–1084.

Szyf M., McGowan P., Meaney M.J. The social environment and the epigenome // Environ. Mol. Mutagen. 2008. V. 49. P. 46–60.

Takiguchi M., Achanzar W.E., Qu W. et al. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation // Exp. Cell Res. 2003. V. 286. P. 355–365.

Tamashiro K.L., Wakayama T., Akutsu H. et al. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring // Nat. Med. 2002. V. 8. P. 262–267.

Tao L., Wang W., Li L. et al. DNA hypomethylation induced by drinking water disinfection by-products in mouse and rat kidney // Toxicol. Sci. 2005. V. 87. P. 344–352.

Thompson C., Syddall H., Rodin I. et al. Birth weight and the risk of depressive disorder in late life // Br. J. Psychiatry. 2001. V. 179. P. 450–455.

Thrall G., Lane D., Carroll D. et al. A systematic review of the effects of acute psychological stress and physical activity on haemorheology, coagulation, fibrinolysis and platelet reactivity: implications for the pathogenesis of acute coronary syndromes // Thrombo Res. 2007. V. 120. P. 819–847.

Tobi E.W., Lumey L.H., Talens R.P. et al. DNA Methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific // Hum. Mol. Genet. 2009. V. 18. P. 4046–4053.

Tohgi H., Utsugisawa K., Nagane Y. et al. Reduction with age in methylcytosine in the promoter region -224 approximately -101 of the amyloid precursor protein gene in autopsy human cortex // Brain Res. Mol. Brain. Res. 1999. V. 70. P. 288–292.

Tra J., Kondo T., Lu Q. et al. Infrequent occurrence of age-dependent changes in CpG island methylation as detected by restriction landmark genome scanning // Mech. Ageing Dev. 2002. V. 123. P. 1487–1503.

Tusie Luna M.T. Genes and type 2 diabetes mellitus // Arch. Med. Res. 2005. V. 36. P. 210–222.

Vadlamudi S., Kalhan S.C., Patel M.S. Persistence of metabolic consequences in the progeny of rats fed aHCformula in their early postnatal life // Am. J. Physiol. 1995. V. 269. P. 731–738.

Valachovicova T., Slivova V., Bergman H. et al. Soy isoflavones suppress invasiveness of breast cancer cells by the inhibition of NF-kappaB/AP-1-dependent and -independent pathways // Int. J. Oncol. 2004. V. 25. P. 1389–1395.

Van Engeland M., Weijenberg M.P., Roemen G.M. et al. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Nether-

lands cohort study on diet and cancer // Cancer Res. 2003. V. 63. P. 3133–3137.

Van Speybroeck L. From epigenesis to epigenetics: the case of C.H. Waddington // Ann. NY Acad. Sci. 2002. V. 981. P. 61–81.

Vanyushin B.F., Tkacheva S.G., Belozersky A.N. Rare bases in animal DNA // Nature. 1970. V. 225. P. 948–949.

Vaquero A., Scher M., Lee D. et al. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin // Mol. Cell. 2004. V. 16. P. 93–105.

Verdel A., Jia S., Gerber S. et al. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex // Science. 2004. V. 303. P. 672–676.

Veurink M., Koster M., Berg L.T. The history of DES, lessons to be learned // Pharm. World Sci. 2005. V. 27. P. 139–143.

Waalkes M.P., Liu J., Ward J.M., Diwan B.A. Mechanisms underlying arsenic carcinogenesis: hypersensitivity of mice exposed to inorganic arsenic during gestation // Toxicology. 2004a. V. 198. P. 31–38.

Waalkes M.P., Ward J.M., Diwan B.A. Induction of tumors of the liver, lung, ovary and adrenal in adult mice after brief maternal gestational exposure to inorganic arsenic: promotional effects of postnatal phorbol ester exposure on hepatic and pulmonary, but not dermal cancers // Carcinogenesis. 2004b. V. 25. P. 133–141.

Waddington C.H. The stragegy of the genes: a discussion of some aspects of theoretical biology // New York: Macmillan. 1957.

Wang S.C., Oelze B., Schumacher A. Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease // PLoS ONE. 2008. V. 3. P. 2698.

Waterland R.A. Does nutrition during infancy and early childhood contribute to later obesity via metabolic imprinting of epigenetic gene regulatory mechanisms? // Nestle Nutr. 2005. V. 56. P. 157–174.

Waterland R.A. Is epigenetics an important link between early life events and adult disease? // Horm. Res. 2009. V. 71. P. 13–16.

Waterland R.A., Dolinoy D.C., Lin J.R. et al. Maternal methyl supplements increase offspring DNAmethylation at Axin Fused // Genesis. 2006. V. 44. P. 401–406.

Waterland R.A., Garza C. Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats // J. Nutr. 2002. V. 132. P. 357–364.

Waterland R.A., Jirtle R.L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation // Mol. Cell. Biol. 2003. V. 23. P. 5293–5300.

Waterland R.A., Lin J.R., Smith C.A., Jirtle R.L. Post-weaning diet affects genomic imprinting at the insulin-like growth factor 2 (Igf2) locus // Hum. Mol. Genet. 2006. V. 15. P. 705–716.

Weaver I.C., Champagne F.A., Brown S.E. et al. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life // J. Neurosci. 2005. V. 25. P. 11045–11054.

Wells J.C. Flaws in the theory of predictive adaptive responses // Trends Endocrinol. Metab. 2007. V. 18. P. 331–337.

Welshons W.V., Nagel S.C., vom Saal F.S. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure // Endocrinology. 2006. V. 147. P. 56–69.

Willett W.C. Balancing life-style and genomics research for disease prevention // Science. 2002. V. 296. P. 695–698.

Wilson A.S., Power B.E., Molloy P.L. DNA hypomethylation and human diseases // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1775. P. 138–162.

Wilson V.L., Jones P.A. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells // Science. 1983. V. 220. P. 1055–1057.

Wilson V.L., Smith R.A., Ma S. et al. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 9948–9951.

Wren J.D., Garner H.R. Data-mining analysis suggests an epigenetic pathogenesis for type 2 diabetes // J. Biomed. Biotechnol. 2005. P. 104–112.

Wu L.L., Wu J.T. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker // Clin. Chim. Acta. 2002. V. 322. P. 21–28.

Wu Q., Ohsako S., Ishimura R. et al. Exposure of mouse preimplantation embryos to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzopdioxin (TCDD) alters the methylation status of imprinted genes *H19* and *Igf2* // Biol. Reprod. 2004. V. 70. P. 1790–1797.

Yenbutr P., Hilakivi-Clarke L., Passaniti A. Hypomethylation of an exon I estrogen receptor CpG island in spontaneous and carcinogen-induced mammary tumorigenesis in the rat // Mech. Ageing Dev. 1998. V. 106. P. 93–102.

Yeung F., Hoberg J.E., Ramsey C.S. et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase // EMBO J. 2004. V. 23. P. 2369–2380.

Ying A.K., Hassanain H.H., Roos C.M. et al. Methylation of the estrogen receptor-alpha gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells // Cardiovasc. Res. 2000. V. 46. P. 172–179.

Yokomori N., Tawata M., Onaya T. DNA demethylation during the differentiation of 3T3-L1 cells affects the expression of the mouse *GLUT4* gene // Diabetes. 1999. V. 48. P. 685–690.

Young L.E., Fernandes K., McEvoy T.G. et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture // Nat. Genet. 2001. V. 27. P. 153–154.

Yu W., Sipowicz M.A., Haines D.C. et al. Preconception urethane or chromium(III) treatment of male mice: multiple neoplastic and non-neoplastic changes in offspring // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1999. V. 158. P. 161–176.

Zawia N.H., Basha M.R. Environmental risk factors and the developmental basis for Alzheimer's disease // Rev. Neurosci. 2005. V. 16. P. 325–337.

Zhang Z., Deng C., Lu Q. et al. Age-dependent DNA methylation changes in the ITGAL (CD11a) promoter // Mech. Ageing. Dev. 2002. V. 123. P. 1257–1268.

Zhu R., Li B.Z., Li H. et al. Association of p16INK4A hypermethylation with hepatitis B virus X protein expression in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis // Pathol. Int. 2007. V. 57. P. 328–336.

Epigenetic Epidemiology of Age-Related Diseases

A. M. Vaiserman, V. P. Voitenko, and L. V. Mekhova

Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Vyshgorodskaya ul. 67, Kiev, 04114 Ukraine
e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua

Abstract—Many studies have shown that our organism is mostly sensitive to different influences in pre- and postnatal periods of ontogenesis. During the critical periods of maturation, these influences induce changes in the organism that relate to ontogenetic plasticity and lead to permanent changes in structure and function of different organ systems of the organism. It is suggested that the main molecular mechanisms of so-called "ontogenetic programming" are based on changes that occur on the epigenetic level, including changes in the genetic expression not connected with modifications of DNA structure. The present review deals with experimental and epidemiologic evidences of the role of epigenetic processes in aging and determination of susceptibility to some age-related diseases, such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases, and insulin-independent diabetes.

Keywords: age-related diseases, programming, aging, epigenetic modifications

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 1, с. 51–56

ФИЗИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

УДК 636.2:612.621

ОСВОБОЖДЕНИЕ Ca^{2+} ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО ООЦИТОВ СВИНЕЙ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РОСТА

© 2011 г. В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН 196600 Санкт-Петербург, Пушкин, Московское шоссе, д. 55а

E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Поступила в редакцию 05.11.10 г.
Окончательный вариант получен 30.04.10 г.

Исследовано освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней с помощью Ca^{2+}-чувствительного флуоресцентного зонда хлортетрациклин. Селекция ооцитов на растущие и завершившие стадию роста проведена с помощью витального красителя бриллиантового голубого (БСВ); окрашенные ооциты (БСВ "+") определяли как закончившие рост, неокрашенные (БСВ "–") находились на завершении фазы роста. В БСВ "+" и БСВ "–" ооцитах пролактин, теофиллин, ГТФ и ГДФ вызывают освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В завершивших стадию роста ооцитах совместное действие пролактина и ГТФ активирует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, в котором участвует протеинкиназа С; в растущих ооцитах совместное действие пролактина и ГТФ не вызывает дополнительного выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Совместное действие теофиллина и ГДФ в растущих и завершивших стадию роста ооцитах способствует дополнительному освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо, и это освобождение регулируется протеинкиназой А. Полученные данные свидетельствуют о различных путях освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо в растущих и завершивших стадию роста ооцитах свиньи.

Ключевые слова: кальций, ооциты свиньи, БСВ.

Увеличение концентрации внутриклеточного кальция в клетках происходит вследствие входа внеклеточного кальция и освобождения кальция из внутриклеточных депо (Berridge, Irvine, 1989; Berridge, 2004). Основными внутриклеточными депо, из которых осуществляется выход кальция, являются рианодин- и IP_3-чувствительные. В ооцитах различных видов животных показано присутствие депо обоих типов (Yue et al., 1995; Machaty et al., 1997). При созревании ооцитов происходят интрацеллюлярные преобразования, часть из которых связана с формированием внутриклеточных депо. В незрелых ооцитах свиньи внутриклеточные депо кальция окончательно не сформированы, при завершении роста ооцитов отмечается увеличение размера внутриклеточных депо, и количество кальция, запасенного в них, возрастает (Machaty et al., 1997).

Бриллиантовый голубой (БСВ) является витальным красителем, который свидетельствует о внутриклеточной активности фермента глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (G6PDH) (Alm et al., 2005). В ооцитах синтезируются различные белки (Wassarman, 1988), включая G6PDH. Активность этого фермента существенна в растущих ооцитах, однако, в клетках, завершивших стадию роста, она снижается. БСВ-тест основан на способности G6PDH конвертировать БСВ из голубой окраски в бесцветную. Это наблюдается в растущих ооцитах (Ericsson et al., 1993). В цитоплазме завершивших стадию роста ооцитах БСВ не теряет свой цвет.

Цель настоящего исследования – идентификация путей сигнальной трансдукции в ооцитах в зависимости от их функционального статуса (растущие и завершившие стадию роста) на основе исследования флуктуации содержания Ca^{2+} во внутриклеточных депо.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследований использовали ооциты свиней, забитых на мясокомбинате. Ооцит-кумулюсные комплексы выделяли из яичников на стадии фолликулярного роста, без признаков видимой патологии аспирацией фолликулов диаметром 3–6 мм. В опытах использовали ооциты округлой формы, с тонкогранулированной ооплазмой и равномерной по ширине зоной пеллюцида. Инкубацию выделенных ооцитов проводили в модифицированной инкубационной среде Дюльбекко без

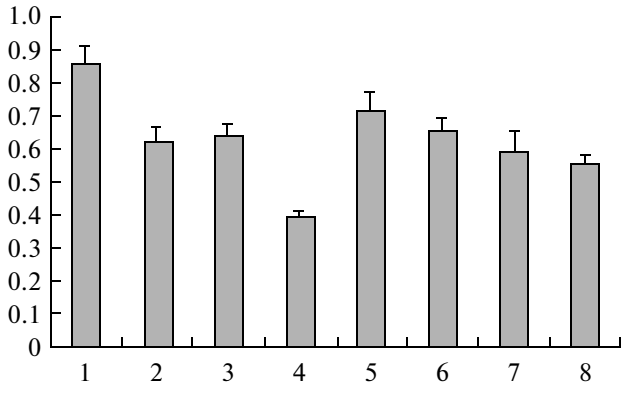


Рис. 1. Влияние ингибирования протеинкиназы С на стимулированное пролактином и ГТФ освождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ВСВ "+" ооцитов свиней. По горизонтали: 1 – контрольные клетки; 2 – активация пролактином в концентрации 50 нг/мл; 3 – 10 мкМ ГТФ; 4 – совместное действие пролактина и ГТФ; 5 – действие 10 нг/мл Ro 31-8220; 6 – действие Ro 31-8220 с последующей обработкой пролактином; 7 – действие Ro 31-8220 с последующей обработкой ГТФ; 8 – 10 нг/мл Ro 31-8220 и последующее совместное действие пролактина и ГТФ. По оси ординат – интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед. Различия достоверны при: $P < 0.001$ (1 и 2; 1 и 3; 2 и 4; 3 и 4). Здесь и далее представлены изменения Ca^{2+}, полученные в 4–5 экспериментах.

$CaCl_2$, содержащей 36 мг/л пирувата Na и 1 г/л глюкозы.

При приготовлении маточного раствора ВСВ (бриллиантового голубого кристаллического) использовали среду PBS с 0.4%-ным BCA. Концентрация ВСВ в маточном растворе составляла 260 мкМ. Окрашивание ооцитов свиньи проводили совместно с клетками кумулюса при концентрациии ВСВ 13 мкМ. Продолжительность инкубации ооцитов в присутствии красителя составляла 60 мин при температуре 37°С. Объем раствора красителя, необходимого для окраски одного ооцита, был равен 200 мкл. По цвету окраски ооциты распределяли на две группы – окрашенные (завершившие стадию роста) и неокрашенные (растущие). Выбор концентрации и времении экспозиции основывался на данных, полученных Roca (Roca et al., 1998).

Уровень содержания кальция во внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклин (ХТЦ). Ооциты экспонировали в течение 5 мин при 37°С в инкубационной среде, содержащей 40 мкМ ХТЦ. Затем клетки три раза отмывали в инкубационной среде и переносили на специальное кварцевое стекло с ячейками объемом 0.05 мл. Зависимую от Ca^{2+} флуоресценцию ХТЦ регистрировали в ооцитах в среде Дюльбекко.

Интенсивность флуоресценции зонда ХТЦ измеряли на флуориметрической установке, состоящей из люминесцентного микроскопа, снабженного необходимыми светофильтрами и фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Комплекс ХТЦ-Ca^{2+}-мембрана возбуждали светом 380–400 нм, флуоресценцию регистрировали в области 530 нм. Интенсивность флуоресценции измеряли в усл. ед. Длительность воздействия ультрафиолетового излучения на ооциты при проведении измерений не превышала 5 сек.

В работе использовали следующие реагенты: инкубационную среду Дюльбекко, не содержащую $CaCl_2$, ингибитор протеинкиназы С Ro 31-8220, ингибитор протеинкиназы А H-89, теофиллин, ВСВ ("Sigma", США), ХТЦ ("ICN", США), гуанозинтрифосфат, гуанозиндифосфат ("Reanal", Венгрия), гипофизарный бычий пролактин (20.0 МЕ/мг; Институт эндокринологии, Москва). Ro 31-8220 и H-89 растворяли в диметилсульфоксиде, остальные реактивы в среде Дюльбекко.

Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4–5 независимых экспериментов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После селекции исходной популяции ооцит-кумулюсных комплексов с учетом морфологических критериев (число слоев окружающего ооцит кумулюса, гомогенность ооплазмы и ширина зоны пеллюцида), ооцит-кумулюсные комплексы, без признаков видимой дегенерации, инкубировали в среде с ВСВ. В экспериментах использовали окрашенные ооциты (ВСВ "+") и ооциты, лишенные окраски (ВСВ "–"). Показано, что окрашенные ВСВ ооциты свиней значительно больше в диаметре, чем неокрашенные (113 мкм против 103 мкм) (Roca et al., 1998). В соответствии с литературными данными ВСВ "+" ооциты определены, как завершившие стадию роста, а ВСВ "–" ооциты – находящиеся в фазе ее завершения (Alm et al., 2005). Результаты экспериментов по оценке влияния ингибирования протеинкиназы С на вызванное пролактином и ГТФ освобождение Ca^{2+} в ВСВ "+" ооцитах свиней показаны на рис. 1. Внесение в среду инкубации пролактина в концентрации 50 нг/мл или ГТФ в концентрации 10 мкМ приводило к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов. Совместное действие пролактина и ГТФ вызывало дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Обработка ооцитов ингибитором протеинкиназы С соединением Ro 31-8220 в концентрации 10 нг/мл также приводила к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточ-

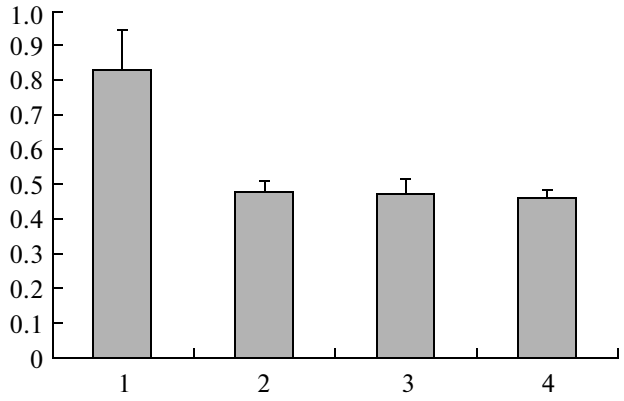


Рис. 2. Влияние пролактина и ГТФ на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ВСВ "–" ооцитов свиней. По горизонтали: 1 – контрольные клетки; 2 – активация пролактином в концентрации 50 нг/мл; 3 – 10 мкМ ГТФ; 4 – совместное действие пролактина и ГТФ. По оси ординат – интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед. Различия достоверны при: $P < 0.01$ (1 и 2; 1 и 3).

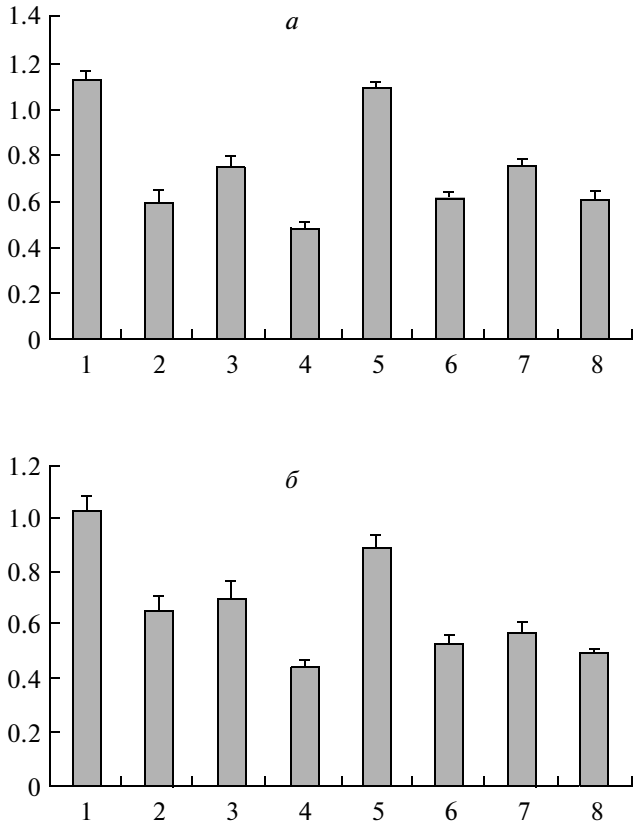


Рис. 3. Влияние ингибирования протеинкиназы А на стимулированное теофиллином и ГДФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней. По горизонтали: 1 – контрольные клетки; 2 – активация теофиллином в концентрации 10 мМ; 3 – 100 мкМ ГДФ; 4 – совместное действие теофиллина и ГДФ; 5 – действие 40 мкМ Н-89; 6 – действие Н-89 с последующей обработкой теофиллином; 7 – действие Н-89 с последующей обработкой ГДФ; 8 – 40 мкМ Н-89 и последующее совместное действие теофиллина и ГДФ. По оси ординат - интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед.; *а* – ВСВ "+" ооциты, *б* – ВСВ "–" ооциты. Различия достоверны при: *а* – $P < 0.001$ (1 и 2; 1 и 3; 3 и 4), $P < 0.05$ (2 и 4; 4 и 8); *б* – $P < 0.001$ (1 и 2; 1 и 3; 2 и 4; 3 и 4).

ных депо. Последующее добавление к обработанным ингибитором ооцитам пролактина или ГТФ не изменяло выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо по сравнению с необработанными ооцитами, однако, при совместном действии пролактина и ГТФ в обработанных ингибитором протеинкиназы С ооцитах не отмечали дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

Результаты экспериментов об эффектах пролактина и ГТФ на выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо ВСВ "–" ооцитов свиней представлены на рис. 2. Показано, что в таких ооцитах добавление пролактина или ГТФ стимулирует освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Однако, в отличие от ВСВ "+" ооцитов в ВСВ "–" ооцитах совместное действие пролактина и ГТФ не вызывает дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

Результаты влияния ингибирования протеинкиназы А на стимулированное теофиллином и ГДФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней показаны на рис. 3. В ВСВ "+" ооцитах использование теофиллина в концентрации 10 мМ или ГДФ в концентрации 100 мкМ вызывало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (рис. 3, *а*). Совместное действие теофиллина и ГДФ стимулировало в ооцитах дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Обработка клеток ингибитором протеинкиназы А соединением Н-89 в концентрации 40 мкМ не влияла на уровень содержания Ca^{2+} во внутриклеточных депо. Воздействие ингибитора протеинкиназы А также не оказывало влияние на стимулированное теофиллином или ГДФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, однако, при совместном действии теофиллина и ГДФ в таких ооцитах отсутствовало дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

В ВСВ "–" ооцитах, как и в ВСВ "+" ооцитах, стимулируется освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо как при действии отдельно теофиллина или ГДФ, так и при совместном действии теофиллина и ГДФ (рис. 3, *б*). Ингибирование протеинкиназы А в ВСВ "–" ооцитах не оказывало влияние на стимулированный теофиллином или ГДФ выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо, и, аналогично действию в ВСВ "+" ооцитах, обусловило отсутствие дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутрикле-

точных депо при совместном действии теофиллина и ГДФ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее рядом зарубежных исследователей было высказано предположение, что ГТФ образует связь между двумя внутриклеточными депо кальция – рианодин- и IP_3-чувствительными и обеспечивает переход Ca^{2+} из рианодин- в IP_3-чувствительные. При взаимодействии ГТФ и IP_3 в клетках происходит дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, которое является одним из показателей перехода кальция (Mullaney et al., 1987; Ghosh et al., 1989). В предыдущих исследованиях нами показано, что в ооцитах свиней при совместном действии пролактина и ГТФ отмечается дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Денисенко, Кузьмина, 2007). Пролактин и ГТФ в этих экспериментах освобождали Ca^{2+} из различных внутриклеточных депо – пролактин из IP_3-чувствительных, а ГТФ – из рианодинчувствительных внутриклеточных депо кальция.

С помощью красителя ВСВ ооциты свиньи были разделены на две группы – растущие и завершившие стадию роста, и в каждой из этих групп изучали освобождение Ca^{2+} из различных внутриклеточных депо. В результате проведенных экспериментов выявлены особенности в механизмах внутриклеточной сигнализации в зависимости от физиологического статуса ооцитов. Отмечали неоднозначный эффект при совместном действии пролактина и ГТФ в растущих и завершивших стадию роста ооцитах свиньи. В завершивших стадию роста ооцитах совместное действие пролактина и ГТФ стимулирует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, в котором участвует протеинкиназа С. В растущих ооцитах совместное действие пролактина и ГТФ не стимулирует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо и протеинкиназа С также не влияет на этот процесс.

На основании представленных в исследовании результатов и полученных ранее данных логично предположить, что в присутствии пролактина и ГТФ в ооцитах свиньи происходит переход Ca^{2+} из рианодин- в IP_3-чувствительные внутриклеточные депо, так как пролактин и ГТФ освобождают Ca^{2+} из различных внутриклеточных депо и при их взаимодействии происходит дополнительное освобождение Ca^{2+}, которое в данном случае может регулироваться протеинкиназой С.

Дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо также отмечается при совместном действии теофиллина и ГДФ, и это освобождение предположительно регулируется протеинкиназой А. Такой эффект используемых соединений отмечали как в растущих, так и в завершивших стадию роста клетках. Теофиллин и ГДФ также стимулируют освобождение Ca^{2+} из различных внутриклеточных депо: теофиллин – из рианодин-чувствительных внутриклеточных депо, а ГДФ – из IP_3-чувствительных, что было показано в наших ранних работах (Денисенко, Кузьмина, 2009а). Вероятно, и при совместном действии теофиллина и ГДФ, также происходит переход Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо, однако направление перехода Ca^{2+} противоположное – из IP_3-чувствительных в рианодин-чувствительные внутриклеточные депо.

Таким образом, если между различными внутриклеточными депо существует переход кальция в обоих направлениях, то можно предположить, что в растущих ооцитах свиньи переход Ca^{2+} между внутриклеточными депо происходит только в направлении из IP_3- в рианодинчувствительные внутриклеточные депо, а завершение стадии роста в ооцитах сопровождается дополнительным переходом Ca^{2+}, происходящим в обратном направлении.

Возникает вопрос: чем могут быть вызваны различия в направлении перемещения Ca^{2+} между внутриклеточными депо в растущих и завершивших стадию роста ооцитах свиньи?

Известно, что при использовании растущих ооцитов в клеточных репродуктивных технологиях, в результате их экстракорпорального созревания снижается число яйцеклеток, компетентных к оплодотворению и количество развившихся из них доимплантационных эмбрионов. В завершивших стадию роста ооцитах качество созревания и выход эмбрионов выше, чем при использовании растущих ооцитов (Ericsson et al., 1993). Реинициация мейоза в ооцитах в основном связана с освобождением Ca^{2+} из IP_3-чувствительных внутриклеточных депо, так как показано, что инъекция соединений, ингибирующих образование IP_3 или его связывание с рецепторами, вызывает нарушения в ядерно-цитоплазматическом созревании яйцеклетки, в то время, как добавление специфических ингибиторов рианодинчувствительных рецепторов не оказывает отрицательного действия на мейоз в ооцитах (Santella et al., 1999). Так как освобождение Ca^{2+} из IP_3-чувствительных депо происходит только в выросших ооцитах, становится понятным, почему выше количество и качество созревших ооцитов при использовании клеток, завершивших стадию роста. Возможно, идентифицированный переход Ca^{2+} из рианодин- в IP_3-чувствительные внутриклеточные депо связан с

необходимостью возрастания уровня содержания кальция для мейотического дозревания ооцитов, которое происходит только в завершивших стадию роста ооцитах.

Если IP_3-чувствительные депо кальция обеспечивают в клетках прохождение мейоза, то функционирование рианодин-чувствительных депо кальция, вероятно, связано с иными внутриклеточными процессами. Резонно предположить, что одним из таких процессов является ингибирование реинициации мейоза. На ооцитах свиней было показано, что тестостерон ингибирует их спонтанное созревание (Rice, McGaughey, 1981). Однако при совместном действии тестостерон и дбцАМФ проявляется более выраженный эффект ингибирования созревания ооцитов. Также, ранее было показано, что добавление тестостерона в среду инкубации стимулирует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при совместном действии пролактина и теофиллина. В присутствии тестостерона дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо способно стимулироваться протеинкиназой А (Денисенко, Кузьмина, 2009б), из чего можно было бы предположить, что активация протеинкиназы А в данном случае способствует переходу Ca^{2+} из IP_3- в рианодин-чувствительные внутриклеточные депо. В растущих ооцитах свиньи дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо также стимулируется протеинкиназой А, что, возможно, приводит к переходу Ca^{2+} из IP_3- в рианодин-чувствительное внутриклеточное депо.

Таким образом, отсутствие перехода Ca^{2+} из рианодин- в IP_3-чувствительные внутриклеточные депо, которое отмечается в растущих ооцитах, возможно, обусловливает ингибирование реинициации мейотического преобразования хроматина в не завершивших цитоплазматическое созревание ооцитах. В то же время, после завершения процессов роста сформировавшийся ооцит становится способным к реинициации мейоза, о чем свидетельствует появление возможности перехода Ca^{2+} из рианодин- в IP_3-чувствительные внутриклеточные депо. Полученные данные свидетельствуют о различных путях сигнальной трансдукции в ооцитах на завершающих этапах формирования из них зрелых яйцеклеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Влияние ингибирования рианодиновых и IP_3-чувствительных рецепторов, а также протеинкиназы С на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней при их активации пролактином и GTP // Цитология. 2007. Т. 49. № 8. С. 685–689.

Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Влияние теофиллина на внутриклеточный кальций в ооцитах свиней // Сб. науч. трудов ВНИИГРЖ. С.-Петербург. 2009а. С. 103–106.

Кузьмина Т.И., Денисенко В.Ю. Участие тестостерона в обмене внутриклеточного Ca^{2+} в клетках гранулезы свиней // Белоруссия. 2009б. С. 97–99.

Alm H., Torner H., Lohrke B. et al. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining bevore IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity // Theriogen. 2005. V. 63. P. 2194–2205.

Berridge M.J., Irvine R.F. Inositol phosphates and cell signaling // Nature. 1989. V. 341. P. 197–205.

Berridge M.J. Calcium signal transduction and cellular control mechanisms // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1742. P. 3–7.

Ericsson S.A., Boice M.L., Funahashi H. et al. Assessment of porcine oocytes using brillant cresyl blue // Theriogen. 1993. V. 39. P. 214 [abstract].

Ghosh T.K., Mullaney J.M., Tarazy F.I. et al. GTP-activated communication between distinct inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and -insensitive calcium pools // Nature. 1989. V. 340. P. 236–239.

Machaty Z., Funahashi H., Day B.N. et al. Developmental changes in the intracellular Ca^{2+} release mechanisms in porcine oocytes // Biol. Reprod. 1997. V. 56. P. 921–930.

Mullaney J.M., Chueh S.H., Ghosh T.K. et al. Intracellular calcium uptake activated by GTP. Evidence for a possible guanine nucleotide-induced transmembrane conveyance of intracellular calcium // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 13865–13872.

Rice C., McGaughey R.W. Effect of testosterone and dibutyryl cAMP on the spontaneous maturation of pig oocytes // Reprod. Fertil. 1981. V. 62. P. 245–256.

Roca J., Martinez E., Vazquez J.M. et al. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brillant cresyl blue test // Repr. Fertil. Devel. 1998. V. 10. P. 479–486.

Santella I., De Riso I., Gragnaniello G. et al. Cortical granule translocation during maturation of starfish oocytes requires cytoskeletal rearrangement triggered by $InsP_3$-mediated Ca^{2+} release // Exp. Cell Res. 1999. V. 248. P. 567–574.

Yue C., White K.I., Reed W.A. et al. The existence of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes // Devel. 1995. V. 121. P. 2645–2654.

Wassarman M. The mammalian ovum. In: Knobil E., Neil D., eds. The physiology of reproduction, vol. 1. New York, USA: Ravan Press, 1988. P. 69–102.

Ca^{2+} Release from Intracellular Stores of Pig Oocytes at Different Stages of Growth

V. Yu. Denisenko and T. I. Kuz'mina

All-Russia Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moskovskoe sh. 55a, Pushkin, St. Petersburg, 196600 Russia

e-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Abstract—Ca^{2+} release from intracellular stores of pig oocytes was investigated using the Ca^{2+}-sensitive fluorescent dye chlorotetracycline. Oocytes were divided into growing ones and those that completed their growth using brilliant cresyl clue (BCB) staining. The stained oocytes (BCB "+") were determined as the ones that completed their growth, while the stainless ones (BCB "–") were determined as those in the final stages of growth. In the BCB "+" and BCB "–" oocytes, prolactin, theophylline, GTP, and GDP cause Ca^{2+} to exit intracellular stores. In the oocytes that completed their growth, joint action of prolactin and GTP activates additional release of Ca^{2+}, in which protein kinase C takes part. In growing oocytes, joint action of prolactin and GTP does not lead to additional release of Ca^{2+}. Joint action of theophylline and GDP in growing oocytes and oocytes that completed the growth stage promotes additional Ca^{2+} exit from intracellular stores. This exit is regulated by protein kinase A. The obtained data show that there various routes of Ca^{2+} release from intracellular stores in growing and grown pig oocytes.

Keywords: calcium, pig oocytes, BCB

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 1, с. 57–61

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 611.018.1+612.64

СИНЦИТИАЛЬНЫЕ ПЕРФОРАЦИИ НЕЙРОНАЛЬНЫХ МЕМБРАН ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА[1]

© 2011 г. О. С. Сотников, С. А. Новаковская*, И. А. Соловьева

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6
e-mail: Sotnikov@kolt.infran.ru
**Институт физиологии НАН Беларуси,*
220072 Минск, ул. Академическая, д. 28
e-mail: biblio@fizio.bas-net.by

Поступила в редакцию 02.02.10 г.
Окончательный вариант получен 30.04.10 г.

Проведено электронно-микроскопическое исследование закладки коры большого мозга эмбриона человека, с целью выявления наличия синцитиальных межнейронных связей в эмбриогенезе. Обнаружено, что у части нейронов отсутствует глиальная оболочка, и их наружные клеточные мембраны прилегают непосредственно друг к другу, образуя продолговатые или точечные плотные контакты. Иногда эти контакты перфорированы и на их основе формируются истинные синцитиальные межнейронные связи. Закономерные структурные свойства этих связей следующие: формирование на базе плотных мембранных контактов, обязательное закругление краев перфорации и наличие остаточных телец в виде сферических везикул в просвете перфораций. Полученные результаты позволяют заключить, что в закладке коры большого мозга у зародышей, получаемых при операции прерывания беременности, помимо формирования синаптических контактов или до их образования возможно появление синцитиальных межнейронных связей. Это следует учитывать при трансплантации развивающегося мозга.

Ключевые слова: биологические мембраны, синцитиальные поры спаренных мембран.

В литературе имеются сведения о существенных изменениях нейрональных мембран при различных патологических процессах и в онтогенезе. Так обнаружены в постгипоксическом периоде синцитиальные связи между спаренными нейронами коры мозга (Боголепов и др., 1980). В 1994 г. приведены данные о появлении синцитиальных связей между нейронами мозжечка под влиянием больших доз L-глутамата (Ларионова и др., 1994). Стали известны факты образования межнейронного синцития после механической травмы мозга (Сотников, Парамонова, 2010) и при валлеровской дегенерации (Сотников и др., 2009а). Описано появление многоядерных слившихся клеток мозга при многих видах патологии (Marotte et al., 2007; Mizuguchi, 2007). Открыта возможность синцитиального слияния нервных клеток с глиоцитами при вирусной патологии (Ackman et al., 2006) и электростимуляции (Самосудова и др., 2007). Синцитиальные поры и мембранные перфорации описаны также у многих животных в норме (Santander et al., 1988; Сотников, 2008; Сотников и др., 2009б; Арчакова и др., 2009). При анализе литературы создается впечатление, что синцитиальные перфорации чаще возникают между нейронами на ранних этапах онтогенеза, когда они еще не полностью покрыты глией и чаще контактируют друг с другом (Chen K. et al., 2006; Сотников, и др., 2007; Сотников, 2008). Учитывая изложенное, с целью выявления межнейронных связей нами исследовано состояние мембран у эмбрионов человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В исследовании использована корковая пластинка 8-недельных эмбрионов. Кусочки мозга 1–3 мм^3 после операции прерывания беременности помещались в культуральную среду 199 на 3–4 часа. Далее для электронной микроскопии мозг фиксировали в течение 1 часа погружением в раствор, состоящем из 2.5%-ного глутаральдегида в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2–7.4). После промывки в фосфатном буфере проводили дополнительную фиксацию в

[1] Работа выполнена при финансовой поддержке грантов № 09-01-00473 и № 10-04-90000-Бел_а.

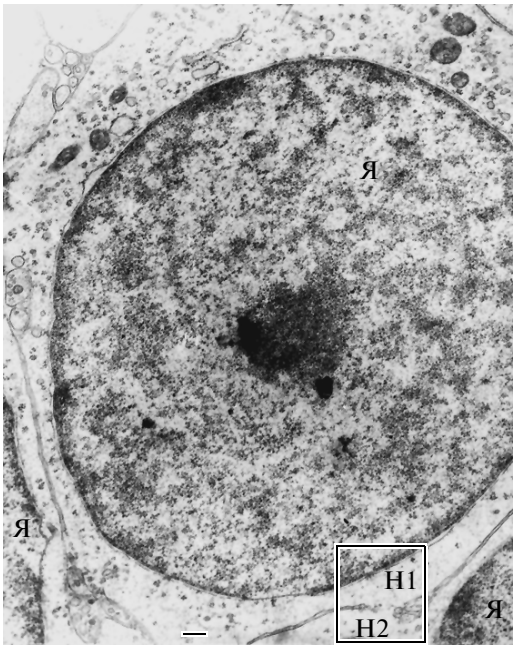


Рис. 1. Плотное прилегание мембран смежных нейронов закладки коры большого мозга эмбриона человека 8 недель при отсутствии глии.

$Н_{1–2}$ – тела нейронов, в рамке – синцитиальная межнейронная перфорация (при большем увеличении см. рис. 2, *б*); полоска – 0.1 мкм.

1%-ном OsO_4 в какодилатном буфере (pH 7.4; 1 час). Проводили через спирты возрастающей концентрации для обезвоживания объекта. Срезы докрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Ткань заключали в эпон. Ультратонкие срезы получали на ультратоме ЛКБ-3 (Швеция) и исследовали под микроскопом Хитачи (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нейроны на срезах имеют узкий слой цитоплазмы вокруг ядра, обедненный органеллами. Вокруг нейронов в ряде случаев имеются расширенные межклеточные промежутки, части тел нейронов и их отростков в отсутствии глиальной оболочки контактируют своими наружными клеточными мембранами непосредственно (рис. 1). Именно в этих участках удается обнаружить малозаметные своеобразные изменения, которые, однако, по нашему мнению, должны существенно влиять на электрические свойства нейронов. В некоторых местах спаренные мембраны двух смежных нейронов оказываются перфорированными. Это не случайные, бесформенные артефициальные дефекты мембран, которые нередко видны на электронных микрофотографиях, а морфологически четко организованные перфорации спаренных мембран. На одиночных мембранах они не встречаются. Прежде всего, обнаруживаются довольно длинные участки смежных мембран, которые, контактируя, сливаются и образуют структуру, напоминающую плотный контакт (tight junction). Здесь же могут формироваться ожерельеподобные, варикозные структуры, стенки которых образованы слившимися смежными мембранами, а полость представляет собой остаток межклеточной щели. Фактически бусинки отделены очень короткими “точечными” плотными контактами (рис. 2, *а*). В области tight junctions возникают перфорации, которые как показано (Чизмаджев, Пастушенко, 1989), являются термодинамически крайне неустойчивыми образованиями. В том случае, когда перфорируется относительно длинный контакт, по краям перфораций остаются тонкие концы прерванных контактов (рис. 2, *в*). Одним из существенных признаков межмембранных (межклеточных) перфораций является отщепление одного или двух варикозных бусинок, которые становятся остаточными везикулярными тельцами внутри перфораций (рис. 2, *в*, *г*). Формирование таких остаточных телец представлено на рис. 2, *б*, *д*. В ряде случаев краевые остатки плотных контактов выявляются плохо. В этом случае морфологическим признаком естественно возникших перфораций служат четко закругленные края слившихся смежных мембран (рис. 3 *а*, *б*). Иногда остаточные тельца прослеживаются внутри перфорации между нейритами как лизирующиеся едва заметные овальные структуры (рис. 3, *в*). Варианты встречающихся изменений спаренных мембран обобщены схематически (рис. 4). Они могут быть представлены как стадии одного и того же процесса синцитиальных перфораций мембран эмбриона.

ОБСУЖДЕНИЕ

Причины возникновения перфораций спаренных мембран эмбрионов назвать невозможно. Это могут быть оперативные процедуры по прерыванию беременности. Однако известно, что такие же синцитиальные перфорации отмечены и в нормальной нервной системе новорожденных котят и двухмесячных поросят (Сотников и др., 2007; Сотников, 2008). Синцитиальные межнейронные перфорации выявлены у 19–21-дневных эмбрионов нормальных крыс (Peters, Feldman, 1973). Естественный процесс образования синцитиальных пор на основе плотных контактов с последующим слиянием клеток хорошо описан при онтогенетическом формировании мышечных волокон из отдельных миогенных клеток. Большинство авторов, изучавших эмбриогенез скелетных мышц, рассматривает формирование плотных контактов, как начальную фазу их синцитиального слияния (Sheridan, 1966; Pash et al., 1974).

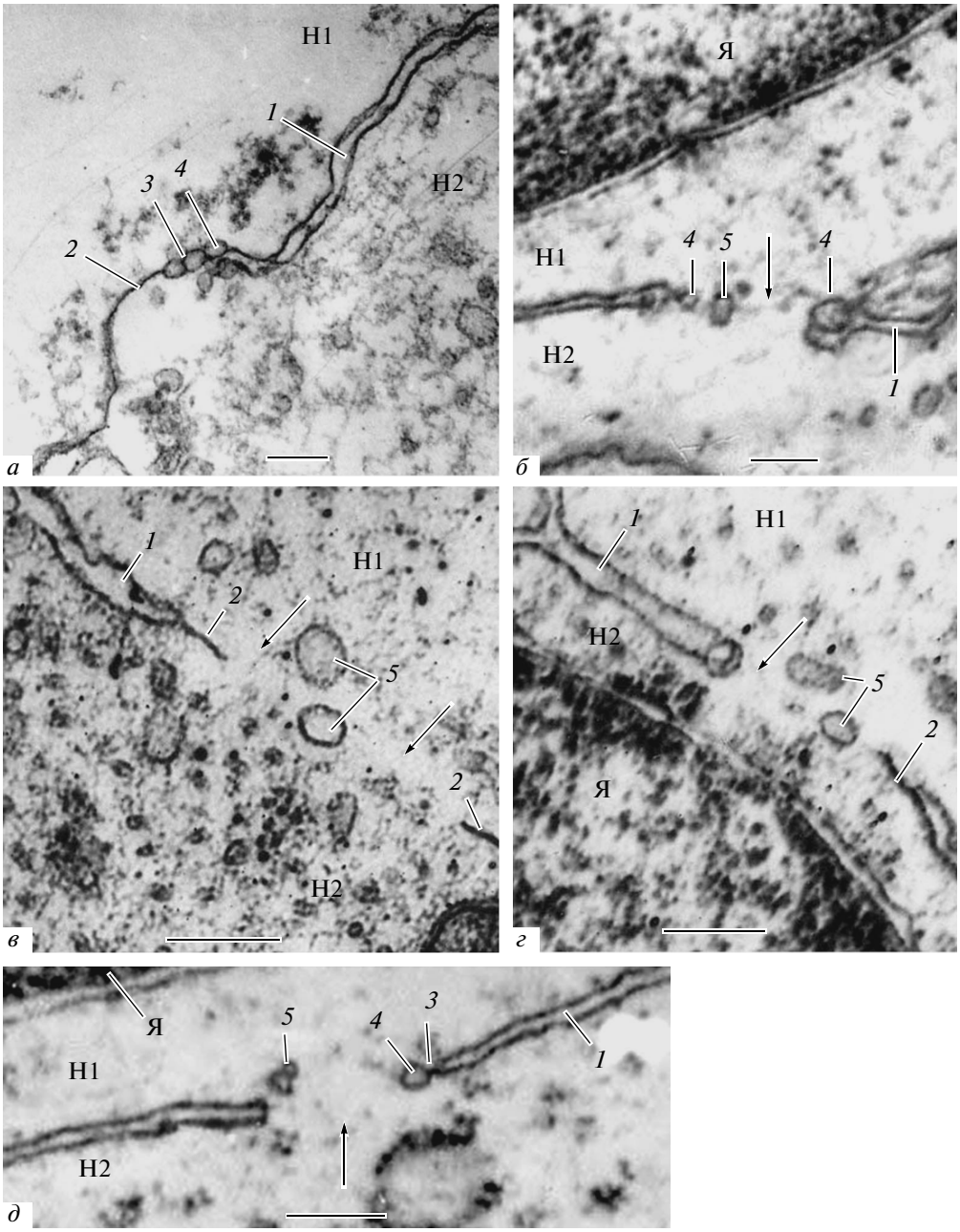


Рис. 2. Формирование бусинковидных структур и синцитиальных перфораций контактирующих мембран смежных нейронов.

а – протяженный плотный мембранный контакт и бусинковидные варикозные деформации межнейронной щели; *б* – формирование остаточных телец из "бусинок" межклеточной щели (фрагмент рис. 1 в рамке); *в* – смещенные остаточные тельца внутри перфорации, края которой образованы остатками плотных контактов; *г* – сферическое и овальное плотные тельца внутри синцитиальной перфорации; *д* – формирование "бусинки" у точечного плотного контакта и отщепление остаточного тельца на краю перфорации; *1* – межклеточная щель; *2* – остатки плотного контакта; *3* – точечный плотный контакт; *4* – бусинковидная деформация межклеточной щели; *5* – остаточные тельца; $Н_{1-2}$ – тела смежных нейронов; Я – ядра нейронов; стрелки – синцитиальные межнейронные перфорации; стрелка – синцитиальная перфорация; полоска – 0.1 мкм.

Формирование сфероидных остаточных телец и закругление краев перфораций также следует представлять как термодинамически выгодное природное свойство липидных мембран (Козлов, Маркин, 1989; Молотковский, 2009).

Не исключено также, что сформировавшие синцитиальные перфорации клетки в дальнейшем могут вступать в апоптоз. Однако то, что синцитиальные связи встречаются и у взрослых нормальных животных свидетельствует целый ряд данных

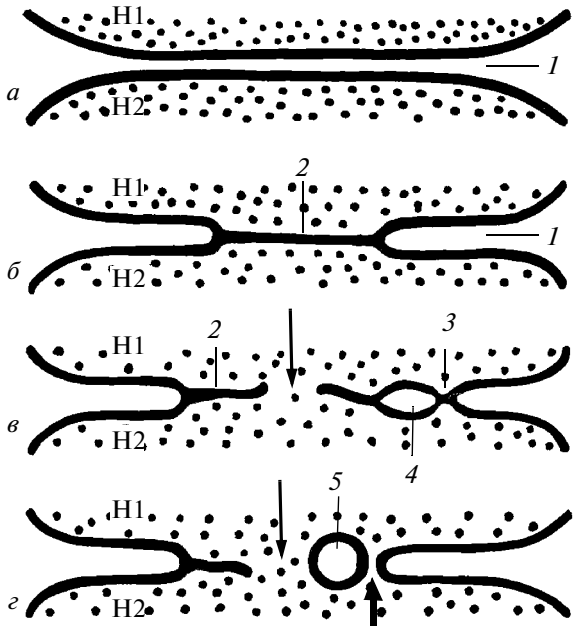


Рис. 3. Закругление краев слившихся мембран смежных нейронов.

а – крупная перфорация между нейритами; *б* – крупная перфорация между телами прилежащих нейронов; в – следы овальных остаточных телец внутри синцитиальной перфорации; *1* – межклеточная щель; *2* – булавовидные закругленные края крупных перфораций; *3* – следы овальных остаточных телец; $Н_{1–2}$ – два различных нейрита (*а*) или тела нейронов (*б*), полоска – 0.1 мкм.

(Santander et al., 1988; Сотников, 2008). Синцитиальные связи у взрослых животных обладают такой же строгой структурной организацией. Перфорации всегда появляются на основе плотных контактов, края перфораций имеют овальную форму, а внутри перфораций присутствуют одно или несколько овальных везикулярных остаточных телец (Сотников, Парамонова, 2010). Во всяком случае, полученные данные могут свидетельствовать о том, что у эмбрионов *in situ* и при пересадке эмбриональных эксплантатов помимо химических синапсов и электрических мембранных контактов следует иметь в виду возможность и синцитиальных связей, что может существенно менять функцию формирующихся нервных сетей.

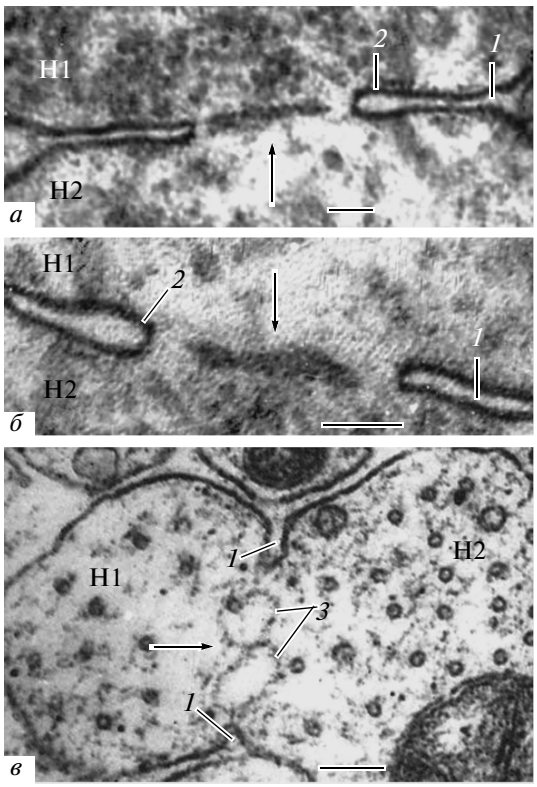


Рис. 4. Предполагаемый процесс формирования синцитиальных межнейронных перфораций (схематическое изображение).

а – нормальная межклеточная щель; *б* – образование плотного межнейронного мембранного контакта; *в* – формирование варикозной жемчужины, точечного плотного контакта и синцитиальной перфорации продленного контакта; *г* – образование расширенной синцитиальной перфорации, появление поры и отщепление “жемчужины” в области точечного контакта; *1* – межклеточные щели; *2* – продленные плотные контакты; *3* – точечный плотный контакт; *4* – бусинкоподобная деформация межклеточной щели; *5* – остаточное тельце; $Н_{1–2}$ – смежные нейроны; стрелки – синцитиальные поры и расширенные перфорации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Арчакова Л.И., Сотников О.С., Новаковская С.А. и др. Синцитиальные цитоплазматические анастомозы между нейритами клеток каудального брыжеечного ганглия взрослых кошек // Морфология. 2009. Т. 135. № 2. С. 23–26.

Боголепов Н.Н., Павловская Н.И., Яковлева Н.И. Ультраструктура контактов парных нейронов в постгипоксическом периоде // Арх. анат. 1980. Т. 79. № 9. С. 15–24.

Козлов М.М., Маркин В.С. Устойчивость сферической формы везикул // Биол. мембр. 1989. Т. 6. № 8. С. 869–882.

Ларионова Н.П., Самосудова Н.В., Чайлахян Л.М. Патологическое слияние зернистых клеток мозжечка лягушки под влиянием L-глутамата *in vitro* // ДАН СССР. 1994. Т. 336. № 3. С. 406–409.

Молотковский Р.Ю., Акимов С.А. Расчет линейного натяжения в различных моделях кромки поры в липидном бислое // Биол. мембр. 2009. Т. 26. № 2. С. 149–158.

Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Нейроно-глиальные контакты, образующиеся в мозжечке при электрической стимуляции в присутствии NO-генерирующего соединения // Морфология. 2007. Т. 131. № 2. С. 53–58.

Самосудова Н.В., Шунгская В.Е., Ларин Ю.С. Межклеточные взаимодействия, предшествующие слиянию мышечных клеток // Цитология. 1985. Т. 27. № 12. С. 1404–1407.

Сотников О.С. Статика и структурная кинетика живых асинаптических дендритов. СПб: Наука, 2008. 397 с.

Сотников О.С., Арчакова Л.И., Новаковская С.А. и др. Проблема синцитиальной связи нейронов при патологии // Бюлл. экспер. биол. и мед. 2009а. Т. 147. № 2. С. 207–210.

Сотников О.С., Камардин Н.Н., Рыбакова Г.И. и др. Цитоплазматическая синцитиальная межнейронная связь у моллюсков // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2009б. Т. 45. № 2. С 223–232.

Сотников О.С., Малашко В.В., Рыбакова Г.И. Синцитиальная связь нейронов в культуре ткани в раннем онтогенезе // Морфология. 2007. Т. 131. № 2. С. 7–15.

Сотников О.С., Парамонова Н.М. Цитоплазматическая синцитиальная связь – одна из трех форм международной связи // Успехи физиол. наук. 2010. Т. 41. № 1. С. 45–57.

Чизмаджев Ю.А., Пастушенко В.Ф. Электрическая стабильность биологических и модельных мембран // Биол. мембр. 1989. Т. 6. № 10. С. 1013–1045.

Ackman J.B., Siddiqui F., Walikonis R.S. et al. Musion of microglia with pyramidal neurons after retroviral infection // J. Neurosci. 2006. V. 26. № 44. P. 11413–11422.

Chen K.A., Laywell E.D., Marshall G. et al. Fusion of neural stem cells in culture // Exp. Neurol. 2006. V. 198. № 1. P. 129–135.

Marotti J.D., Savitz S.I., Kim W.K. et al. Cerebral amyloid angiitis processing to generalized angiitis and leucoencephalitis // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2007. V. 33. № 4. P. 475–479.

Mizuguchi M. Light microscopic analysis of cellular networks in the pineal gland of the golden hamster as revealed by methylene blue labeling // Congenit. Anom. 2007. V. 47. № 1. P. 2–8.

Pash D.E., Staehelin A. Freese cleave demonstration of gap junctions between skeletal myogenic cells *in vivo* // Develop. Biol 1974. V. 36. P. 455–461.

Peters A., Feldman M. The cortical plate and molecular layr of the late rat fetus // Z. Anat. Entuicklungsgesch. 1973. V. 141. № 1. P. 3–37.

Santander R.S., Cuadrado G.M., Sáez M.R. Exceptions to Cajal's neuron theory: communicating synapses // Acta Anat. 1988. V. 132. P. 74–76.

Sheridan J.D. Electrophysiological study of special connections between cells in the early chick embryo // J. Cell Biol. 1966. V. 31. P. 1–5.

Syncytial Perforations of Human Embryo Membranes

O. S. Sotnikov[a], S. A. Novakovskaya[b], and I. A. Solovieva[a]

[a] *Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia*
e-mail: Sotnikov@kolt.infran.ru

[b] *Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Akademicheskaya ul. 28, Minsk, 220072 Belarus*
e-mail: biblio@fizio.bas-net.by

Abstract—An electron microscopy study of the anlage of cerebral cortex of human embryo has been carried with the aim of determining the presence of syncytial interneuronal connections in embryogenesis. It has been determined that, in part of the neurons, the glial embryo is absent and their external cell membranes are directly attached to each other by forming elongated or dotted tight junctions. Sometimes these junctions are perforated and, on their basis, the true syncytial interneuronal connections are formed. Natural structural properties of these connections are the following: formation of the base of tight membrane contacts, obligatory rounding of perforation edges, and the presence of residual particles in the form of spherical vesicles in the lumen of perforations. Results obtained allowed us to conclude that, in the anlage of cerebral cortex of embryos obtained during surgical abortion of pregnancy, apart from the formation of synaptic contacts, or until their formation, there is the possibility of syncytial interneuronal connections appearing. This should be considered during the transplantation of the developing brain.

Keywords: biological membrane, syncytial pores of paired membranes

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 1, с. 62–66

ХРОНИКА

УДК 576.312.6

ПОГОНЯ ЗА КЛЕТОЧНЫМ БЕССМЕРТИЕМ, ТЕЛОМЕРЫ, ТЕЛОМЕРАЗА И МЕРА ЗДОРОВЬЯ

(размышления в связи с присуждением Алексею Матвеевичу Оловникову Демидовской премии в области биологии за 2009 год)

© 2011 г. Е. Е. Егоров, А. В. Зеленин

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, ул. Вавилова, д. 32

E-mail: azel@eimb.ru

Поступила в редакцию 15.07.10 г.

Присуждение А.М.Оловникову Демидовской премии – важное событие для отечественной биологической науки в целом и для журнала "Онтогенез", в частности.

Значение этого события для российской науки обусловлено широким признанием работы А.М. Оловникова мировым научным сообществом, значение для нашего журнала – тем, что он – многолетний член его Редакционной коллегии, своей активной работой способствующий успехам журнала.

Незаурядность разбираемого события связана также с тем, что оно в некоторой степени явилось "российским ответом" на присуждение Нобелевской премии группе американских ученых за достижения в исследовании теломер и теломеразы.

Это решение Нобелевского комитета широко обсуждалось в России в научных и совсем ненаучных кругах. Многие ученые высказывали недоумение по поводу того, что Оловников не оказался в числе лауреатов этой сверхпрестижной премии. В ненаучных или околонаучных кругах по этому поводу шутили, причем не всегда доброжелательно.

Вряд ли имеет смысл обсуждать мотивы и обоснованность решений Нобелевского комитета, хотя к этому вопросу мы еще вернемся. Следует рассмотреть суть работы Оловникова.

Согласно решению Демидовского комитета, премия Оловникову присуждена за цикл теоретических работ, в которых впервые в мире было предсказано укорочение хромосом при старении, описан эффект концевой недорепликации линейных молекул ДНК и, кроме того, предсказано существование теломеразы как фермента, компенсирующего укорочение теломер (концевых участков хромосом).

Если бросить ретроспективный взгляд на проведение этих исследований то, безусловно, можно выделить двух человек, вклад которых явно недооценен мировым научным сообществом. Это Леонард Хейфлик и Алексей Оловников.

Работа Хейфлика 1961 года (Hayflick, Moorhead, 1961) до сих пор одна из самых цитируемых в биологии. Она не только выявила до того неизвестный факт, но пробудила творческую энергию многих ученых в попытках объяснения, того, каким образом клетки подсчитывают свои деления. Хэйфлик, в результате многолетней работы, показал, что клетки человека делятся в культуре лишь ограниченное число раз, после чего сначала перестают делиться, а потом погибают. Хейфлику с большим трудом удалось опубликовать свои результаты. Рассказывая об истории своего открытия на совещании, посвященном теломерам и теломеразе ("Telomeres and telomerase: implications for cell immortality, cancer and related diseases", Redwood City, CA, June 1–3, 1998) в Редвуд Сити в июне 1998 года Хейфлик упомянул о том, что когда его статья попала на рецензию к будущему Нобелевскому лауреату Пейтону Раусу (открывателю саркомы Рауса), тот отверг ее. В общественном мнении того времени господствовало убеждение, что в руках умелого исследователя клетки бессмертны, т.е. число их делений не ограничено. Оно было основано на непререкаемом авторитете Нобелевского лауреата Алексиса Карреля, который в начале двадцатого века убедил широкие массы исследователей в том, что клетки можно перевивать десятилетиями (Carrel, 1912).

Статья Хэйфлика получила большой общественный резонанс. Возникло и вошло в словари понятие "предел Хейфлика". Основную роль в процессе "заинтересовывания" широких масс сыграла не сама статья, а ее бесчисленные комментарии, упростившие предел числа репликативных событий до пресловутых 50-ти делений, будто бы свойственных клеткам человека, хотя непосредственно в статье были приведены многочисленные данные о количестве удвоений популяции клеток человека варьирующие от 30 до 70. Возникли теории старения, связанные с ограниченной способностью клеток делиться (Comfort, 1964). Было показано, что коли-

чество делений клеток в культуре обратно коррелирует с возрастом донора клеток; клетки короткоживущих видов делятся в культуре меньшее число раз, чем долгоживущих и т.п.

После появления работ Хейфлика все клеточные культуры оказалось возможным разделить на две группы: с ограниченным пролиферативным потенциалом (смертные или мортальные) и бессмертные (иммортальные). К первой группе можно отнести клетки первичных культур человека, в вторую группу в основном составляют клетки перевиваемых опухолей. Однако оставался открытым вопрос, насколько такая классификация зависит от условий культивирования. Всегда можно было предположить, что какое-либо новое усовершенствование техники культивирования снимет ограничения пролиферативного потенциала, и клетки мортальные станут иммортальными. Для окончательного подтверждения этой классификации требовался фактический материал, объясняющий механизмы ограничения пролиферативного потенциала.

Помимо установления факта ограничения пролиферативного потенциала, опыты Хейфлика показали, что в ряде клеток (например, взятых из организма человека) существует некий счетчик, определяющий общее количество делений, отпущенных данной клетке. Однако природа этого счетчика оставалась непонятной.

Чрезвычайно важным этапом в процессе изучения закономерностей размножения клеток стала работа Оловникова, в кратком виде опубликованная на русском языке в 1971 года в Докладах Академии наук СССР (Оловников, 1971), а двумя годами позже в развернутом виде на английском языке в международном журнале теоретической биологии (Olovnikov, 1973), которую можно расценить как попытку молекулярного объяснения эффекта Хэйфлика. Оловников предложил принцип работы счетчика делений. Его поистине провидческая гипотеза основывалась на том обстоятельстве, что при матричном синтезе любого линейного полинуклеотида (в частности хромосомы) каждая возникшая копия должна быть короче предыдущей, и что с этим связано ограничение количества клеточных делений, возможность которых исчерпывается тогда, когда достигается критическое укорочение молекулы ДНК. Почти одновременно с Оловниковым на феномен концевой недореплекации ДНК при ее удвоении обратил внимание Джеймс Уотсон (Watson, 1972), однако он не связал это явление с регуляцией пролиферации клеток. Вторым выдающимся предвидением Оловникова было предсказание существования специального фермента, удлиняющего концы хромосом в “бессмертных” (неограниченно пролиферирующих) клетках.

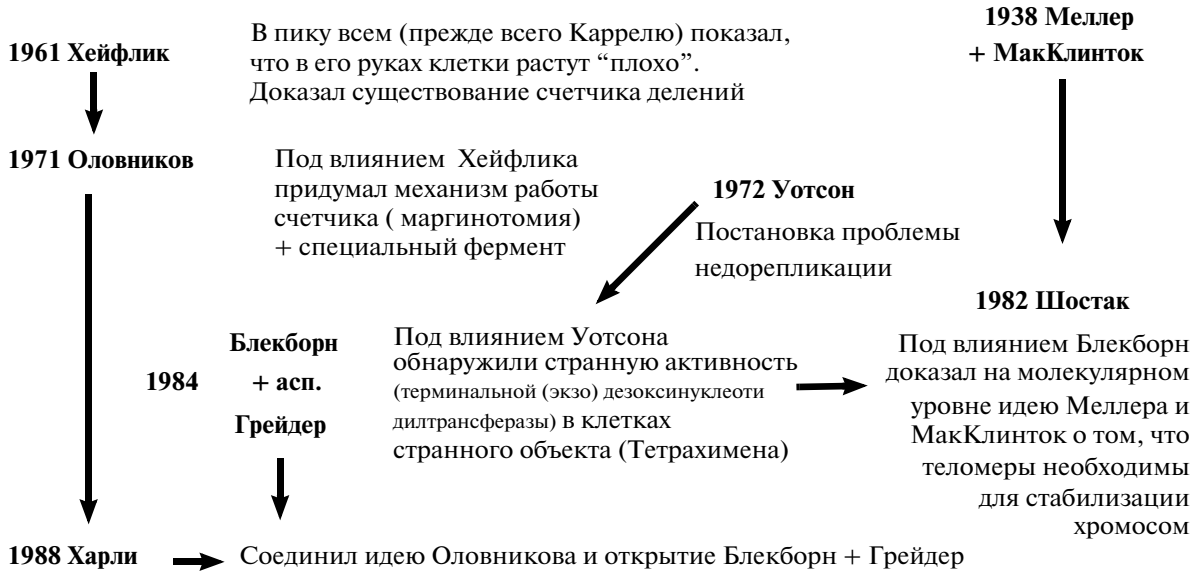
Исследования Блекборн, Грейдер и Шостака, которые удостоились Нобелевской премии, поначалу были разнонаправленными и объясняли различные феномены. Блекборн, изучая нуклеотидные последовательности на концах хромосом (в теломерах), предполагала, что эти странные теломерные последовательности, возможно, имеют какой-то особый механизм репликации, который и был открыт (при участии ее аспирантки Грейдер) в 1984 г. (Greider, Blackburn, 1985). Независимо от это Блекборн и Шостак нашли молекулярные подтверждения идей Меллера и МакКлинток 1938 г. (McClintock, 1938; Muller, 1938) о необходимости теломер для стабилизации хромосом (Szostak, Blackburn, 1982).

Но только в 1988 г., когда идея Оловникова соединилась с находками Блекборн-Грейдер, начался стремительный рывок в этом направлении науки. Сами Нобелевские лауреаты Блекборн и Грейдер так описывают эти события: “Мы не знали об идеях Оловникова до 1988 года, когда Кальвин Харли рассказал о них Грейдер. Заинтригованные, Грейдер, Харли и их коллеги решили выяснить, не происходит ли со временем укорочение хромосом в клетках человека” (“We were unaware of Olovnikov’s ideas until 1988, when Calvin B. Harley, then at McMaster University, brought them to Greider’s attention. Intrigued, Greider, Harley and their collaborators decided to see if chromosomes do get shorter in human cells over time”) (Greider, Blackburn, 1996).

Схематически хронология этих событий представлена на схеме (рис. 1).

Уже в следующем 1989 году теломераза была обнаружена в клетках человека (Morin, 1989) и было обнаружено изменение длины теломер человека в процессе развития (Cross et al., 1989). Через год было выявлено укорочение теломер при старении клеток (Harley et al., 1990) и в США, прежде всего, для изучения теломеразы, была создана корпорация Герон (Geron), объединившая многих первоклассных ученых. В 1994 г. в корпорации был разработан чувствительный метод для детекции теломеразной активности (Kim et al., 1994) и, наконец, в 1998 г. было доказано, что индуцированная путем введения гена экспрессия теломеразы ведет к иммортализации клеток (Bodnar et al., 1998; Vaziri, Benchimol, 1998).

Необходимо отметить, что соматические клетки человека, в подавляющем большинстве лишены теломеразной активности. В результате генно-инженерного внедрения активного фермента теломеры клеток начинают удлиняться, и клетки обретают способность делиться в культуре неопределенно долго, многократно превосходя предел Хейфлика. Такие клетки получили название теломеризованных. Они имеют большой потенциал применения в



началась большая гонка за бессмертием, завершившаяся присуждением Нобелевской премии

Взаимосвязь открытий в области теломер и теломеразы.

биотехнологии и медицине, поскольку, несмотря на снятие ограничений на пролиферацию, сама регуляция клеточных делений в них не изменяется. Однако, на использование таких клеток накладывает ограничение тот факт, что активация теломеразы является одним из этапов канцерогенеза, и поэтому требуются дальнейшие исследования для определения возможных рисков с этим связанных (Егоров, 1997).

Возвращаясь к Оловникову, можно утверждать, что его выдающееся предвидение 1971 г., не осталось на страницах никому не интересных журналов, а наоборот: идея непосредственно участвовала во всемирном научном процессе (рисунок), давшем прекрасный результат, удостоенный Нобелевской премии. И этот факт навсегда останется в истории науки.

Помимо всем известной работы Оловникова 1971 г., имеется и другая, весьма важная работа, значение которой начинает осознаваться только сейчас (Оловников, 1992).

В этой работе предсказано (опять!), что помимо феномена концевой недорепликации имеется еще и концевая недорепарация, которая точно так же способна укорачивать теломеры, но при этом может быть не связана с делением клетки. По прошествии нескольких лет факт недорепарации был экспериментально показан в работах фон Жглиницкого (von Zglinicki et al., 1995; Petersen et al., 1998). В работе 2000 г. фон Жглиницкий утверждает, что накопление разрывов ДНК является главной (!) причиной укорачивания теломер.

Если посмотреть на проблему с высоты сегодняшнего дня, то можно утверждать, что недорепарация теломер действительно играет более важную роль, чем их недорепликация. Если недорепликация теломер вызывает так называемое репликативное старение и касается только делящихся клеток, то недорепарация "преследует" все клетки в организме на протяжении всей жизни человека. И именно недорепарация лежит в основе связи длины теломер с разнообразными патологиями и позволяет рассматривать длину теломер как универсальную меру здоровья.

Ряд наблюдений демонстрирует наличие такой зависимости.

В зонах атеросклеротических повреждений клетки эндотелия аорты имеют укороченные теломеры (Okuda et al., 2000). Также при болезнях коронарных сосудов теломеры эндотелиальных клеток становятся существенно короче (Ogami et al., 2004). Ряд случаев диабета 2-го типа объясняют старением и недостаточностью пролиферации бета-клеток (Yoon et al., 2003). Поседение волос объясняют старением меланобластов (Nishimura et al., 2005), помутнение хрусталика – старением эпителиальных клеток хрусталика (Babizhayev, Yegorov, 2010). Возрастные нарушения иммунной системы объясняют старением стволовых гематопоэтических клеток и т.д. В список таких теломер-связанных патологий при желании

можно включить фактически все болезни, связанные с возрастом.

Практически все патологии, так или иначе, связаны с развитием окислительного стресса и воспалительных реакций. Окислительный стресс может иметь локальный характер, но он способен распространяться практически по всему организму. Результатом может оказаться чрезмерное укорачивание теломер, которое на каком-то этапе становится не только следствием патологии, но и ее движущей силой, препятствующей клеточному размножению, а значит регенерации (Егоров, 2009). Известно, что теломеры клеток периферической крови укорачиваются с возрастом. Но также известно, что они преждевременно укорачиваются у пациентов с инфарктом миокарда, с развитым атеросклерозом, с болезнью Алцгеймера, с васкулярной деменцией, при развитии солидных опухолей, при действии эмоционального стресса (von Zglinicki, Martin-Ruiz, 2005), при курении (Babizhayev et al., 2010), при избыточном весе (Valdes et al., 2005). Длина теломер в клетках периферической крови имеет четкую корреляцию с прогнозом восстановления после инсульта (Martin-Ruiz et al., 2006).

В определенных рамках можно утверждать, что длина теломер может служить мерой здоровья человека. Соответственно, изменения длины теломер могут отражать эффективность предложенной терапии. А первым о недорепарации теломер заявил Оловников!

И, наконец, сравнительно недавно Алексей Матвеевич опубликовал свою новую, редусомную теорию старения (Оловников, 2003). На одной научной конференции, после прослушивания доклада Оловникова известный американский ученый (Dr. Michael West) сказал: “Ну что же, проживем еще 30 лет и узнаем правду”.

Обсуждать мотивы Нобелевского комитета, избравшего именно экспериментальные работы по теломерам и теломеразе объектом своего благосклонного внимания просто бессмысленно, тем более, что обоснованность и объективность решений этого сонма научных светил широко обсуждаются в печати почти ежегодно. Но из сказанного, очевидно, что Демидовскую премию Оловников действительно заслужил.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Егоров Е.Е. Теломераза, старение, рак // Молекулярная биология. 1997. Т. 31. С. 16–25.

Егоров Е.Е. Теломеры, теломераза и стволовые клетки в механизмах патологии человека. В книге “Биология стволовых клеток и клеточные технологии”, под ред. акад. Пальцева, изд-во “Медицина”, Москва, С. 233–272. 2009, ISBN 5-225-03376-8.

Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Доклады АН СССР. 1971. Т. 201. С. 1496–1499.

Оловников А.М. Старение является результатом укорочения “дифферотены” в теломерах благодаря концевой недорепликации и недорепарации ДНК // Известия АН СССР, серия биологическая. 1992. Т. 4. С. 641–643.

Оловников А.М. Редусомная гипотеза старения и контроль биологического времени в процессе индивидуального развития // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 2–33.

Babizhayev M.A., Savel’yeva E.L., Moskvina S.N., Yegorov Y.E. Telomere length is a biomarker of cumulative oxidative stress, biological age and an independent predictor of survival and therapeutic treatment requirement associated with smoking behavior // Amer. J. Therap. 2010 (in press).

Babizhayev M.A., Yegorov Y.E. Telomere attrition in lens epithelial cells – a target for N-acetylcarnosine therapy // Frontiers Biosciences. 2010. V. 15. P. 934–956.

Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M. et al. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells // Science. 1998. V. 279. P. 349–352.

Carrel A. On the permanent life of tissues outside of the organism // J. Exp. Med. 1912. V. 15. P. 516–528.

Comfort A. Ageing, the biology of senescence. Holt, Rinehart and Winston, New York, 1964, 365p.

Cross S.H., Allshire R.C., McKay S.J. et al. Cloning of human telomeres by complementation in yeast // Nature. 1989. V. 338. P. 771–774.

Greider C.W., Blackburn E.H. // Cell. 1985. V. 43. P. 405–413.

Greider C.W., Blackburn E.H. Telomeres, telomerase and cancer // Sci. Amer. 1996. V. 274. P. 92–97.

Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts // Nature. 1990. V. 345. P. 458–460.

Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // Exp. Cell Res., 1961, V. 25. P. 585–621.

Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R. et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer // Science. 1994. V. 266. P. 2011–2014.

Martin-Ruiz C., Dickinson H.O., Keys B. et al. Telomere length predicts poststroke mortality, dementia, and cognitive decline // Ann. Neurol. 2006. V. 60. P. 174–180.

McClintock B. The fusion of broken ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases. // Missouri Agric. Exp. Sta. Res. Bull. 1938. V. 290. P. 1–48.

Morin G.B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats // Cell. 1989. V. 59. P. 521–529.

Muller H.J. The remaking of chromosomes // The Collecting Net. 1938. V. 8. P. 182–195.

Nishimura E.K., Granter S.R., Fisher D.E. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche // Science. 2005. V. 307. P. 720–724.

Ogami M., Ikura Y., Ohsawa M. et al. Telomere shortening in human coronary artery diseases // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2004. V. 3. P. 546–550.

Okuda K., Khan M.Y., Skurnick J. et al. Telomere attrition of the human abdominal aorta: relationships with age and atherosclerosis // Atherosclerosis. 2000. V. 152. P. 391–398.

Olovnikov A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // J. Theor. Biol. 1973. V. 41. P. 181–190.

Petersen S., Saretzki G., von Zglinicki T. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts // Exp Cell Res. 1998. V. 239. P. 152–160.

Szostak J.W., Blackburn E.H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors // Cell. 1982. V. 29. P. 245–255.

Valdes A.M., Andrew T., Gardner J.P. et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women // Lancet. 2005. V. 366. P. 662–664.

Vaziri H., Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span // Current Biology. 1998. V. 8. P. 279–282.

von Zglinicki T, Saretzki G., Döcke W., Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? // Exp Cell Res. 1995. V. 220. P. 186–193.

von Zglinicki T., Pilger R., Sitte N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts // Free Radic. Biol. Med. 2000. V. 28. P. 64–74.

von Zglinicki T., Martin-Ruiz C.M. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases // Current Molec. Med. 2005. V. 5. P. 197–203.

Watson J.D. Origin of concatemeric T7 DNA // Nature. 1972. V. 239. P. 197–201.

Yoon K.H., Ko S.H., Cho J.H. et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003. V. 5. P. 2300–2308.

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 1, с. 67–68

ЮБИЛЕИ

АЛЕКСАНДР ВЛАДИМИРОВИЧ ЗЕЛЕНИН
(к 80-летию со дня рождения)

10 марта 2010 г. исполнилось 80 лет со дня рождения Александра Владимировича Зеленина – выдающегося ученого в области клеточной и молекулярной биологии. Пятьдесят пять лет он отдал науке, и сейчас, как и много лет назад, Александр Владимирович остается по-настоящему увлеченным и преданным любимому делу человеком. Его без сомнения можно отнести к числу ученых романтиков, главной научной страстью которого стали хромосомы и хроматин.

Александр Владимирович родился в Москве в семье известного врача-терапевта, основателя отечественной школы клинической электрокардиографии Владимира Филипповича Зеленина (1881–1968). А.В. Зеленин учился во 2-м Московском медицинском институте, затем в аспирантуре при кафедре гистологии. В 1958 г. Он защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а в 1969 г. – доктора биологических наук.

А.В. Зеленин работает в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук с первых месяцев его основания, с 1960 г. За время работы в лаборатории функциональной морфологии клетки, возглавлявшейся чл.-корр. АН СССР М.Н. Мейселем, Александр Владимирович успешно продолжил традиции своего учителя и стал крупным специалистом в области флуоресцентной микроскопии и флуоресцентной цитохимии.

Пионерские работы А.В. Зеленина по взаимодействию акридинового оранжевого с живой клеткой до сих пор широко цитируются в мировой литературе.

Большое влияние на формирование научных интересов А.В. Зеленина оказала его стажировка в 1971 г. в Каролинском институте (Стокгольм, Швеция). Крупнейший специалист в области количественной микроскопии, первооткрыватель методов дифференциального окрашивания хромосом Тир-

борн Касперсон и известнейший российский цитогенетик чл.-корр. АМН СССР Александра Алексеевна Прокофьева-Бельговская стимулировали интерес А.В. Зеленина к изучению митотических хромосом.

Одно из направлений, развиваемых в лаборатории А.В. Зеленина – клеточная инженерия. Им и его сотрудниками были получены новые типы гибридных и реконструированных клеток животных, открыт не известный ранее тип реактивации ядра неделящейся клетки – макрофага. Значительный интерес представляют исследования А.В. Зеленина, выполненные в его лаборатории совместно с группой сотрудников Института электрохимии АН СССР, по созданию методов электрического слияния и электротрансфекции клеток животных. Разработанные ими подходы используются как в нашей стране, так и за рубежом.

Широко известны работы А.В. Зеленина и его сотрудников по изучению митотических хромосом животных и растений. Под его руководством были усовершенствованы и начали широко использоваться методы C-, Q- и G-окрашивания (бэндинг) и разработаны новые оригинальные подходы к высокоразрешающему дифференциальному окрашиванию хромосом растений и гибридизации *in situ*. Внедрены в практику работы и постоянно применяются компьютерные системы анализа изображения. Результаты молекулярно-цитогенетического исследования хромосом ряда видов важнейших сельскохозяйственных злаков и других культур (хлопок, лен, ромашка), а также их дикорастущих сородичей, внесли весомый вклад в развитие геномики этих растений и позволили сформулировать принципы применения хромосомного анализа в селекции. А.В. Зелениным и его сотрудниками проведен цикл исследований по локализации на хромосомах человека генов и последовательностей ДНК с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*. Полученные результаты внесли существенный вклад в развитие Российской программы "Геном человека". Признанием заслуг Александра Владимировича Зеленина в области исследования геномов человека и растений послужило присуждение ему в 2004 г. Премии им. А.А. Баева Российской академии наук.

В течение 10 лет А.В. Зеленин являлся заместителем директора Института молекулярной биологии по научной работе. Александр Владимирович – член ряда научных советов РАН, двух диссертационных советов, организатор многих научных совещаний и школ. Он активно участвует в работе многих отечественных журналов, много лет являлся заместителем главного редактора журнала "Биологические мембраны", является членом редколлегии журналов "Цитология" и "Онтогенез". В 2002 г. ему было присвоено почетное звание Заслуженного деятеля науки Российской Федерации.

А.В. Зеленин воспитал не одно поколение учеников. Под его руководством защищено около 50 кандидатских и 8 докторских диссертаций. Он является основателем школы по цитогенетике растений, широко известной в мире.

От имени учеников и сотрудников Александра Владимировича, а также редколлегии и редакции журнала сердечно поздравляем юбиляра с знаменательной датой, желаем ему счастья, здоровья и дальнейших творческих успехов.

Е.Д. Бадаева, С.Г. Васецкий,
Е.Е. Егоров, О.В. Муравенко

e-mail: ontogenez@list.ru

ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 1, с. 69–71

ПОТЕРИ НАУКИ

ПАМЯТИ ВЛАДИМИРА ИЛЬИЧА ИВАНОВА (1932–2010)

20 октября 2010 года скончался крупный ученый и замечательный человек Владимир Ильич Иванов, в 1989–2004 гг. возглавлявший Медико-генетический научный центр РАМН.

Он был для нас и крупным научным авторитетом, и наставником, и образцом преданного отношения к Науке. Благодаря своей высокой эрудиции во многих направлениях науки, в сочетании с высокой компетентностью и работоспособностью, он многое успел сделать в жизни и оставить глубокий след в науке и нашей памяти.

Владимир Ильич Иванов родился 21 июля 1932 года в городе Харбин (Китай). С 1950 по 1953 г. учился в Харбинском Политехническом Институте, затем поступил на биологический факультет Уральского государственного университета им. А.М. Горького в г. Свердловске (ныне Екатеринбург), окончив его в 1960 году. В 1959–1962 гг. работал в Уральском научно-исследовательском и проектном институте механической обработки и обогащения полезных руд. Результаты его исследований, посвященных роли тионовых бактерий в природных и технологических процессах выщелачивания медно-сульфидных минералов, нашли применение в практике обогащения руд медью. По этой теме им в 1962 году была защищена диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. В последующие два года в Институте биологии Уральского филиала Академии наук СССР Владимир Ильич занимался изучением поведения радионуклидов и накопления их гидробионтами в разных экосистемах. Эти исследования проводились в русле радиационной биогеоценологии – направления, которое успешно развивали Н.В. и Е.А. Тимофеевы-Ресовские.

В 1964 г. В.И. Иванов вместе с четой Тимофеевых-Ресовских переезжает из Свердловска в Обнинск Калужской области и становится руководителем группы радиационной генетики арабидопсиса в отделе, возглавляемом Н.В. Тимофеевым-Ресовским в Институте медицинской радиологии РАМН (тогда АМН СССР). Здесь вместе с группой сотрудников он начинает свою фундаментальную работу по радиобиологии и радиационной генетике

Arabidopsis thaliana. Это небольшое крестоцветное растение вскоре начинает рассматриваться в научном мире как "растительная дрозофила", в чем, несомненно, есть заслуга и В.И. Иванова. Ему удалось получить у арабидопсиса значительное число новых радиационно-индуцированных мутаций и, развивая классическую теорию мишени, продемонстрировать генетическую природу общего поражения облученных организмов, а также значение использования индуцированных мутаций в качестве инструмента для анализа генетического контроля развития арабидопсиса [1]. Итоги этой работы были суммированы В.И. Ивановым в 1974 году в монографии [2] и в диссертации на соискание степени доктора биологических наук "Радиология и радиационная генетика *Arabidopsis thaliana*".

В 1972 г. его приглашают в недавно созданный Институт медицинской генетики АМН СССР (ныне Медико-генетический научный центр РАМН) на должность заведующего Лабораторией экспериментальной генетики (в дальнейшем – Лаборатория генетики развития).Основным направлением возглавляемой им лаборатории в 1970–80-е гг. стало экспериментальное изучение генетики развития на дрозофиле и мыши. В.И. Иванов участвует в исследованиях по соматическому мозаицизму у дрозофилы, показавших важную роль клеточного клонального ограничения в процессах развития органов. В это время из лаборатории выходит значительная серия работ, посвященных изучению действия и взаимодействия гомеозисных (гомеобоксных) генов в процессе развития дрозофилы. В этих исследованиях было показано, что данные гены играют важную роль в процессах развития, регулируя активность нижестоящих генов-эффекторов. Как впоследствии стало ясно, они же имеют отношение к механизмам регуляции процессов развития и у млекопитающих. Еще одним объектом исследований в 1970–90-е гг. были лабораторные мыши. Среди них были выявлены линии животных, характеризующиеся генетической нестабильностью, обусловленной нарушениями некоторых этапов репаративного синтеза ДНК, что позволило рассматривать их в качестве экспериментальных моделей наследственных заболеваний человека с дефектами репарации ДНК. Впоследствии у мышей этих же линий были обнаружены аномалии поведенческих реакций (аудиогенная эпилепсия и др.) и нарушения развития некоторых структур головного мозга. Кроме того, в начале 1990-х гг. в лаборатории было начато культивирование и исследования эмбриональных стволовых клеток мышей, которые в настоящее время успешно продолжены и расширены бывшими сотрудниками лаборатории, работающими ныне в США.

В этот же период своей научной деятельности вместе с Н.П. Бочковым и А.Ф. Захаровым В.И. Иванов написал руководство для врачей по медицинской генетике [3].

Являясь талантливым ученым, организатором и отличным администратором, Владимир Ильич сумел сохранить "критическую массу" основного ядра коллектива МГНЦ РАМН в драматические для отечественной науки (да и всей страны) 1990-е годы, в результате чего Центр не только остался "на плаву", но и продолжал работать, готовить научные кадры, а также развивать новую тематику. В частности, сложившееся в результате исследовательской работы общее представление о преимущественно системном характере биологических процессов при широкой вариации их проявлений приводит В.И. Иванова с сотрудниками к необходимости привлечения для анализа изменчивости, классификации и диагностики врожденных пороков развития человека адекватных методов формального анализа, включая разработку автоматизированных информационно-диагностических систем, а также создание компьютерных баз данных. Разработанные в лаборатории В.И. Иванова информационно-диагностические системы СИНГЕН и ХРОДИС нашли применение в работе ряда медико-генетических консультаций России.

Последние полтора десятилетия В.И. Иванов плодотворно занимался вопросами формирования этико-правовой базы для оценки внедряемых в медико-генетическую практику исследований, основанных на геномных, генно-инженерных и иных биотехнологиях. Это естественным образом вытекало из его руководства медицинским разделом российской Программы "Геном человека", а также личной высоконравственной позиции ученого и человека. По этой проблематике В.И. Иванов постоянно участвовал в дискуссиях, организуемых Координационным комитетом по биоэтике при Совете Европы [4], был членом комитетов по биоэтике Минздрава РФ, РАМН, РАН, участвовал в определении стратегии ВОЗ по этическим проблемам медико-генетических исследований. Доклады Владимира Ильича по вопросам биоэтики неизменно вызывали подлинный интерес у самого широкого круга участников на Международных Рождественских образовательных чтениях.

На протяжении ряда лет В.И. Иванов читал курс лекций по генетике для студентов-биофизиков МГУ им. М.В. Ломоносова и МИФИ. Неоднократно назначался председателем государственных комиссий по приему экзаменов и защите дипломных работ на Факультете естественных наук Новосибирского Государственного Университета, на биологическом факультете Мордовского Государственного Университета, в МИФИ. В 1988–2004 гг. В.И. Иванов руководил по совместительству кафедрой генетики Медико-биологического факультета II-го Московского государственного медицинского института (с 1989 г. – РГМУ) им. Н.И. Пирогова, обнаруживая незаурядные преподавательские и организационные качества. Был создан учебно-научный комплекс, среди ряда задач которого осу-

ществлялась подготовка кадров врачей-лаборантов-генетиков для МГНЦ РАМН и других научно-исследовательских учреждений РАМН, а также специализация выпускников по медицинской генетике через целевую стажировку и аспирантуру. К 2004 году количество выпускников МБФ, связавших свою дальнейшую научную деятельность с различными лабораториями МГНЦ РАМН, составило более 40 человек. Достойным итогом полутора десятилетий заведования кафедрой явился вышедший в свет под редакцией В.И. Иванова учебник по общей и медицинской генетике для вузов, написанный сотрудниками кафедры и при непосредственном его участии [5].

В.И. Ивановым опубликовано более 350 научных работ (из них около 100 – за рубежом) по радиоэкологии, микробиологии, радиобиологии, генетике, биоинформатике, биоэтике и др. Целый ряд публикаций посвящен всегда входившей в область интересов В.И. Иванова истории науки, особенно генетики. Под его редакцией вышли в свет многие научные труды и издания.

Как крупный организатор науки В.И. Иванов до последних дней был активным членом многих специализированных советов по защите докторских и кандидатских диссертаций, членом ряда оргкомитетов международных форумов. Он являлся членом Бюро Медико-биологического отделения РАМН и председателем Межведомственного научного совета по медицинской генетике. В.И. Иванов – один из учредителей Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова (в настоящее время Вавиловское общество генетиков и селекционеров) и на протяжении многих лет – председатель Московского отделения ВОГиС. Он также входил в число организаторов Российского общества медицинских генетиков, активно участвуя в подготовке и проведении съездов и конференций обоих обществ. Будучи членом Московского общества испытателей природы с 1958 года, неоднократно избирался в состав Президиума Совета Общества. В.И. Иванов являлся членом редколлегии журнала “Онтогенез” и членом редакционного совета журнала “Медицинская Генетика”.

Вместе с тем Владимир Ильич всегда оставался простым, доступным для общения человеком. Его огромная эрудиция во многих областях науки и знаний не мешала ему быть внимательным, отзывчивым, терпеливым руководителем. Он всегда приходил на помощь в разрешении встречаемых нами в жизни затруднений, удивительным образом умудрялся гасить в зародыше возникающие в коллективе конфликты, создавая теплую, товарищескую, рабочую атмосферу. Во всех обстоятельствах он оставался деятельным, неунывающим, доброжелательным человеком, немного ироничным к себе и окружающим, понимающим и ценящим юмор. Он умел вовремя пошутить и от души смеялся над удачными шутками других. Безусловно, он был глубоко верующим, и именно с его помощью была организована ставшая впоследствии ежегодной поминальная служба по усопшим генетикам в Храме Космы и Дамиана в Шубине.

Таким Владимир Ильич и останется навсегда в нашей памяти.

Сотрудники Лаборатории генетики развития МГНЦ РАМН

ССЫЛКИ

1. *Тимофеев-Ресовский Н.В., Иванов В.И., Корогодин В.И.* Применение принципа попадания в радиобиологии. М.: Атомиздат, 1968. То же на нем. яз.: *Timofeeff-Ressovsky N.W., Ivanov V.I., Korogodin V.J.* Die Anwendung des Treffeprinzip in der Strahlenbiologie. Jena: Fischer, 1972.
2. *Иванов В.И.* Радиобиология и генетика арабидопсиса. Проблемы космической биологии, т. XXVII. М.: Наука, 1974. 192 с.
3. *Бочков Н.П., Захаров А.Ф., Иванов В.И.* Медицинская генетика (руководство для врачей) // М.: Медицина, 1984. 366 с. То же на нем. яз.: *Bochkov N.P., Zakharov A.F., Ivanov V.I.* Medizinische Genetik. Ein Leitfaden fur Aerzte // Jena: Fischer, 1988.
4. *Ivanov V.I.* Human genome research and consensus ethics in medical genetics // In: Ethics and human genetics. Strasbourg: Council of Europe Press, 1994.
5. *Генетика.* Учебник для вузов / Под ред. академика РАМН В.И. Иванова. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2006. 638 с.: ил.