

|                                                        | Название статьи                                                                                                                                                                                 | Страницы | Цит. |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|------|
| <b>ОБЗОРЫ</b>                                          |                                                                                                                                                                                                 |          |      |
| <input type="checkbox"/>                               | <b>ЦЕМЕНТНАЯ ЖЕЛЕЗА</b><br>Пшенникова Е.С., Воронина А.С.                                                                                                                                       | 3        | 0    |
| <b>БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ</b>                 |                                                                                                                                                                                                 |          |      |
| <input type="checkbox"/>                               | <b>КОЛИЧЕСТВЕННАЯ СВЯЗЬ ПОЧЕЧНОГО КРОВотоКА С РАЗМЕРОМ И ПЛОТНОСТЬЮ КЛУБОЧКОВ В ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ КРЫС</b><br>Шыырапай У.В., Беличенко В.М., Шошенко К.А., Айзман Р.И.                     | 14       | 0    |
| <b>БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ</b>                |                                                                                                                                                                                                 |          |      |
| <input type="checkbox"/>                               | <b>МОРФОДИНАМИКА ПЛАСТИНКИ КОНТАКТА В ХОДЕ СОЗРЕВАНИЯ ООЦИТА У СЦИФОИДНОЙ МЕДУЗЫ AURELIA AURITA (CNIDARIA: SEMAEOSTOMAE)</b><br>Адонин Л.С., Подгорная О.И., Шапошникова Т.Г.                   | 20       | 0    |
| <b>БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ</b>                      |                                                                                                                                                                                                 |          |      |
| <input type="checkbox"/>                               | <b>ФОРМИРОВАНИЕ ПРОВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ СОЗРЕВАЮЩИХ ПЛОДОВ ФАСОЛИ (PHASEOLUS LIMENSIS L.) ПО ДАННЫМ ЯДЕРНОЙ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ МИКРОТОМОГРАФИИ</b><br>Виноградова И.С., Фалалеев О.В.              | 28       | 1    |
| <b>МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК</b> |                                                                                                                                                                                                 |          |      |
| <input type="checkbox"/>                               | <b>НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ КЛЕТОК ПЕРИВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЫ МОЗГА СИМЫ ONCORHYNCHUS MASOU (SALMONIDAE)</b><br>Пушина Е.В., Обухов Д.К., Вараксин А.А.                                             | 39       | 1    |
| <b>МОРФОГЕНЕЗ</b>                                      |                                                                                                                                                                                                 |          |      |
| <input type="checkbox"/>                               | <b>МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОГО РЕГУЛЯТОРНОГО КОНТУРА ГЕННОЙ СЕТИ МОРФОГЕНЕЗА МАКРОХЕТ D. MELANOGASTER</b><br>Бухарина Т.А., Голубятников В.П., Голубятников И.В., Фурман Д.П.           | 54       | 1    |
| <b>ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ</b>                               |                                                                                                                                                                                                 |          |      |
| <input type="checkbox"/>                               | <b>ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МУТАНТНЫХ ГЕНОВ FGF5<sup>eo-y</sup>, WE И WAL ИЗМЕНЯЕТ ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ЦИКЛОВ РОСТА ВОЛОС У МЫШИ</b><br>Нестерова А.П., Низамутдинов И.И., Конюхов Б.В.                          | 60       | 2    |
| <b>ЭМБРИОГЕНЕЗ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ</b>                      |                                                                                                                                                                                                 |          |      |
| <input type="checkbox"/>                               | <b>ТРАНСГЕННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ, СИНТЕЗИРУЮЩИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ</b><br>Павлова Г.В., Канайкина Н.Н., Пантелеев Д.Ю., Охотин В.Е., Ревущин А.В. | 66       | 0    |

УДК 577

## ЦЕМЕНТНАЯ ЖЕЛЕЗА – ОРГАН АДГЕЗИИ ЗАРОДЫШЕЙ *Xenopus laevis*

© 2012 г. Е. С. Пшенникова, А. С. Воронина

Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук

Москва 119071, Ленинский проспект, д. 33

E-mail: pshennikova57@mail.ru

Поступила в редакцию 05.04.10 г.

Окончательный вариант получен 23.12.10 г.

Цементная железа у бесхвостых амфибий — это временный эктодермальный орган, необходимый для прикрепления зародыша к субстрату. В обзоре даны некоторые представления о происхождении цементной железы лягушек *Xenopus laevis*, ее функционировании, экспрессирующихся в ней генах, регуляции ее формирования и развития. Отмечена роль некоторых гомологов генов *agr* цементной железы *Xenopus laevis* при различных состояниях других животных и человека.

**Ключевые слова:** *Xenopus laevis*, цементная железа, эмбриональная индукция, регуляция экспрессии генов.

### ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

В самой крайней точке ростральной области личинки большинства бесхвостых амфибий располагается небольшой, слегка возвышающийся над окружающей поверхностью, очень липкий островок клеток. Это цементная железа, орган адгезии, называемая еще присоской, хотя правильнее было бы назвать ее липучкой (Ryder, 1888; Nieuwkoop, Faber, 1967; обзоры Sive, Bradley, 1996; Pennati et al., 2000). Клетки цементной железы выделяют водостойкую слизь, которая позволяет вылупившемуся зародышу прикрепиться к твердой опоре до тех пор, пока он не сможет хорошо плавать и питаться. Есть данные, что еще до вылупления зародыш прикрепляется цементной железой к внутренней поверхности вителлиновой оболочки. В месте воздействия фермента железы вылупления (расположена на лбу зародыша выше цементной железы и имеет форму перевернутой рогатки) вителлиновая оболочка прорывается, и зародыш выносятся из нее напором жидкости, но остается фиксированным на ней (Bles, 1905, по Nokhbatolfoghahai, Downie, 2005).

Цементные железы обнаружены у зародышей других хордовых — одиночных асцидий, некоторых костных рыб, таких, как цихлиды (Sive, Bradley, 1996). У некоторых хвостатых амфибий существует временный орган адгезии — балансиры (Harrison, 1925). И липучки, и балансиры выделяют слизь, имеют одинаковую иннервацию и, возможно, эволюционно сходны (Sauka-Spengler et al., 2002). Однако они имеют явно не одинаковую

гистологическую структуру (Nokhbatolfoghahai, Downie, 2005).

Изучению онтогенеза бесхвостых амфибий с прямым развитием, сумчатых лягушек, а также сравнению их с *Xenopus laevis*, посвящен обзор Десницкого (2004). Закономерно, что цементные железы не обнаруживаются у видов, в развитии которых зародыши не попадают в открытые водоемы (Nokhbatolfoghahai, Downie, 2005). Так, головастики лягушек *Phyllomedusa trinitatis* вылупляются на более поздней стадии, чем *Xenopus laevis*, и уже способны питаться и плавать. У квакши *Eleutherodactylus urichi* вовсе нет стадии головастика, а из большого яйца вылупляется лягушонок. Третий вид амфибий, у которого авторы не обнаружили цементной железы (*Leptodactylus fuscus*), биологически очень близок к видам, имеющим этот орган. Это оказалось неожиданным, но вполне объяснимым, поскольку перед тем, как попасть в воду, вылупившийся головастик впадает в состояние так называемого “ареста развития”, которое длится до сильного дождя, и за это время головастик успевает стать готовым к жизни в водоеме.

У бесхвостых амфибий цементная железа видна сначала как пигментированная плоская полоска клеток чуть вентральнее самого переднего конца зародыша. В дальнейшем лишь у зародышей *Xenopus laevis* она остается на том же месте. У других она обретает V- или M-образную форму, или делится на две части, как у *Rana temporaria* (Nokhbatolfoghahai, Downie, 2005). В той же работе приводятся результаты скрупулезнейших микроскопических исследований цементных желез 20 видов бесхвостых

амфибий, относящихся к 6-ти семействам, и сделана попытка морфологической классификации этих структур. Подробно описаны 5 типов развития цементных желез у зародышей этих животных, и приведено сравнение полученных результатов с литературными данными других авторов.

Цементная железа имеет собственную иннервацию нижнечелюстной веткой тройничного нерва, благодаря которой осуществляется так называемая “тормозная реакция”, не позволяющая прикрепившемуся зародышу шевелиться. Тем самым экономится энергия и зародыш становится менее заметным (Roberts, Blight, 1975; Davies et al., 1982; Boothby, Roberts, 1992a, b).

Прикрепление головастика с помощью цементной железы является сложным физиологическим процессом (Lambert et al., 2004). В покое слизь отрывается от субстрата примерно каждые 17 минут, после чего, поплавав, головастик снова прикрепляется. Механочувствительные нейроны постоянно подают в цементную железу импульсы с частотой около 1 герца для подтверждения прикрепления. Для прекращения плавательных движений, когда голова касается подложки, и для снижения реактивности на прикосновения, необходимы рецепторы гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). При нажатии на присоску аксоны чувствительных нейронов выделяют глутамат, чтобы возбудить ГАМК-эргические ретикулоспинальные нейроны, которые в свою очередь ингибируют ГАМК-чувствительные спинальные нейроны. Действие ингибиторов ГАМК-рецепторов и перерезка иннервирующих цементную железу нервов приводит к потере указанных адаптивных реакций. Авторы отмечают, что это один из очень немногих случаев, когда чувствительные нейроны, получив внешний стимул, провоцируют снижение реакции и двигательной активности животного (Lambert et al., 2004).

### МОРФОЛОГИЯ И АНАТОМИЯ ЦЕМЕНТНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Цементная железа формируется из наружного слоя зародышевой эктодермы (Nieuwkoop, Faber, 1967; Drysdale, Elinson, 1992). Из этого наружного слоя развиваются также эпидермис, железа вылупления, некоторые нейроны и — после смыкания нервной трубки — эпэндимный эпителий, выстилающий спинномозговой канал и стенки желудочков мозга (Hartenstein, 1989).

Морфологически впервые цементная железа идентифицируется в начале нейруляции, когда группа клеток, лежащих впереди нервной складки, становится пигментированной сильнее, чем окружающие ткани. Во время смыкания нервной трубки клетки эти вытягиваются в высоту и перед вылуплением зародыша начинают секретировать

слизь. Гистологически, в световом микроскопе, на стадии 19 (стадии нервной трубки) цементная железа видна ниже переднего конца нейральной складки как плотная группа эктодермальных клеток, нагруженных пигментными гранулами, запасенными в ооците. К стадии 35–36 клетки железы увеличиваются в высоту и становятся в 10 раз выше нежелезистых клеток эктодермы (Sive, Bradley, 1996). Апикальная эозинофильная зона клеток железы содержит пигментные гранулы, базальная зона — светлые капли жира, в центре клетки располагается ядро. К 40-й стадии — ранней стадии головастика — клетки уменьшаются в высоте и начинают терять пигментные гранулы. В период между 45-й и 48-й стадиями пигмент выводится со слизью, а количество светлых капель жира уменьшается. На стадии 48–49 происходит вакуолизация клеток железы и характерные черты теряются. Кровоснабжение цементной железы прекращается. Однако фагоцитирующих клеток поблизости не было обнаружено ни на одной стадии дальнейшего развития. Она остается окруженной эктодермой на протяжении всего своего жизненного цикла в 10–12 дней при комнатной температуре (Uehlinger et al., 1971; Lyerla, Pelizzari, 1973; Van Evercooren, Picard, 1978).

Наблюдение за развитием цементной железы обнаружило определенную автономность этого органа (Lyerla, 1975). Так, было описано развитие эктодермы цементной железы *Xenopus laevis*, культивируемой как эпидермальные везикулы, взятые на стадии нейрулы. Жизненный цикл эксплантированной железы проходил почти параллельно с таковым у целого зародыша. Клетки увеличивались в размере, секретировали слизь и большую часть пигментных гранул и затем угасали. Вся последовательность событий занимала 16–21 день при 18°C. Изучаемые везикулы внешне не менялись после старения железистых клеток и оставались живыми на протяжении 35-и дней культивирования. Автор делает вывод, что развитие цементной железы может происходить нормально в отсутствие какого-либо влияния зародыша и является независимой цепью событий, происходящих с клетками железы, которые, однако, уже начали дифференцировку на стадии нейрулы (Lyerla, 1975).

Остается не ясным, происходит ли запрограммированная гибель клеток цементной железы. В связи с этим интересен летальный мутант развития *Xenopus DCG* (*degeneration of cement gland*). Гомозиготные мутанты легко идентифицируются на стадии 29–30 по отсутствию развития полноценной цементной железы. На последующих стадиях цементная железа дегенерирует, как и, вероятно, другие органы, и на 45-й стадии наступает смерть (обзор с каталогом мутаций *Xenopus laevis* Droin, 1992).

# ГЕНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕСЯ ПРЕИМУЩЕСТВЕННО В КЛЕТКАХ ЦЕМЕНТНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*Гены XCG, XAG, XA*

Чтобы установить точное время и место появления цементной железы в развитии *Xenopus*, был проведен поиск генов, экспрессирующихся специфично в этом органе. Были получены три к-ДНК клона XCG2, 7 и 13 и показано, что эти к-ДНК гибридизуются с РНК, выделенной из головной области зародыша, но не из туловища (Jamrich, Sato, 1989). Экспрессия гена XCG 13 наблюдалась лишь в области цементной железы и появлялась на стадии 12, когда ни одна область нервной пластинки не определялась. Если ген XCG 13 обнаруживается на протяжении всего развития железы, то гены XCG 2 и XCG 7 – лишь начиная со стадии 25. Позже их экспрессия обнаруживается и в других органах – глотке, пищеводе и слуховых везикулах. Кроме того, авторы показали, что в результате индукции формирования цементной железы на анимальных эксплантах с помощью раствора 10 мМ хлористого аммония (Picard, 1975a, b) наблюдалась значительная активация экспрессии всех трех генов. Контролем служило поведение эпидермального цитокератина ХК 81, чья экспрессия спадала в результате такой обработки.

Анализ генов, экспрессирующихся в клетках цементной железы *Xenopus*, проводили и в других лабораториях. Эквивалентом XCG 13 (Jamrich, Sato, 1989) считают ген XCG (Sive et al., 1989; Sive, Bradley, 1996), кодирующий муциноподобный белок и экспрессирующийся исключительно в клетках цементной железы. Ген XAG (эквивалент XCG 7) экспрессируется интенсивно в клетках цементной железы и менее интенсивно в железе вылупления. Ген XA, возможно идентичный XCG 2 (Jamrich, Sato, 1989), также кодирует секретлируемый белок, его экспрессия ассоциирована лишь с клетками задней части цементной железы, что подтверждает сложность ее строения (Hemmati-Brivanlou et al., 1990). У взрослого *Xenopus* эти гены экспрессируются только в желудке (Baldessari et al., 2005).

При более детальном исследовании гена XAG (Aberger et al., 1998) выяснилось, что он представлен двумя псевдоаллелями XAG 1 и XAG 2, имеющими 35% различий в N-концевой области длиной 40 нуклеотидов. Авторы показали, что лишь XAG 2 отвечает за специфичность развития передней эктодермы у *Xenopus*. В той же работе было показано, что на стадии поздней гаструлы м-РНК XAG2, а следовательно, и клетки будущей цементной железы, обнаруживаются точно в переднем отделе дорзальной эктодермы. К началу нейруляции м-РНК XAG2 обнаруживается на границе между дорзальной и вентральной областями эктодермы, в районе закладки железы.

Маркер XAG2 также позволил проследить развитие цементной железы при таких воздействиях, как искусственные дорзализация зародыша с помощью обработки раствором хлористого лития (Abe, Ohzu, 1987) или вентрализация с использованием ультрафиолета (Scharf, Gerhart, 1983). Так, обработка раствором хлористого лития приводила к значительному расширению зоны экспрессии XAG2 к заднему концу зародыша, а облучение ультрафиолетом, напротив, сужало эту зону до небольшой группы клеток на самом переднем конце зародыша.

В недавней работе с мышинным гомологом *agr2* (Park S.-W. et al., 2009) определено, что продукт этого гена – не сама муциноподобная слизь, а фермент дисульфид изомеразы, цистеинбогатый гликопротеин, который из слизи формирует защитный гель, выстилающий слизистые оболочки. Недостаток работы этого гена у мышей не снижает их выживаемости, однако мыши в результате страдают колитами. Остаток цистеина в тиреодоксинподобном домене AGR2 способствует образованию дисульфидных связей в молекулах муцина, т.е. участвует в посттрансляционном его процессинге. Муцины – это полипептиды длиной от 322 до 13280 аминокислотных остатков, содержащие на всем протяжении цистеинбогатые участки (обзоры Perez-Vilar, Hill, 1999; Perez-Vilar, Mabolo, 2007). Образование внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей существенно для формирования третичной и четвертичной структур этих секреторных белков.

## *Ген Xotx2*

Одним из кандидатов в регуляторные гены цементной железы *Xenopus laevis* стал гомеобоксный ген *Xotx2* – свойственный позвоночным гомолог мушиного гена *otd* (*orthodentical*), отвечающего за правильное развитие головных структур (Cohen, Jürgens, 1990; Finkelstein, Perrimon, 1990). *Xotx2* был клонирован и показано, что он начинает экспрессироваться в ранней гаструле в дорзальной мезодерме и слабее в дорзальной эктодерме, однако к поздней гаструле м-РНК *Xotx2* обнаруживается в широкой антеро-дорзальной области зародыша, включая область будущих переднего мозга и цементной железы (Blitz, Cho, 1995; Pannese et al., 1995). Ретиноевая кислота, которая препятствует развитию цементной железы (Durstun et al., 1989; Sive et al., 1990) ингибировала экспрессию *otx2* (Pannese et al., 1995; Simeone et al., 1995), что также указывало на связь *otx2* с цементной железой. Для того, чтобы определить, как регулируется активность *otx2* в пространстве и времени, и непосредственно ли *otx2* активирует экспрессию маркерных генов цементной железы, было исследовано поведение гормон-индуцибельного рекомбинантного

*otx2-GR* (Gammill, Sive, 1997). Было установлено, что, во-первых, существуют некие кофакторы, моделирующие активность *otx2*, поскольку *otx2-GR* активирует экспрессию генов цементной железы только в вентро-латеральной области эктодермы и никогда в нервной ткани. Во-вторых, авторы определили, что время, в течение которого эктодерма способна отреагировать на действие *otx2-GR*, ограничено. Максимальная компетентность эктодермы приходится лишь на период средней гаструлы, когда теряется способность воспринимать сигналы мезодермы. В-третьих, было определено, что гены цементной железы *XCG* и *XAG*, а также эндогенный *otx2*, являются мишенями действия *otx2-GR*, причем ген *XCG* может активироваться в отсутствие синтеза белка. И, в-четвертых, показано, что, по меньшей мере, частично ингибиторный эффект ретиноевой кислоты на развитие цементной железы объясняется прекращением экспрессии *otx2* (Gammill, Sive, 1997, 2000). Интересно, что гомолог *Xotx2 Ecotx2* был идентифицирован у листовой лягушки с прямым развитием *Eleutherodactylus coqui*, клонирован, и показано, что топографически его экспрессия не выходит за пределы нервной пластинки. Следовательно, у зародышей *Eleutherodactylus coqui* не формируется цементная железа из-за отсутствия экспрессии гена *otx2* в соответствующей области (Fang, Elinson, 1999). Однако остается не ясным, какие факторы модулируют активность *Xotx2*, отвечающего за расположение цементной железы в том месте, где ей положено быть.

#### Гены *Xpitx*

В развивающейся цементной железе *Xenopus* помимо *Xotx2* были обнаружены гены *Xpitx* из семейства регуляторных гомеобоксных генов (Holleman, Pieler, 1999; Schweickert et al., 2001a, b; Dickinson, Sive, 2007). Ген *pitx1* первоначально был идентифицирован как тканеспецифичный регулятор транскрипции гена проопиомеланокортина в гипофизе *Drosophila* (Lamonerie et al., 1996). Было показано, что на стадиях 26–32 эти белки обнаруживаются и в железистом, и в базальном слоях цементной железы, однако позже лишь в базальном слое, в котором располагаются иннервирующие этот орган волокна. Подобно гомеобоксным белкам *otx*, белки *pitx* у позвоночных содержат ДНК-связывающий домен из 60 аминокислот, образующий достаточно консервативную структуру спираль–поворот–спираль (helix–turn–helix), в которой последняя спираль взаимодействует с ДНК и отвечает за специфичность узнавания ее последовательности (Poulin et al., 2000). Гиперэкспрессия *Xpitx1* приводит к разрастанию цементной железы или восстановлению ее размера после действия ретиноевой кислоты (Chang et al., 2001).

Чтобы установить, какие еще факторы обеспечивают дифференцировку цементной железы *Xenopus* был проанализирован промотор гена *XAG* (Wardle et al., 2002). Авторы показали, что в нем области связывания факторов транскрипции Ets и ATF/CREB существенны для экспрессии этого гена. Однако сами эти факторы транскрипции не были обнаружены в клетках цементной железы. При анализе различных конструкций промоторной области *XAG* выяснилось, что введение *Otx2* гена не вызывало экспрессии *XAG*, если часть промотора, содержащая область связывания фактора CREB, была удалена. Таким образом был установлен сайт действия *Xotx2*. Интересно, что сайта связывания белков Xpitx в промоторной области гена *XAG* авторы не обнаружили.

Проведен анализ изменений экспрессии генов *XCG*, *XAG* и *Xotx2* при изучении последствий действия на зародыши *Xenopus laevis* повышенной гравитации (Kawakami et al., 2006). Показано, что повышение силы тяжести в 2–5 раз приводило, во-первых, к замедлению развития, микроцефалии и микроофтальмии; во-вторых, подавлению экспрессии генов *XAG* в цементной железе и *Xotx2* в мозгу и глазах и, в-третьих, к усиленному апоптозу нервной ткани. Снижение гравитации (микроG на стадиях 11–45), получаемое при космических полетах или экспериментально в лаборатории (Olson et al., 2010), также вызывало задержку развития, удлинение хвоста, изменения в легких и хрящах головы. Однако при “возвращении на Землю” нормальное развитие восстанавливалось. Авторы полагают, что большинство этих изменений было вызвано вибрацией, резкими перепадами давления, а не снижением силы тяжести как таковым.

Некоторые другие гены, экспрессия которых обнаружена в клетках цементной железы *Xenopus laevis*, представлены в таблице 1.

#### РЕГУЛЯЦИЯ ФОРМИРОВАНИЯ И РАЗВИТИЯ ЦЕМЕНТНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Рассмотрению индуцирующих и ингибирующих сигналов, которые определяют формирование и местоположение цементной железы у *Xenopus laevis*, посвящено несколько обзоров (Sive, Bradley, 1996; Wardle, Sive, 2003; De Robertis, 2006).

Выбор клетками зародышевой эктодермы судьбы эпидермальных клеток происходит под влиянием белков BMP. Роли этих белков в раннем развитии *Xenopus* посвящен обзор Дейла и Джонса (Dale, Jones, 1999). BMP1 – металлопротеиназа, родственная ферменту *UVS.2* в железе вылупления *Xenopus laevis* (Maeno et al., 1993). Остальные BMP – это члены подсемейства трансформирующих ростовых факторов (*Transforming Growth Factors beta (TGFbeta)*), секретируемые сигнальные молекулы.

**Таблица 1.** Некоторые гены, экспрессия которых обнаружена в цементной железе *Xenopus laevis*, помимо генов *Xcg*, *Xag*, *Ха*, *Хотх2* и *Хрп1х*

| Название гена                   | Продукт гена                                  | Стадия обнаружения        | Функции в цементной железе                                                     | Литература              |
|---------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <i>XK 70</i>                    | цитокератин эпидермальный                     | с гастролы                | развитие цитоскелета                                                           | LaFlamme, Dawid, 1990   |
| <i>XK endo B</i>                | цитокератин неэпидермальный                   | с 23                      | развитие цитоскелета                                                           | LaFlamme, Dawid, 1990   |
| <i>XNIF</i>                     | белок нейрофиламентов                         | с 24                      | развитие нейронов                                                              | Charnas et al., 1992    |
| <i>Beta-catenin</i>             | бета-катенин                                  | с 24                      | поддерживает клетки вместе                                                     | Fagotto, Gumbiner, 1994 |
| <i>Xgal VIa</i>                 | галектин <i>VIa</i>                           | с 24                      | адгезия клеток                                                                 | Michiue et al., 2007    |
| <i>Xbdnf</i>                    | нейротрофин <i>BDNF</i>                       | с нейрулы                 | указание конечной точки роста аксона                                           | Huang et al., 2007      |
| <i>Xcntn-1</i>                  | контактин 1                                   | со стадии хвостовой почки | нейрональные молекулы узнавания                                                | Fujita, Nagata, 2007    |
| <i>Xinsm 1</i>                  | фактор транскрипции <i>IA1</i>                | с нейрулы                 | участие в формировании норадренергических нейронов                             | Parlier et al., 2008    |
| <i>Xcerc 1</i>                  | фактор роста, родственник аденозин дезаминазе | с нейрулы                 | участие в нейро- и ангиогенезе (?)                                             | Iijima et al., 2008     |
| <i>Nocturnin</i>                | деаденилаза<br>ген циркадного ритма           | 19–25                     | (?)                                                                            | Baggs, Green, 2003      |
| <i>xBmal1</i> ,<br><i>xPer2</i> | гены циркадного ритма                         | 25–32                     | (?)                                                                            | Curran et al., 2008     |
| <i>Xcxcl14</i>                  | хемокин <i>CXCL14</i>                         | 20–40                     | обеспечение движения лейкоцитов к очагу воспаления и клеток в эмбриогенезе (?) | Park B.Y. et al., 2009  |
| <i>Xglut1</i>                   | мебранный переносчик глюкозы                  | с нейрулы                 | энергообеспечение клеток (?)                                                   | Kuzawa et al., 2007     |
| <i>Хару</i>                     | апираза                                       | с нейрулы                 | гидролизует УТФ и УДФ с образованием энергии                                   | Devader et al., 2006    |
| <i>Альфа-цепей ламинина</i>     | компонент основных мембранных гликопротеинов  | с 25                      | (?)                                                                            | Ahmad, 2009             |
| <i>xlHAS3</i>                   | гиалуронан-синтаза 3                          | с нейрулы                 | синтез гиалуронана                                                             | Vigetti et al., 2003    |

Нервная ткань может сформироваться из эктодермы лишь там, где та защищена от эпидермальной индукции (Hemmati-Brivanlou, Melton, 1997). Такой защитой служат BMP-антагонисты – noggin, chordin, Nodal-Related-3 (Xnr-3), follistatin – белки, секретируемые клетками дорзальной губы бластопора (организатора Шпеманна-Мангольд), и связывающие BMP в межклеточном пространстве, препятствуя их связыванию с рецепторами. Антагонисты BMP вблизи Организатора оказывают сильнейшее ингибирующее действие, которое ослабевает с расстоянием. В дорзальной области активность BMP минимальна, и образуется нервная ткань; там, где активность BMP максимальна, образуется эпидермис; там, где некий промежуточный уровень активности, – формируется цементная железа. Однако простой диффузией анта-

гонистов BMP из места синтеза в стороны нельзя объяснить локальность их действия при образовании цементной железы. Были предприняты попытки точнее разобраться, как формируется градиент активности BMP (например, De Robertis, Kuroda, 2004).

При изучении рецепторов BMP выяснилось, что в эту сложную структуру входит серин-треониновая протеинкиназа. Рецептор, связавшись с BMP, фосфорилирует сериновые остатки в С-области ДНК-связывающего белка Smad1 (Liu et al., 1996), активируя его, т.е. обеспечивая его активность как фактора транскрипции. Далее Smad1 должен образовать комплекс со Smad4 для перехода в ядро (Schmieder, Hill, 2007). Возможно, что количественное и временное дозирование сигнала

BMP происходит на уровне регуляции активности Smad. Известно, что активность Smad4 не контролируется фосфорилированием, однако, существует убихитин-лигаза Smad4 (Izzi, Attisano, 2006). Убихитинирование, как и фосфорилирование, процесс обратимый, так как существует целое семейство (*DUBs*) деубихитинирующих ферментов (Nijman et al., 2005). Для *Xenopus* (и человека) был идентифицирован такой фермент *FAM/USP9x*, аналог *Drosophila Fat Facets* (Dupont et al., 2009). Биохимически это можно объяснить так. Некая убихитин-лигаза, например, *Ectodermmin/Tif1gamma* (*Ecto*) присоединяет убихитин к Smad4, инактивируя его (Dupont et al., 2005), а *FAM* освобождает Smad4 от убихитина, тем самым снимая блокировку со всего BMP сигнала. Приведенная схема объясняет и опубликованные ранее данные о том, что *E3* убихитин-лигаза *GREUL1* способствует роstralизации дорзальной эктодермы у зародышей *Xenopus* (Borchers et al., 2002). Авторы показали, что гиперэкспрессия ортолога *Goliath Related E3 Ubiquitin Ligase 1* (*GREUL1*) *Drosophila* у зародышей *Xenopus laevis* может косвенно индуцировать развитие цементной железы, о чем свидетельствует экспрессия генов *XAG* и *Hotx2*. Таким образом, можно предположить, что работа этой *E3* убихитин-лигазы и ее ингибитора обеспечивает промежуточный уровень BMP сигнала, необходимый для формирования цементной железы.

Известно, что диссоциация клеток эктодермы *Xenopus* в течение нескольких часов сама по себе приводит к приобретению ими черт нервных клеток (Grunz, Tacke, 1989; Wilson, Hemmati-Brivanlou, 1995). Выяснилось, что утрата межклеточных связей приводит к активации митогенактивируемой протеинкиназы (*MAPK*), которая фосфорилирует Smad1, что приводит к потере этим белком активности фактора транскрипции (Kuroda et al., 2005), или вовсе к деградации после убихитинирования (Sapkota et al., 2007). При нормальном эмбриогенезе фосфорилирование Smad1 киназой *MAPK* является следствием действия тирозиновых киназ рецепторов факторов роста фибробластов *FGF* (Weaver et al., 2000) и рецепторов инсулиноподобных факторов роста *IGF* (Richard-Paillaillon et al., 2002). Это приводит к прерыванию сигнала *BMP* к формированию эпидермиса и в итоге дает свободу для развития нервной ткани и/или цементной железы. Введение м-РНК *IGF* в зародыш на стадии двух бластомеров приводило к индукции экспрессии гена *Xag* в эктодермальных эксплантах.

Формирование нервной ткани и цементной железы у зародыша *Xenopus* ограничивается помимо BMP действием белков семейства гликопротеинов *Wnt*. Одним из антагонистов *Wnt* служит белок *segrberus*, который может связывать и BMP4, и Xwnt8, способствует формированию цементной железы,

глаз и обонятельных плакоидов (Glinka et al., 1997; Piccolo et al., 1999) и завершает индукцию формирования головных структур зародыша (Bouwmeester et al., 1996; Kuroda et al., 2004). *Wnt*-регуляция осуществляется через ингибирование киназы 3 гликогенсинтазы *GSK3* (обзор Logan, Nusse, 2004). Было обнаружено, что Smad1/5/8 у позвоночных после первичного фосфорилирования *MAPK* может быть фосфорилирован *GSK3*, что существенно для работы *E3* убихитин-лигазы (Fuentealba et al., 2007). Таким образом, определенный промежуточный уровень BMP сигнала, необходимый для формирования цементной железы у зародышей *Xenopus*, обеспечивается тремя последовательными процессами фосфорилирования Smad1 — сначала рецепторами BMP, далее — *MAPK*, потом — *GSK3*. При этом лишь первое фосфорилирование способствует проведению сигнала, а последующие — его ограничению.

Ингибирующим развитие цементной железы действием обладает и ретиноевая кислота (Sive, Cheng, 1991; Sive, Bradley, 1996). Изучение мутации в гене ретиноидного рецептора позволило установить, что эндогенные ретиноиды отвечают за развитие задних структур зародыша и препятствуют расползанию клеток цементной железы далее к спине. Был выяснен механизм такого сдерживания. Роль репрессора выполняют сами рецепторы ретиноевой кислоты (Koide et al., 2001). Рецепторы связываются с ДНК и, если лиганда нет, то образуется некий комплекс, который деацетилюет гистоны. В результате происходит конденсация хроматина в этой области и репрессия транскрипции генов-мишеней. Если лиганд есть, то образуется комплекс коактиваторов, гистоны ацетилюются, их сродство к ДНК падает и транскрипция разрешается. Таким образом, если ретиноевая кислота свяжется со своими рецепторами, произойдет дерепрессия генов задних структур, а цементная железа редуцируется.

Индуктировать развитие цементной железы в эпидермисе зародыша можно 10 мМ раствором хлористого аммония (Picard, 1975a, b). Синтез эпидермального цитокератина и X-эпиплектина при этом угнетается (Jamrich, Sato, 1989; Massé et al., 2004). Показано также, что если эктодерма уже обработана индуктором нервной ткани 12-о-тетрадеканойл форбол-13-ацетатом (*TPA*), то в такой нейтральной ткани хлористый аммоний не сможет индуцировать развитие цементной железы. Однако из клеток цементной железы получить нервную ткань обработкой *TPA* возможно (Sotgia et al., 1998).

Так, на основании имеющихся в литературе данных, примерную схему индукции формирования цементной железы у зародышей *Xenopus laevis* можно представить следующим образом. Белки

BMP оказываются в области будущей цементной железы. Часть из них преодолевают линию обороны BMP-антагонистов в межклеточном пространстве и связываются со своими рецепторами. Комплекс BMP–рецептор фосфорилирует часть молекул белка *Smad1* по серину, обеспечивая его активацию. Часть молекул *Smad1* будет фосфорилирована MAP-киназой, затем фосфорилирована *GSK3*, убихитинирована и расщеплена, если этому не помешает WNT-сигналинг. Фосфорилированный по серину *Smad1* связывается с белками *Smad4*. Если не пойдёт дело к убихитинированию и расщеплению, то эти комплексы активируют промотор гена *Hox2*. Затем фактор транскрипции *HOTX2* активирует транскрипцию собственного гена, гена *Xagr2* и других генов цементной железы, если этому не помешают ретиновые рецепторы. При таком стечении обстоятельств может сформироваться цементная железа. Однако даже в этой грубой схеме должно быть место неким агентам обратной связи, “дозировать” активность модифицирующих ферментов и ретиноидных рецепторов, чтобы это не было случайным процессом.

#### ОТ АДГЕЗИИ ЦЕМЕНТНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К АДГЕЗИИ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Следует заметить, что интерес к изучению генов, экспрессирующихся в клетках цементной железы лягушки *Xenopus laevis*, не ограничивается областью эмбриологии бесхвостых амфибий. В заключении к своей работе исследователи генов *XAG* предсказали, что главной целью будущих экспериментов станет идентификация генов, родственных *XAG2*, у амниот и млекопитающих (Aberger et al., 1998). Действительно, в библиотеке к-ДНК, представляющих м-РНК, интенсивно экспрессирующихся в клетках злокачественных опухолей человека, обнаружена к-ДНК к м-РНК, которая экспрессируется в клетках карциномы груди, но не в клетках доброкачественной опухоли груди. Эта к-ДНК имеет кодирующую последовательность, идентичную таковой гена *anterior gradient 2 (AGR2)*, человеческого гомолога лягушачьего гена цементной железы (Liu et al., 2005). Экспрессирующий вектор, несущий этот ген, вводили в клетки доброкачественной неметастазирующей опухоли молочной железы крысы, а суспензию полученных клонов клеток переносили в молочную железу здорового животного. В результате образующиеся опухоли не отличались от контрольных по срокам развития. Однако у животных с перевитыми опухолями, несущими ген *AGR2*, обнаруживались метастазы в легких. Предполагается, что именно этот ген, кодирующий дисульфид изомеразу (Park S.-W. et al., 2009), обуславливает повышенную способность клеток к адге-

зии. Эти эксперименты впервые показали наличие связи продукта гена, экспрессирующегося при эмбриогенезе, с метастазированием *in vivo* (Liu et al., 2005).

Аналог этого же гена *Xenopus laevis* был найден в жабрах атлантической семги, страдающей амебидной болезнью жабр (Morrison, Nowak, 2008). Иммуногистохимический анализ срезов жабр показал, что продукт этого гена в большом количестве присутствует в клетках, образующих слизь, но не в самих слизевых гранулах. Авторы также обратили внимание на то, что в литературе описано много примеров непосредственной связи экспрессии этих генов со злокачественностью опухолей преимущественно эпителиального или железистого происхождения.

При изучении эпителия так называемого “пищевода Барретта” (следствия гастроэзофагальной рефлюксной болезни) оказалось, что у больных часть клеток плоского эпителия нижнего отдела пищевода замещается клетками цилиндрического секреторного эпителия желудка или клетками всасывающего эпителия тонких кишок. В первом случае слизь, выделяемая новыми клетками желудка, защищает пищевод от забрасываемой из желудка кислоты, а во втором — клетки тонкого кишечника образуют аденокарциномы. И в том, и другом случае состояние больного считается предраковым. Было подтверждено, что в случае замещения плоскоклеточного эпителия пищевода клетками цилиндрического эпителия в результате рефлюксной болезни только в клетках “пищевода Барретта” экспрессируется ген *AGR2* (Groome et al., 2008). Авторы предложили использовать этот ген в качестве маркера заболевания.

Белок *AGR2* был обнаружен в среде инкубации клеток рака поджелудочной железы (Ramachandran et al., 2008). Недавно была выявлена роль гиперэкспрессии белка *AGR 2* в развитии метастазирующего рака простаты (Zhang et al., 2005; Zhung et al., 2010). В обоих случаях гиперэкспрессия этого белка была ассоциирована с повышением выживаемости, подвижности и инвазивности раковых клеток и понижением чувствительности к химиопрепарату гемцитабину (в случае рака поджелудочной железы). Механизм этого явления пока точно не установлен, однако показано, что этот белок, возможно, инактивирует супрессор опухоли белок p53, препятствуя его фосфорилированию (Pohler et al., 2004). Можно также предположить, что этот секретируемый белок неким образом модифицирует окружение или оболочки раковых клеток, делая их не узнаваемыми для иммунной системы организма. Было предложено использовать этот белок как маркер клеток метастазирующих опухолей в периферической крови у людей (Smirnov et al., 2005).

**Таблица 2.** Гомологи гена *Xag2 Xenopus laevis* (база данных NCBI)

| Название белка                      | Название гена                                             | Организм                                                                              | Длина (АК) |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Anterior gradient protein 1         | <i>ag1 (ag)</i>                                           | <i>Xenopus laevis</i><br>(африканская шпорцевая лягушка)                              | 183        |
| Anterior gradient protein 1         | <i>ag1</i>                                                | <i>Xenopus tropicalis</i> (западная шпорцевая лягушка) ( <i>Silurana tropicalis</i> ) | 187        |
| Anterior gradient protein 2         | <i>ag2 (np77)</i>                                         | <i>Xenopus laevis</i>                                                                 | 185        |
| Anterior gradient protein 2         | <i>agr2 (TNeu048m19.1)</i>                                | <i>Xenopus tropicalis</i> ( <i>Silurana tropicalis</i> )                              | 164        |
| Anterior gradient protein 2 homolog | <i>agr2 (si:ch211-201m19.5) (wu:ff29g05) (zgc:112187)</i> | <i>Danio rerio</i> (данио) ( <i>Brachydanio rerio</i> )                               | 171        |
| Anterior gradient protein 2 homolog | <i>AGR2 (AG2) (UNQ515/PRO1030)</i>                        | <i>Homo sapiens</i> (человек)                                                         | 175        |
| Anterior gradient protein 2 homolog | <i>Agr2 (Gob4)</i>                                        | <i>Mus musculus</i> (мышь)                                                            | 175        |
| Anterior gradient protein 2 homolog | <i>AGR2</i>                                               | <i>Pongo abelii</i> (суматранский орангутан)                                          | 175        |
| anterior gradient homolog           | <i>AGR2</i>                                               | <i>Bos taurus</i> (дикий бык)                                                         | 175        |
| anterior gradient homolog 2         | <i>AGR2</i>                                               | <i>Canis lupus familiaris</i> (собака домашняя)                                       | 175        |
| anterior gradient homolog 2         | <i>Agr2</i>                                               | <i>Rattus norvegicus</i> (серая крыса)                                                | 175        |
| anterior gradient homolog 2         | <i>AGR2</i>                                               | <i>Gallus gallus</i> (индийский петух)                                                | 172        |
| Anterior gradient protein 2-A       | <i>agr2-A (agr2)</i>                                      | <i>Xenopus laevis</i>                                                                 | 159        |
| Anterior gradient protein 2-B       | <i>agr2-B (agr2)</i>                                      | <i>Xenopus laevis</i>                                                                 | 164        |
| Anterior gradient protein 3         | <i>agr3</i>                                               | <i>Xenopus tropicalis</i> ( <i>Silurana tropicalis</i> )                              | 164        |
| Anterior gradient protein 3 homolog | <i>AGR3 (BCMP11) (UNQ642/PRO1272)</i>                     | <i>Homo sapiens</i>                                                                   | 166        |
| Anterior gradient protein 3 homolog | <i>Agr3</i>                                               | <i>Mus musculus</i>                                                                   | 165        |

Гомологи гена *Xag2 Xenopus laevis*, идентифицированные и у некоторых других организмов, представлены в таблице 2.

Работа поддержана грантом РФФИ 09-04-00276.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Десницкий А.Г. Эволюционные преобразования онтогенеза у бесхвостых амфибий // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 3. С. 165–170.
- Abe N., Ohzu E. Differentiation of Hatching Gland Cells in the from Anuran Embryos treated by LiCl // Proc. Japan Acad. 1987. V. 63. № 7. Ser. B. P. 261–264.
- Aberger F., Weidinger G., Grunz H. et al. Anterior specification of embryonic ectoderm: the role of the *Xenopus* cement gland-specific gene *XAG-2* // Mech. Dev. 1998. V. 72. №. 1–2. P. 115–130.
- Ahmad N. Temporal and spatial expression pattern of four laminin Alpha chains in *Xenopus laevis* // J Biol Sci. 2009. V. 9. № 2. P. 128–136.
- Baggs J.E., Green C.B. Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina: a mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA // Curr. Biol. 2003. V. 13. № 3. P. 189–198.
- Baldessari D., Shin Y., Krebs O. et al. Global gene expression profiling and cluster analysis in *Xenopus laevis* // Mech. Dev. 2005. V. 122. № 3. P. 441–475.
- Blitz I., Cho K. Anterior neurectoderm is progressively induced during gastrulation: the role of the *Xenopus* homeobox gene orthodenticle // Development 1995. V. 121. P. 993–1004.
- Boothby K.M., Roberts A. The stopping response of *Xenopus laevis* embryos: behaviour, development and physiology // J. Comp. Physiol. 1992a. V. 170. № 2. P. 171–180.
- Boothby K.M., Roberts A. The stopping response of *Xenopus laevis* embryos: pharmacology and intracellular physiology of rhythmic spinal neurones and hindbrain neurones // J. Exp. Biol. 1992b. V. 169. P. 55–86.
- Borchers A.G., Hufton A.L., Eldridge A.G. et al. The E3 ubiquitin ligase GREUL1 anteriorizes ectoderm during *Xenopus* development // Dev. Biol. 2002. V. 251. № 2. P. 395–408.
- Bouwmeester T., Kim S., Sasai Y. et al. Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer // Nature. 1996. V. 382. P. 595–601.
- Chang W., KhosrowShahian F., Chang R. et al. xPitx1 plays a role in specifying cement gland and head during early *Xenopus* development // Genesis. 2001. V. 29. № 2. P. 78–90.
- Charnas L.R., Szaro B.G., Gainer H. Identification and developmental expression of a novel low molecular weight neuronal intermediate filament protein expressed in *Xenopus laevis* // J. Neurosci. 1992. V. 12. P. 3010–3024.

- Cohen S., Jürgens G. Mediation of *Drosophila* head development by *gap*-like segmentation genes // *Nature*. 1990. V. 346. P. 482–485.
- Curran K.L., LaRue S., Bronson B. et al. Circadian genes are expressed during early development in *Xenopus laevis* // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 7. P. e2749.
- Dale L., Jones M.C. BMP signalling in early *Xenopus* development // *BioEssays* 1999. V. 21. P. 751–760.
- Davies S.N., Kitson D.L., Roberts A. The development of the peripheral trigeminal innervation in *Xenopus* embryos // *J. Embryol. Exp. Morph.* 1982. V. 70. P. 215–224.
- De Robertis E.M. Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 7. № 4. P. 296–302.
- De Robertis E.M., Kuroda H. Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos // *Annu Rev. Cell. Dev. Biol.* 2004. V. 20. P. 285–308.
- Devader C., Webb R.J., Thomas G.M. et al. *Xenopus* apyrase (Xapy), a secreted nucleotidase that is expressed during early development // *Gene*. 2006. V. 15. № 367. P. 135–141.
- Dickinson A., Sive H. Positioning the extreme anterior in *Xenopus*: Cement gland, primary mouth and anterior pituitary // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2007. V. 18. № 4. P. 525–533.
- Dröin A. The developmental mutants of *Xenopus* // *Int. J. Dev. Biol.* 1992. V. 36. № 4. P. 455–64.
- Drysdale T., Elinson R. Cell migration and induction in the development of the surface ectodermal pattern of the *Xenopus laevis* tadpole // *Dev. Growth Differ.* 1992. V. 34. P. 53–59.
- Dupont S., Zacchigna L., Cordenonsi M. et al. Germ-layer specification and control of cell growth by Ectoderm, a Smad4 ubiquitin ligase // *Cell*. 2005. V. 121. P. 87–99.
- Dupont S., Mamidi A., Cordenonsi M. et al. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFβ signaling, controls Smad4 monoubiquitination // *Cell*. 2009. V. 136. № 1. P. 123–135.
- Durston A., Timmermans J., Jage W. et al. Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system // *Nature*. 1989. V. 340. P. 140–144.
- Fagotto F., Gumbiner B.M. gb-cutenin localization during *Xenopus* embryogenesis: Accumulation at tissue and somite boundaries // *Development*. 1994. V. 120. P. 3667–3679.
- Fang H., Elinson R.P. Evolutionary Alteration in anterior patterning: *otx2* expression in the direct developing frog *Eleutherodactylus coqui* // *Dev. Biol.* 1999. V. 205. P. 233–239.
- Finkelstein R., Perrimon N. The orthodenticle gene is regulated by bicoid and torso and specifies *Drosophila* head development // *Nature*. 1990. V. 346. P. 485–488.
- Fuentealba L.C., Eivers E., Ikeda A. et al. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal // *Cell*. 2007. V. 131. № 5. P. 980–993.
- Fujita N., Nagata S. Contactin 1 knockdown in the hindbrain induces abnormal development of the trigeminal sensory nerve in *Xenopus* embryos // *Dev. Genes Evol.* 2007. V. 217. № 10. P. 709–713.
- Gammill L.S., Sive H. Coincidence of *otx2* and BMP4 signaling correlates with *Xenopus* cement gland formation // *Mech. Dev.* 2000. V. 92. № 2. P. 217–226.
- Gammill L.S., Sive H. Identification of *otx2* target genes and restrictions in ectodermal competence during *Xenopus* cement gland formation // *Development*. 1997. V. 124. P. 471–481.
- Glinka A., Wu W., Onichtchouk D. et al. Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus* // *Nature*. 1997. V. 389. P. 517–519.
- Groome M., Lindsay J., Ross P.E. et al. Use of oesophageal stress response proteins as potential biomarkers in the screening for Barretts oesophagus // 2008. V. 20. № 10. P. 961–965.
- Grunz H., Tacke L. Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed re-aggregation without inducer // *Cell Differ. Dev.* 1989. V. 28. P. 211–217.
- Harrison R.G. The development of the balancer in amblystoma, studied by the method of transplantation and in relation to the connective tissue problem // *J. Exp. Zool.* 1925. V. 41. P. 349–427.
- Hartenstein V. Early neurogenesis in *Xenopus*: The spatiotemporal pattern of proliferation and cell lineages in the embryonic spinal cord // *Neuron*. 1989. V. 3. P. 399–411.
- Hemmati-Brivanlou A., Frank D., Bolce M. et al. Localization of specific mRNAs in *Xenopus* embryos by whole-mount in situ hybridization // *Development*. 1990. V. 110. P. 325–330.
- Hemmati-Brivanlou A. and Melton D. Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise // *Cell*. 1997. V. 88. P. 13–17.
- Hollemann T., Pieler T. *Xpitx-1*: a homeobox gene expressed during pituitary and cement gland formation of *Xenopus* embryos // *Mechanisms of Development*. 1999. V. 88. P. 249–252.
- Huang J.K., Dorey K., Ishibashi S. et al. BDNF promotes target innervation of *Xenopus* mandibular trigeminal axons *in vivo* // *BMC Dev. Biol.* 2007. V. 7. P. 59.
- Jamrich M., Sato S. Differential gene expression in the anterior neural plate during gastrulation of *Xenopus laevis* // *Development*. 1989. V. 105. P. 779–786.
- Iijima R., Kunieda T., Yamaguchi S. et al. The extracellular adenosine deaminase growth factor, ADGF/CECR1, plays a role in *Xenopus* embryogenesis via the adenosine/P1 receptor // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 4. P. 2255–2264.
- Izz L., Attisano L. Ubiquitin-dependent regulation of TGFβ signaling in cancer // *Neoplasia*. 2006. V. 8. P. 677–678.
- Kawakami S., Kashiwagi K., Furuno N. et al. Effects of hypergravity environments on amphibian development, gene expression and apoptosis // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2006. V. 145. № 1. P. 65–72.
- Koide T., Downes M., Chandraratna R.A. et al. Active repression of RAR signaling is required for head formation // *Genes Dev.* 2001. V. 15. № 16. P. 2111–2112.
- Kolm P., Sive H. Efficient hormone-inducible protein function in *Xenopus laevis* // *Dev. Biol.* 1995. V. 171. P. 267–272.

- Kuroda H., Fuentealba L., Ikeda A. et al. Default neural induction: neuralization of dissociated *Xenopus* cells is mediated by Ras/MAPK activation // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 1022–1027.
- Kuroda H., Wessely O., De Robertis E.M. Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin,  $\beta$ -Catenin and Cerberus // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. P. 625–634.
- Kuzawa K., Yukita A., Hayata T. et al. *Xenopus* glucose transporter 1 (xGLUT1) is required for gastrulation movement in *Xenopus laevis* // *Int. J. Dev. Biol.* 2007. V. 51. P. 183–190.
- LaFlamme S.E., Dawid I.B. Differential keratin gene expression during the differentiation of the cement gland of *Xenopus laevis* // *Dev. Biol.* 1990. V. 137. P. 414–418.
- Lambert T.D., Howard J., Plant A. et al. Mechanisms and significance of reduced activity and responsiveness in resting frog tadpoles // *J. Exp. Biol.* 2004. V. 207. № 7. P. 1113–1125.
- Lamonerie T., Tremblay J.J., Lanctôt C. et al. Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene // *Genes Dev.* 1996. V. 10. P. 1284–1295.
- Liu F., Hata A., Baker J.C. et al. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator // *Nature.* 1996. V. 381. № 6583. P. 620–623.
- Liu D., Rudland P.S., Sibson D.R. et al. Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 9. P. 3796–3805.
- Logan C.Y., Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease // *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004. V. 20. P. 781–810.
- Lunardi A., Vignali R. *Xenopus Xotx2* and *Drosophila otd* share similar activities in anterior patterning of the frog embryo // *Dev. Genes Evol.* 2006. V. 216. № 9. P. 511–521.
- Lyerla T.A., Pelizzari J.J. Histological development of the cement gland in *Xenopus laevis*: A light microscopic study // *J. Morphol.* 1973. V. 141. P. 491–502.
- Lyerla T.A. In vitro regression of cement gland epithelium from *Xenopus laevis* // *J. Exp. Zool.* 1975. V. 193. № 3. P. 399–405.
- Maeno M., Xue Y., Wood T.I. et al. Cloning and expression of cDNA encoding *Xenopus laevis* bone morphogenic protein-1 during early embryonic development // *Gene.* 1993. V. 134. P. 257–261.
- Massé K., Baldwin R., Barnett M.W. et al. X-epilectin: a novel epidermal fucoselectin regulated by BMP signaling // *Int. J. Dev. Biol.* 2004. V. 48. № 10. P. 1119–1129.
- Michiue T., Danno H., Tanibe M. et al. *Xenopus* galectin-VIa shows highly specific expression in cement glands and is regulated by canonical Wnt signaling // *Gene Expr. Patterns.* 2007. V. 7. № 8. P. 852–857.
- Morrison R.N., Nowak B.F. Immunohistochemical detection of anterior gradient-2 in the gills of amoebic gill disease-affected Atlantic salmon, *Salmo salar* L. // *J. Fish Dis.* 2008. V. 31. V. 9. P. 699–705.
- Nieuwkoop P.D., Faber J. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. Amsterdam. North Holland Publishing Company, 1967. 252 P.
- Nijman S.M., Luna-Vargas M.P., Velds A. et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes // *Cell.* 2005. V. 123. № 5. P. 773–786.
- Nokhbatolfoghahai M., Downie J.R. Larval cement gland of frogs: comparative development and morphology // *J. Morphol.* 2005. V. 263. № 3. P. 270–283.
- Olson W.M., Wiens D.J., Gaul T.L. et al. *Xenopus* development from late gastrulation to feeding tadpole in simulated microgravity // *Int. J. Dev. Biol.* 2010. V. 54. P. 167–174.
- Pannese M., Polo C., Andreazzoli M. et al. The *Xenopus* homologue of Otx2 is a maternal homeobox gene that demarcates and specifies anterior body regions // *Development.* 1995. V. 121. P. 707–720.
- Park B.Y., Hong C.S., Sohail F.A. et al. Developmental expression and regulation of the chemokine CXCL14 in *Xenopus* // *Int. J. Dev. Biol.* 2009. V. 53. № 4. P. 535–540.
- Park S.-W., Zhen G., Verhaeghe C. et al. The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus // *PNAS.* 2009. V. 106. № 17. P. 6950–6955.
- Parlier D., Ariza A., Christulia F. et al. *Xenopus* zinc finger transcription factor IA1 (Insm1) expression marks anteroventral noradrenergic neuron progenitors in *Xenopus* embryos // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. № 8. P. 2147–2157.
- Pennati R., Bolzern A.M., Gropelli S. et al. The adhesive organs of anura: a histological and molecular study // *Ital. J. Zool.* 2000. V. 67. № 1. P. 1–8.
- Perez-Vilar J., Hill R.L. The structure and assembly of secreted mucins // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 45. P. 31751–31754.
- Perez-Vilar J., Mabolo R. Gel-forming mucins. Notions from *in vitro* studies // *Histol. Histopathol.* 2007. V. 22. № 4. P. 455–464.
- Picard J.J. *Xenopus laevis* cement gland as an experimental model for embryonic differentiation. I // *J. Embryol. Exp. Morph.* 1975a. V. 33. P. 957–967.
- Picard J.J. *Xenopus laevis* cement gland as an experimental model for embryonic differentiation. II // *J. Embryol. Exp. Morph.* 1975b. V. 33. P. 969–978.
- Piccolo S., Agius E., Leyns L. et al. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP, and Wnt signals // *Nature.* 1999. V. 397. P. 707–710.
- Pohler E., Craig A.L., Cotton J. et al. The Barrett's antigen anterior gradient-2 silences the p53 transcriptional response to DNA damage // *Mol. Cell Proteomics.* 2004. V. 3. P. 534–547.
- Poulin G., Lebel M., Chamberland M. et al. Specific protein-protein interaction between basic helix-loop-helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. № 13. P. 4826–4837.
- Ramachandran V., Arumugam T., Wang H. et al. Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 19. P. 7811–7818.
- Richard-Parpaillon L., Heligon C., Chesnel F. et al. The IGF pathway regulates head formation by inhibiting Wnt signaling in *Xenopus* // *Dev. Biol.* 2002. V. 244. № 2. P. 407–417.
- Roberts A., Blight A.R. Anatomy, physiology and behavioural role of sensory nerve endings in the cement gland of em-

- bryonic *Xenopus* // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1975. V. 192. № 1106. P. 111–127.
- Ryder J. Ventral suckers or sucking discs of the tadpoles of different genera of frogs and toads // Am. Nat. 1888. V. 22. P. 263–264.
- Sapkota G., Alarcón C., Spagnoli F.M. et al. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker // Mol. Cell. 2007. V. 25. № 3. P. 441–445.
- Sauka-Spengler T., Germot A., Shi D.L. et al. Expression patterns of an Otx2 and an Otx5 orthologue in the urodele *Pleurodeles waltl*: implications on the evolutionary relationships between the balancers and cement gland in amphibians // Dev. Genes Evol. 2002. V. 212. № 8. P. 380–387.
- Scharf S.R., Gerhart J.C. Axis determination in eggs of *Xenopus laevis*: a critical period before first cleavage, identified by common effects of cold, pressure and ultraviolet irradiation // Dev. Biol. 1983. V. 99. P. 75–87.
- Schmierer B., Hill C.S. TGF-beta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2007. V. 12. P. 970–982.
- Schweickert A., Deissler K., Blum M. et al. Pitx1 and Pitx2c are required for ectopic cement gland formation in *Xenopus laevis* // Genesis. 2001a. V. 30. № 3. P. 144–148.
- Schweickert A., Steinbeisser H., Blum M. Differential gene expression of *Xenopus* Pitx1, Pitx2b and Pitx2c during cement gland, stomodeum and pituitary development // Mech. Dev. 2001b. V. 107. № 1–2. P. 191–194.
- Simeone A., Avantsaggiato V., Moroni M. et al. Retinoic acid induces stage-specific anteroposterior transformation of rostral central nervous system // Mech. Dev. 1995. V. 51. P. 83–98.
- Sive H., Bradley L. A sticky problem: The *Xenopus* cement gland as a paradigm for anteroposterior patterning // Dev. Dyn. 1996. V. 205. P. 265–280.
- Sive H., Cheng P.F. Retinoic acid perturbs the expression of *Xhox.lab* genes and alters mesodermal determination in *Xenopus laevis* // Genes Dev. 1991. V. 5. № 8. P. 1321–1332.
- Sive H., Draper B., Harland R. et al. Identification of a retinoic acid-sensitive period during primary axis formation in *Xenopus laevis* // Genes Dev. 1990. V. 4. № 6. P. 932–942.
- Sive H., Hattori K., Weintraub H. Progressive determination during formation of the anteroposterior axis in *Xenopus laevis* // Cell. 1989. V. 58. P. 171–180.
- Smirnov D.A., Zweitzig D.R., Foulk B.W. et al. Global gene expression profiling of circulating tumor cells // Cancer Res. 2005. V. 65. № 12. P. 4993–4997.
- Sotgia C., Fascio U., Pennati R. et al. Regulation of ectodermal differentiation in *Xenopus laevis* animal caps treated with TPA and ammonium chloride // Dev. Growth Differ. 1998. V. 40. № 1. P. 75–84.
- Uehlinger V., Beauchemin M.L., Droin A. The behaviour of the egg pigment in wild-type and ‘rusty’ tadpoles of *Xenopus laevis* // J. Embryol. Exp. Morph. 1971. V. 26. № 3. P. 571–585.
- Van Evercooren A., Picard J.J. Surface changes during development and involution of the cement gland of *Xenopus laevis* // Cell Tissue Res. 1978. V. 194. P. 303–313.
- Vigetti D., Viola M., Gornati R. et al. Molecular cloning, genomic organization and developmental expression of the *Xenopus laevis* hyaluronan synthase 3 // Matrix Biol. 2003. V. 22. № 6. P. 511–517.
- Wardle F.C., Sive H.L. What’s your position? The *Xenopus* cement gland as a paradigm of regional specification // Bioessays. 2003. V. 25. № 7. P. 717–726.
- Wardle F.C., Wainstock D.H., Sive H.L. Cement gland-specific activation of the Xag1 promoter is regulated by co-operation of putative Ets and ATF/CREB transcription factors // Development. 2002. V. 129. P. 4387–4397.
- Weaver M., Dunn N.R., Hogan B.L. Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis // Development. 2000. V. 127. P. 2695–2704.
- Wilson P.A., Hemmati-Brivanlou A. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4 // Nature. 1995. V. 376. P. 331–333.
- Zhang J.S., Gong A., Cheville J.C. et al. AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer // Genes Chromosomes Cancer. 2005. V. 43. № 3. P. 249–259.
- Zhong Y., Ali T.Z., Zhou H. et al. Erb B3 binding protein 1 represses metastasis-promoting gene anterior gradient protein 2 in prostate cancer // Cancer Res. 2010. V. 70. № 1. P. 240–248.

## Cement Gland as the Adhesion Organ in *Xenopus laevis* Embryos

E. S. Pshennikova and A. S. Voronina

Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr., 33, Moscow, 119071 Russia

e-mail: pshennikova57@mail.ru

**Abstract**—The cement gland in batrachians is a temporal ectodermic organ which is necessary for an embryo’s attachment to the substrate. In this review, some notions about the origin of the cement gland of *Xenopus laevis* frogs, its functioning, genes being expressed in it, and regulation of its formation and development are provided. The role of some homologies of *agr* genes of the cement gland in *Xenopus laevis* is noted at different conditions of other animals and man.

**Keywords:** *Xenopus laevis*, cement gland, embryonic induction, regulation of gene expression

УДК 591

## КОЛИЧЕСТВЕННАЯ СВЯЗЬ ПОЧЕЧНОГО КРОВОТОКА С РАЗМЕРОМ И ПЛОТНОСТЬЮ КЛУБОЧКОВ В ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ КРЫС

© 2012 г. У. В. Шырапай<sup>1,2</sup>, В. М. Беличенко<sup>1</sup>, К. А. Шошенко<sup>1</sup>, Р. И. Айзман<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии СО РАМН, Новосибирск, Россия.

<sup>2</sup> Государственный педагогический университет, Новосибирск, Россия.

E-mail: shoshenko@physiol.ru

Поступила в редакцию 26.07.10 г.

Окончательный вариант получен 10.03.11 г.

Цель исследования – найти количественную взаимосвязь постнатальных изменений анатомической структуры клубочков и скорости кровотока в почках. Исследование проводилось на 4-, 12-, 30- и 65-суточных крысах Вистар. У них посмертно измеряли диаметры клубочка (Дкл, мкм), афферентной и эфферентной артериол (Даф и Дэф), плотность клубочков (Нкл, мм<sup>-3</sup>) и рассчитывали объем одного клубочка ( $V_{кл}$ , мкм<sup>3</sup>), всех клубочков ( $\Sigma V_{кл}$ , мм<sup>3</sup>/см<sup>3</sup>) и просветы афферентной и эфферентной артериол (Саф, Сэф, мкм<sup>2</sup>). Объемная скорость кровотока (ОСК) в почке, отнесенная к единице ее массы (Мп, мг), определялась лазер–Допплер флоуметром в перфузионных единицах (пф. ед.) у наркотизированных нембуталом крыс. Для оценки взаимосвязи названных параметров находили их аллометрическую зависимость.

В период постнатального роста морфологические параметры клубочков изменяются согласно уравнениям:  $D_{кл} = 7.1 \cdot M_{п}^{0.41}$ ,  $V_{кл} = 187 \cdot M_{п}^{1.23}$ ,  $N_{кл} = 5309 \cdot M_{п}^{-0.63}$  (Мп одной почки),  $S_{аф} = 1.1 \cdot V_{кл}^{0.35}$ ,  $S_{эф} = 6.3 \cdot V_{кл}^{0.14}$ . Почечная ОСК у 4-, 12- и 65-суточных крыс увеличивается согласно  $ОСК = 6.7 \cdot (\Sigma V_{кл})^{0.98}$ . ОСК, рассчитанная на единицу объема почечных клубочков, меняется с возрастом мало.

**Ключевые слова:** онтогенез, почка, клубочки, клубочковые артериолы, почечный кровоток, лазер–Допплер флоуметрия, крыса.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия получено значительное количество данных о постнатальных изменениях структурных параметров почечных клубочков и динамике кровотока в почке. Обзор этих данных (Шырапай и др., 2008) показал, что в постнатальном онтогенезе диаметр клубочка (Дкл) увеличивается, плотность их (Нкл) в коре и, соответственно, в почке падает, а общее количество клубочков меняется мало, сохраняясь, например, у лабораторных крыс около 60000 в обеих почках. Согласно этому обзору, объемная скорость кровотока (ОСК), рассчитанная на единицу массы почки, с возрастом – растет, при этом растет и общий поток крови через почки растет по мере увеличения их массы (Мп).

Как следует из обзора, достаточной полноты этих знаний о структуре клубочков и скорости кровотока через них в постнатальном онтогенезе не было. Практически полностью отсутствовали сведения о возрастном изменении просвета клубочковых артериол и соотношении его с размером самого клубочка. Поэтому авторы обзора на крысах провели собственные исследования онтогенетических изменений структуры клубочков и ско-

рости кровотока в них. В настоящей работе дается количественная оценка взаимосвязи этих изменений, тем более что подобной работы еще не проводилось.

### МЕТОДИКА

Методические подробности работы изложены ранее (Шырапай и др., 2008), и мы коротко дадим методическую характеристику ее. В опыте были 4-, 12-, 30- и 65-суточные крысы линии Вистар. Посмертная морфометрия проводилась на фиксированных в 5% формалине почках, сосуды которых после забоя животного через канюлю в брюшной аорте (у 4-суточных крыс в левом желудочке) заполнялись теплым водным раствором желатина (10%), окрашенного черной тушью при перфузионном давлении, соответствующем возрасту крыс. Измерения вели на микроскопах МБС-2 и МБИ-15 с увеличением до 14 мкм и 1.3 мкм, соответственно. Использовались срезы почки толщиной 40–150 мкм, приготовленные на замораживающем микротоме и помещенные в глицерин для увеличения их прозрачности.

**Таблица 1.** Параметры почечных клубочков у крыс разного возраста, по: (Шырапай и др., 2008)

| Возраст, масса тела | D клубочка, мкм ( $n_1$ ) | Число клубочков/ мм <sup>3</sup> |                 | D артериол, мкм ( $n_3$ )     |                              |
|---------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------|-------------------------------|------------------------------|
|                     |                           | кора                             | почка ( $n_2$ ) | аффер.                        | эффер.                       |
| 4 сут, 10 г         | 33 ± 1.1 (37)             | 868 ± 85                         | 447 ± 36 (17)   | 7.2 ± 0.4 (34)                | 5.8 ± 0.4 <sup>x</sup> (20)  |
| 12 сут, 20 г        | 43 ± 2.3* (19)            | 559 ± 71                         | 312 ± 35* (14)  | 7.5 ± 0.4 (19)                | 5.9 ± 0.3 <sup>x</sup> (17)  |
| 30 сут, 53 г        | 71 ± 2.0* (41)            | 281 ± 30                         | 191 ± 29* (19)  | 10 ± 0.2* (41)                | 6.7 ± 0.4* <sup>x</sup> (41) |
| 65 сут 253 г        | 120 ± 1.1* (90)           | 53 ± 2.9                         | 27 ± 1.7* (19)  | 13.4 ± 0.5* <sup>x</sup> (90) | 7.5 ± 0.4* <sup>x</sup> (90) |

Примечание.  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $n_3$  — количества измеренных клубочков, срезов, артериол. Приведено достоверное различие по сравнению с предыдущей возрастной группой крыс (\*) и между афферентной и эфферентной артериолами (x) при  $p \leq 0.05$ .

**Таблица 2.** Почечный кровоток у крыс разного возраста, по: (Шырапай и др., 2008)

| Возраст, сутки ( $n$ ) | Масса     |            |              | Кровоток, пф.ед. |
|------------------------|-----------|------------|--------------|------------------|
|                        | тела, г   | почек, мг  | почек, %     |                  |
| 4 (16)                 | 9 ± 0.3   | 94 ± 4     | 1.05 ± 0.03  | 22 ± 1.7         |
| 12 (14)                | 26 ± 1.4* | 298 ± 16*  | 1.14 ± 0.04  | 31 ± 1.7*        |
| 30 (10)                | 71 ± 3.6* | 689 ± 22*  | 0.99 ± 0.05* | 55 ± 1.6*        |
| 65 (14)                | 176 ± 56* | 1531 ± 48* | 0.87 ± 0.03* | 61 ± 2.2*        |

Примечание. Показано достоверное различие скоростей кровотока с группой более молодых крыс для  $p \leq 0.05$ .

Кровоток на поверхности правой почки измерялся у наркотизированных нембуталом животных (40–70 мг/кг массы тела), вводимым внутривенно. Во время опыта крысы находились в камере с температурой воздуха от 28° до 35° (у новорожденных) и влажностью, близкой к насыщению. Использовался лазер-Допплер флоуметр (ЛАКК-01, фирма “Лазма” Москва) и его базовый (кожный) датчик с внешним диаметром 3 мм. Прибор позволяет определить показатель микроциркуляции — произведение числа движущихся частиц (эритроцитов) на их скорость в определенном объеме ткани, и выражает полученные данные в перфузионных единицах (пф.ед.). Этот показатель микроциркуляции пропорционален ОСК в этом объеме ткани. Глубина проникновения лазерного луча в ткань — около 1 мм. Поэтому сравнительные исследования ОСК флоуметром корректно проводить там, где форма сосудистого русла существенно не меняется. Применительно к наружным корковым слоям почки разновозрастных крыс такое условие, в целом, выполняется.

Для анализа морфо-функциональных связей в растущей почке мы находили их аллометрическую (степенную) зависимость, которую широко применяют в онтогенетических исследованиях (Klingenberg, 1998; Tazawa et al., 2001; Беличенко и др., 2005). Она позволяет сопоставить скорости онтогенетических изменений структуры клубочков и кровотока в них. Построение аллометрических

уравнений и их графиков по средним значениям параметров для каждого возраста крысы (средняя арифметическая и ее ошибка), вычисления регрессионных коэффициентов  $a$ ,  $b$  и квадрата коэффициента корреляции ( $r^2$ ) проводили в пакете компьютерных программ Statgraphics 4.0 и Origin 6.1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные данные, которые будут использоваться в аллометрическом анализе, помещены в табл. 1 и 2. Они показывают, что по мере роста крысы средний Дкл увеличивается, их плотность  $N_{кл}/мм^3$  коры и всей почки падает, а D клубочковых артериол, особенно, афферентных, растет.

Линия 1 на рис. 1 показывает, что возрастные изменения Дкл и Мп происходят с разной скоростью: Дкл увеличивается более медленнее, чем растет Мп (показатель степени  $b = 0.41$ ). В период роста крыс от 4 сут до 65 сут Мп увеличилась в 16 раз, а Дкл — только в 3.5 раза. В тоже время объем клубочка ( $V_{кл}$ ) растет существенно быстрее, чем Мп:  $V_{кл} (мкм^3) = 187 \square Мп^{1.23}$ .

Известный факт — снижение плотности клубочков (линия 2 на рис. 1) описывает уравнение с  $b = -0.63$ , которое также показывает, что снижение  $N_{кл}$  происходит медленнее, чем растет масса почки. Так, в первый месяц жизни Мп увеличилась в

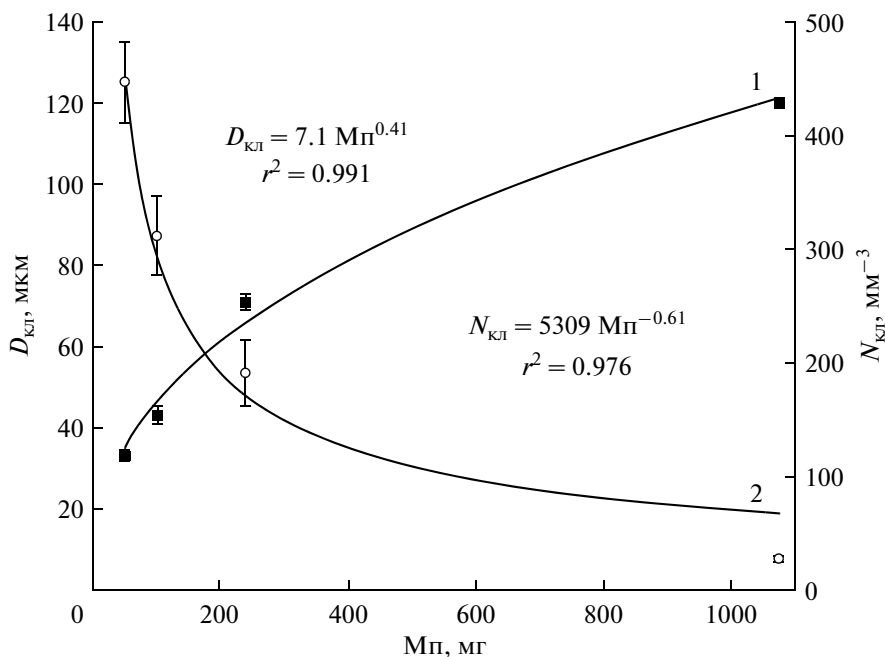


**Рис. 1.** Зависимость диаметра клубочков ( $D_{\text{кл}}$ , линия 1) и их плотности в почке ( $N_{\text{кл}}$ , линия 2) от массы одной почки ( $M_{\text{п}}$ ) во время постнатального роста крыс. Масса почек вычислялась из их относительной массы согласно табл. 2. Оси координат представлены в логарифмическом масштабе.

5 раз, масса коры в 6 раз (Шыырапай и др., 2008), а  $N_{\text{кл}}$  снизилась в коре в 3.1 раза, а во всей почке в 2.3 раза. Это означает, что общее число клубочков в почке в период роста увеличивается. Есть данные, что у крыс такое увеличение происходит в первые недели жизни, а в последующем — оно не меняется (Nyengaard, 1993). Действительно, в период роста от 30 до 65 сут., когда  $M_{\text{п}}$  увеличивается еще в 4 раза,  $N_{\text{кл}}$  падает в 7 раз. Заметим, что на рис. 1 опытная величина  $N_{\text{кл}}$  у 65-суточных крыс заметно меньше графической. Возможно, в более зрелом возрасте снижение плотности клубочков происходит быстрее.

Если объем одного клубочка растет быстрее, чем падает их плотность (сравните величины  $b$  для первого и второго параметров 1.23 и  $-0.63$ ), то суммарный объем клубочков в 1  $\text{мм}^3$  почки ( $\Sigma V_{\text{кл}}$ ) должен повышаться. В первый месяц жизни это явление очевидно, рис. 2. Но концу второго месяца жизни этот рост уже не проявляется из-за резкого падения  $N_{\text{кл}}$ , хотя средний объем одного клубочка продолжает увеличиваться.

В растущей почке  $\Sigma V_{\text{кл}}$  тесно связан с величиной ОСК. По данным на рис. 2 их связь для крыс в возрасте 4, 12 и 65 сут близка к пропорциональной,  $b = -0.98$  (линия 1). У месячных крыс, по сравнению с 65-суточными, величина  $\Sigma V_{\text{кл}}$  оказалось высокой. Возможно, в первый месяц жизни рост клубочков опережает возрастное увеличение почечного кровотока, что и показывает линия 2

(рис. 2), отражающая возрастную динамику этих показателей в этот период.

На крысах показано, что с возрастом, по мере увеличения размера клубочка, протяженность в нем капиллярного русла растет (Nyengaard, 1993). По-видимому, это явление обусловлено, в основном, увеличением числа капилляров в клубочке. Оно должно приводить к расширению просвета капиллярного русла и увеличению в нем потока крови. Поэтому не случайно, с увеличением объема клубочка просвет артериол, входящих и покидающих его, растет, рис. 3. Однако он увеличивается значительно медленнее, чем объем клубочка (в 48 раз:  $120^3/33^3$ ) и даже площадь его поперечного среза (в 13 раз:  $120^2/33^2$ ). Аллометрический коэффициент  $b$  в приводимых на рис. 3 уравнениях (0.35 и 0.14) отражает эту онтогенетическую динамику, одновременно показывая, что просвет афферентной артериолы с возрастом расширяется заметно больше, чем просвет эфферентной артериолы.

Для оценки реальных скоростей кровотока в клубочке и в ее артериолах у разновозрастных крыс мы приняли, что у зрелых крыс почечный кровоток равен 4  $\text{мл}/(\text{мин см}^3 \text{ почки})$ . Такую величину ОСК в почках (или близкую к ней) можно найти в обзорах (Corey, Spitzer, 1992; Lu et al., 1993; Шыырапай и др., 2008). В этом случае ОСК у 4-, 12- и 30-суточных крыс согласно табл. 2 должна равняться 1.4, 2.0 и 3.6  $\text{мл}/(\text{мин см}^3)$ . Используя эти

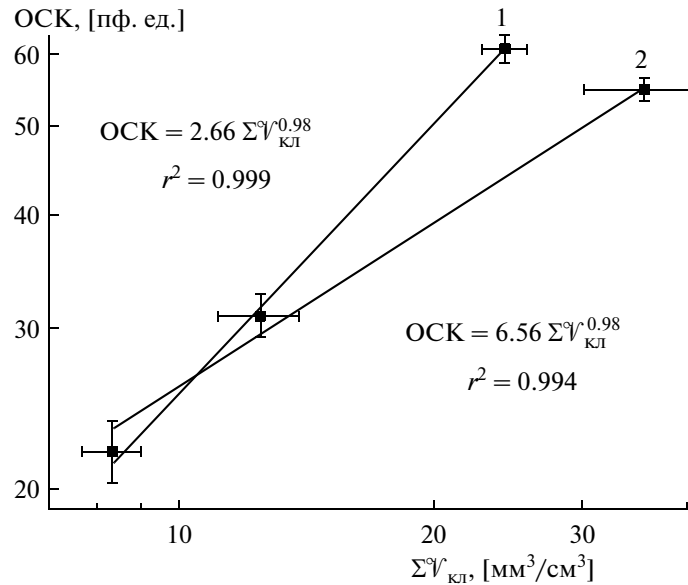


**Рис. 2.** Связь объемной скорости кровотока (ОСК) с суммарным объемом клубочков  $\Sigma V_{\text{кл}}$  в почках крыс во время их постнатального роста. Линия 1 показывает эту связь для 4-, 12- и 65-суточных крыс, линия 2 - для 4-, 12- и 30-суточных крыс. Оси координат представлены в логарифмическом масштабе.

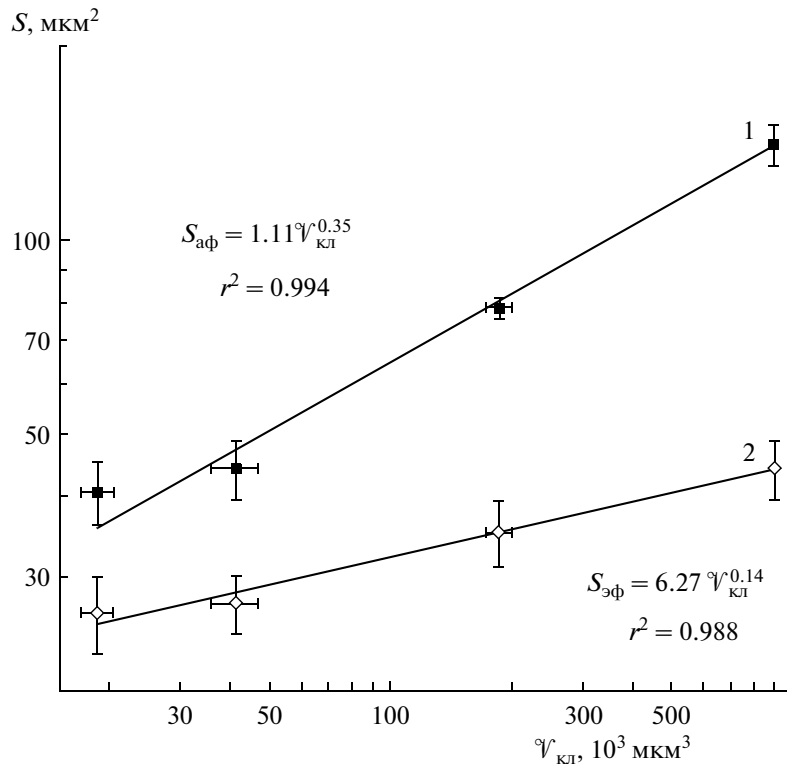


**Рис. 3.** Связь просвета (S) афферентной (1) и эфферентной (2) артериол с объемом клубочка ( $V_{\text{кл}}$ ) во время постнатального роста крыс. Оси координат представлены в логарифмическом масштабе.

величины и морфологические данные табл. 1, определим, как меняются в онтогенезе скорости кровотока — линейная ( $V$ ) в артериолах и объемная в клубочках (на 1  $\text{см}^3$  их объема).

Рис. 4 показывает, что  $V$  в артериолах с возрастом растет, особенно во второй месяц жизни и особенно в артериоле, выходящей из клубочка. В ней она может достичь 6  $\text{см/с}$ . Такая высокая скорость

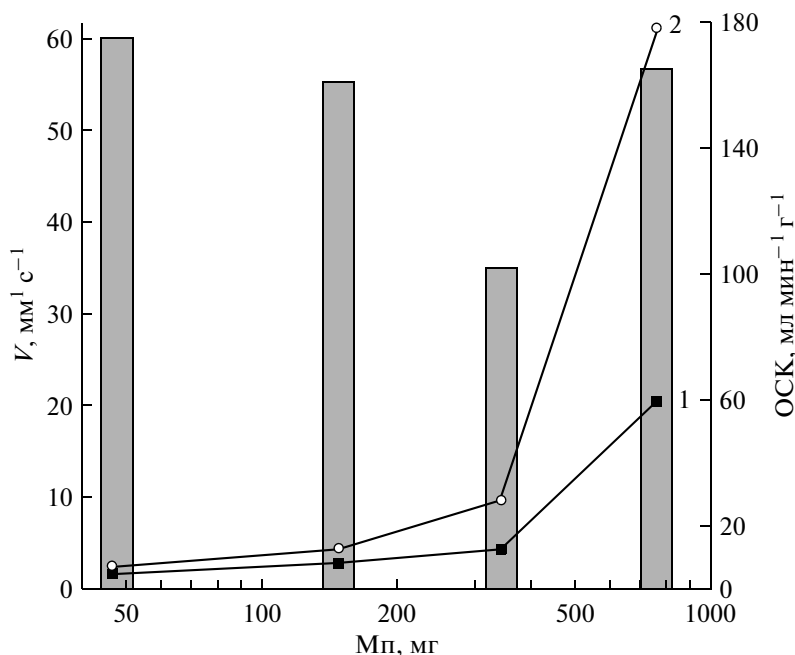


**Рис. 4.** Линейная скорость кровотока ( $V$ , шкала слева) в афферентной (1) и эфферентной (2) артериолах и объемная скорость кровотока (ОСК, столбики и шкала справа) в клубочках в зависимости от массы одной почки (Мп) во время постнатального роста крыс. Детали расчетов см. в тексте.

кровотока, в сочетании с повышенным гематокритом в вытекающей из клубочка крови после ее ультрафильтрации, должна приводить к резкому снижению гидростатического давления в начале постклубочкового русла, в котором происходит обратное всасывание в кровь интерстициальной жидкости. Следует заметить, что прижизненно, когда в артериолах присутствует мышечный тонус, величины  $V$  могут быть выше и несколько иные при сравнении афферентных и эфферентных артериол.

Интересно, что с возрастом ОСК в клубочках почти не меняется, сохраняясь в пределах 160–170 мл/(мин  $\text{см}^3$ ). Только у месячных крыс с их повышенной величиной  $\Sigma V_{\text{кл}}$  (рис. 2) она снижена. Возможно, феномен постоянства ОСК в одном и том же объеме клубочка отражает тесную связь потока крови через клубочек с численностью в нем однотипных капилляров и с их суммарным просветом. Это означает, что и линейная скорость кровотока в клубочковых капиллярах, как и время нахождения крови там могут сохраняться неизменными. Примерные расчеты подтверждают это предположение. Представим, что у всех крыс клубочковые капилляры имеют длину и диаметр, равными 100 мкм и 6 мкм, и они полностью занимают объем клубочка. Тогда у 4-, 12- и 65-суточных крыс число капилляров в 1  $\text{см}^3$  почки будет увеличиваться: 3,0, 4,6 и 8,6 ( $\times 10^6$ ). При заданной выше величине почечного ОСК (1,4, 2,0 и 4,0 мл  $\text{мин}^{-1} \text{см}^{-3}$ )  $V$  в

клубочковых капиллярах должна равняться у этих крыс близким величинам, мкм/с: 253, 256 и 274.

Таким образом, возрастное увеличение ОСК в почках тесно связано с увеличением суммарного объема почечных клубочков и, наверное, с ростом общего числа клубочковых капилляров. При этом ОСК в самом клубочке (отнесенная к единице его объема) меняется мало, что, возможно, обеспечивает неизменность линейной скорости кровотока в клубочковых капиллярах.

С возрастом просвет клубочковых артериол расширяется существенно меньше, чем увеличивается поток крови через клубочек, что отражает повышение сопротивления клубочкового русла. Наиболее выраженное возрастное отставание сосудистого просвета, наблюдаемое в эфферентных артериолах, должно приводить к большему снижению гидростатического давления в начале постклубочкового русла.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беличенко В.М., Коростышевская И.М., Максимов В.Ф., Шошенко К.А. Развитие митохондриального аппарата и кровоснабжения скелетных волокон кур в онтогенезе // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 2. С. 134–143.
- Шыырапай У.В., Беличенко В.М., Шошенко К.А., Айзман Р.И. Клубочковый аппарат и кровоток в почках крыс в постнатальном онтогенезе // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2008. Т. 94. № 4. С. 456–464.

- Corey H.E., Spitzer A. Renal blood flow and glomerular filtration rate during development. // *Pediatric Kidney*. Boston. Little Broun and company. 1992. V. 1. P. 49–77.
- Klingenberg Ch.P. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 1998. V. 73. № 1. P. 79–123.
- Lu S., Mattson D.L., Roman R.J., Becker C.G., Cowley A.W. Assessment of changes in intrarenal blood flow in conscious rats using laser-Doppler flowmetry // *Am J. Physiol.* 1993. V. 264. F956–F962.
- Nyengaard J.R. Number and dimensions of rat glomerular capillaries in normal development and after nephrectomy // *Kidney Int.* 1993. V. 43. P. 1049–1057.
- Tazawa H., Pearson J.T., Komoro T., Ar A. Allometric relationships between embryonic heart rate and fresh egg mass in birds // *J. Exp. Biol.* 2001. V. 204. № 1. P. 165–174.

## Quantitative Relationship of Renal Blood Flow with Size and Density of Glomeruli in Rat Postnatal Ontogenesis

U. V. Shyyrapai<sup>a,b</sup>, V. M. Belichenko<sup>a</sup>, K. A. Shoshenko<sup>a</sup>, and R. I. Aizman<sup>b</sup>

<sup>a</sup> State Research Institute of Physiology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia

e-mail: shoshenko@physiol.ru

<sup>b</sup> State Pedagogical University, Novosibirsk, Russia

**Abstract**—The aim of the study was to find the quantitative relationship of postnatal changes in the glomeruli anatomic structure with the blood flow in kidneys. Kidney development was studied in 4-, 12-, 30-, and 65-day-old Wistar rats. Diameters of glomerulus (Dgl,  $\mu\text{m}$ ), afferent and efferent arterioles (Daf and Def), and the glomeruli density (Ngl,  $\text{mm}^{-3}$ ) were measured posthumously. Volumes of one ( $V_{\text{gl}}$ ,  $\mu\text{m}^3$ ) and all glomeruli ( $\Sigma V_{\text{gl}}$ ,  $\text{mm}^3/\text{cm}^3$ ) and the glomeruli arterioles lumen (Saf and Sef,  $\mu\text{m}^2$ ) were calculated. The renal specific blood flow (SBF per unit of kidney weight, KW) was measured by the laser-Doppler flowmeter (in perfusion units, p.u.) under sodium barbamylnarcosis. We have found that, during postnatal growth, glomeruli morphological parameters vary according to the equations:  $D_{\text{gl}} = 7.1 \square KW^{0.41}$ ,  $V_{\text{gl}} = 187 \square KW^{1.23}$ ,  $N_{\text{gl}} = 5309 \square KW^{-0.63}$  (KW, mg and for one kidney),  $S_{\text{af}} = 1.1 \square V_{\text{gl}}^{0.35}$ , and  $S_{\text{ef}} = 6.3 \square V_{\text{gl}}^{0.14}$ . The renal SBF in 4-, 12-, and 65-day-old rats increases according to  $SBF = 6.7 \square (\Sigma V_{\text{gl}})^{0.98}$ . The renal SBF calculated per unit of glomeruli volume varies a little with age.

**Keywords:** ontogenesis, kidney, glomeruli, glomerular arterioles, laser-Doppler flowmetry, renal blood flow, rat

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ  
БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

УДК 591

МОРФОДИНАМИКА ПЛАСТИНКИ КОНТАКТА В ХОДЕ СОЗРЕВАНИЯ  
ООЦИТА У СЦИФОИДНОЙ МЕДУЗЫ *Aurelia aurita*  
(Cnidaria: Semaestomae)

© 2012 г. Л. С. Адонин<sup>1,2</sup>, О. И. Подгорная<sup>1,2</sup>, Т. Г. Шапошникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кафедра цитологии и гистологии Санкт-Петербургского государственного университета

<sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

E-mail: leo.adonin@gmail.com

Поступила в редакцию 09.04.2009 г.

Окончательный вариант получен 08.04.2011 г.

Структура, формирующаяся в области контакта ооцита с зачатковым эпителием при созревании ооцита сцифомедузы *Aurelia aurita*, названа пластинкой контакта. В представленной работе на светопрозрачном и ультраструктурном уровне прослежены последовательные этапы формирования пластинки контакта в процессе созревания ооцита. На начальных стадиях развития ооцита в его периферической цитоплазме отмечено появление гранул, которые скапливаются на полюсе, сохраняющем связь с зачатковым эпителием гонад. Среди этих гранул выявлены два типа — с гомогенным содержимым и рыхлым неоформленным материалом в виде толстых тяжей. Преобразование гранул 2 типа в более крупные структуры, а также объединение гранул 1 и 2 типов на поздних этапах развития ооцита, вероятно, и приводит к образованию видимой на парафиновых и полутонких срезах характерной структуры — пластинки контакта. Остается неясной точная локализация пластинки контакта в момент оплодотворения — внутри ооцита или вне его. Содержимое гранул и компоненты пластинки специфически связывают антитела (RA47) против мезоглеина, ZP-домен-содержащего белка мезоглея *A. aurita*. Пластинка контакта, покрывающая только анимальный полюс ооцита, но обнаруженная по наличию ZP-доменных белков, может оказаться простейшей среди яйцевых оболочек типа Zona Pellucida.

**Ключевые слова:** *Aurelia aurita*, внеклеточный матрикс, мезоглеин, ZP-домен-содержащие белки.

Принятые сокращения: ZP — zona pellucida; BSA — бычий сывороточный альбумин, BCIP — 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, NBT — nitro blue tetrazolium, PVDF — polyvinylidene difluoride, GAR-AP — антитела против IgG кролика, полученные в козе и конъюгированные со щелочной фосфатазой, GAR-FITC — антитела против IgG кролика, полученные в козе, конъюгированы с Fluorescein isothiocyanate, GAR-Rhodamin — антитела против IgG кролика, полученные в козе, конъюгированы с Rhodamin, EDTA — ethylenediaminetetraacetic acid, PBS — фосфатно-солевой буфер, PMSF — phenyl methyl sulfonyl fluoride.

## ВВЕДЕНИЕ

Представители типа Кишечнополостные (Cnidaria или Cniderata) — низшие многоклеточные животные, тело которых образовано двумя эпителиальными слоями (эпи- и гастродермой), между которыми расположена прослойка мезоглея (Chapman D., 1974; Harrison, Westfall, 1991). Степень развития мезоглея варьирует не только у представителей разных классов, но и на разных стадиях жизненного цикла. Мезоглея определяет форму тела животного. Она участвует в транспорте

и накоплении питательных веществ (Bouillon, Corrois, 1977; Weber, Schmid, 1985). Мезоглея сцифоидной медузы вида *Aurelia aurita* (класс Scyphozoa, отр. Semaestomae, сем. Ulmaridae) и многих других представителей классов Scyphozoa и Anthozoa заселена свободными подвижными клетками — мезоглеальными клетками (Chapman G., 1966). Наличие мезоглеальных клеток в мезоглее не универсально. У тех видов, у которых встречаются амёбOIDные мезоглеальные клетки, мезоглея приобретает гистологическое сходство с соединительными тканями высших животных (Заварзин, 1945; Chapman D., 1974).

Среди полипептидов мезоглея зрелых медуз *A. aurita*, определенных с помощью денатурирующего электрофореза по Лэммли, определяется несколько мажорных белков. Одним из них является белок с молекулярной массой 47 кДа — мезоглеин (Matveev et al., 2007). При помощи антител (RA47), полученных к мезоглеину, удалось определить его локализацию — в специфических гранулах мезоглеальных клеток и в составе “эластических” волокон межклеточного матрикса мезоглея зрелых медуз (Shaposhnikova et al., 2005). Вероятно, что мезоглеин синтезируется в виде белка-предшественника в мезоглеальных клетках, а затем подвергается

посттрансляционным модификациям и выводится в матрикс мезоглеи.

В составе мезоглеина выявлено два функциональных домена: ZP (Zona Pellucida) и DSL (Delta/Serrate/Lag-2). Наличие первого из них дало основание отнести белок к обширному суперсемейству ZP-домен-содержащих белков. В суперсемейство входят в основном внеклеточные белки. У представителей разных ветвей эволюционного древа в 2005 году описано около 700 белков, содержащих этот домен (Jovine et al., 2005), сейчас их количество приближается к 1000. Свое название семейство получило потому, что первыми описанными белками стали три гликопротеина Zona Pellucida плацентарных млекопитающих, отличительной особенностью которых был цистеин-богатый домен, локализованный на С-конце полипептида — ZP-домен (Wassarman et al., 1999).

ZP-домен-содержащие белки обнаружены как у высших многоклеточных (ZP1-3,  $\alpha$ - и  $\beta$ -тектонин, рецептор TGF- $\beta$  и многие другие), так и у представителей более низших в эволюционном плане животных (VERL у моллюска *H. rufescens*, белки дрозофилы NompA, Cuticlin-1 и др.) (Tarin and Cano, 2000). ZP-доменные белки характеризуются мозаичным строением, между сигнальным N-пептидом и ZP-доменом в их состав входят разные и в разных комбинациях структурно-функциональные домены (Jovine, 2005). При всем разнообразии биологических функций представителей семейства, в основном они являются структурными компонентами, и/или выполняют рецепторную функцию.

Большая часть описанных ZP-домен-содержащих белков вовлечена в процессы оплодотворения как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных (Tarin, Cano, 2000; Wassarman, 2009). Подобные белки у низших беспозвоночных животных (кишечнополостные, гребневики, губки) до работ нашей группы описаны не были. Мезоглеин оказался представителем семейства ZP-белков, поэтому мы предположили, что если ген мезоглеина является эволюционным приобретением *A. aurita*, то его ZP-домен может быть вовлечен и в процесс оплодотворения.

В аминокислотной последовательности мезоглеина ZP-домен занимает более половины всего белка (Matveev et al., 2007). Вероятно, что антитела поликлональной сыворотки RA47 распознают именно ZP-домен мезоглеина. На парафиновых срезах тканей гонад половозрелых самок *A. aurita* антитела выявляют материал в области контакта ооцитов с зачатковым эпителием. Для удобства описания структуре присвоено название пластинки контакта (Адонин и др., 2009). Морфология и динамика образования пластинки контакта нуждаются в описании, чему и посвящена настоящая работа.

Изучение формирования пластинки контакта затруднено тем, что оогенез у представителей класса Scyphozoa описан неполно. Первые работы по микроанатомическому строению тканей медуз относятся еще к 19—началу 20 вв.: Особенности строения гонад у разных видов сцифоидных медуз использовали для построения филогенетического древа (Haeckel, 1881; Claus, 1883; Maas, 1897; Vanhöffen, 1902 — цит. по Morandini et al., 2001). Известно, что ооциты сцифоидных медуз возникают из зачаткового эпителия, который выстилает стенки полового синуса (рис. 1), являющегося производным гастродермы (Иванова-Казас, 1975; Eckelbarger, Larson, 1988, 1992).

Мы выделили семь (I—VII) последовательных стадий в развитии ооцита, основываясь на работе Экельбаргера и Ларсона (1988) и собственных наблюдениях (Адонин и др., 2009). Основным критерий выделения стадий — диаметр ооцита (от 10 мкм на I стадии, до 170 мкм на последнем этапе созревания) и наличие специфических гранул (рис. 1). В настоящей работе мы исследовали морфологические особенности образования пластинки контакта в ходе формирования ооцита у сцифомедузы *A. aurita*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Сбор материала.** Объект исследования — половозрелые самки *Aurelia aurita* (класс Scyphozoa, отр. Semaestomae, сем. Ulmaridae) с диаметром зонтика 15 см и более. *A. aurita* — вид-космополит, но материал настоящей работы собран в популяции, обитающей в Чупинской губе Белого моря. Медуз собирали сачком с весельной лодки в окрестностях Беломорской биологической станции Картеш Зоологического института РАН.

Животных препарировали, отделяя гонады с помощью пинцета и скальпеля от эпидермы и гастродермы. Кусочки ткани для молекулярных исследований замораживались (–20°C) и дальнейшее исследование производилось в условиях стационарной лаборатории Биолого-почвенного факультета СПбГУ. Часть материала фиксировали для световой и электронной микроскопии (см. разделы Иммунофлюоресценция, Полутонкие срезы и Ультратонкие срезы).

**Полутонкие срезы.** Кусочки гонад самок *A. aurita* с прилегающей мезоглеей фиксировали в 2% растворе глутаральдегида на какодилатном буфере и дофиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub>. Фиксированный материал заливали в эпон по методике, предложенной производителем (Sigma, USA). Срезы толщиной 0.5 мкм изготавливали на ультратоме Leica EM UK6. Полученные срезы окрашивали 0.1% раствором кислого фуксина на 30% этаноле в течение 1–2 мин при постоянном подогреве (до 60°C), после чего краску смывали проточной ди-

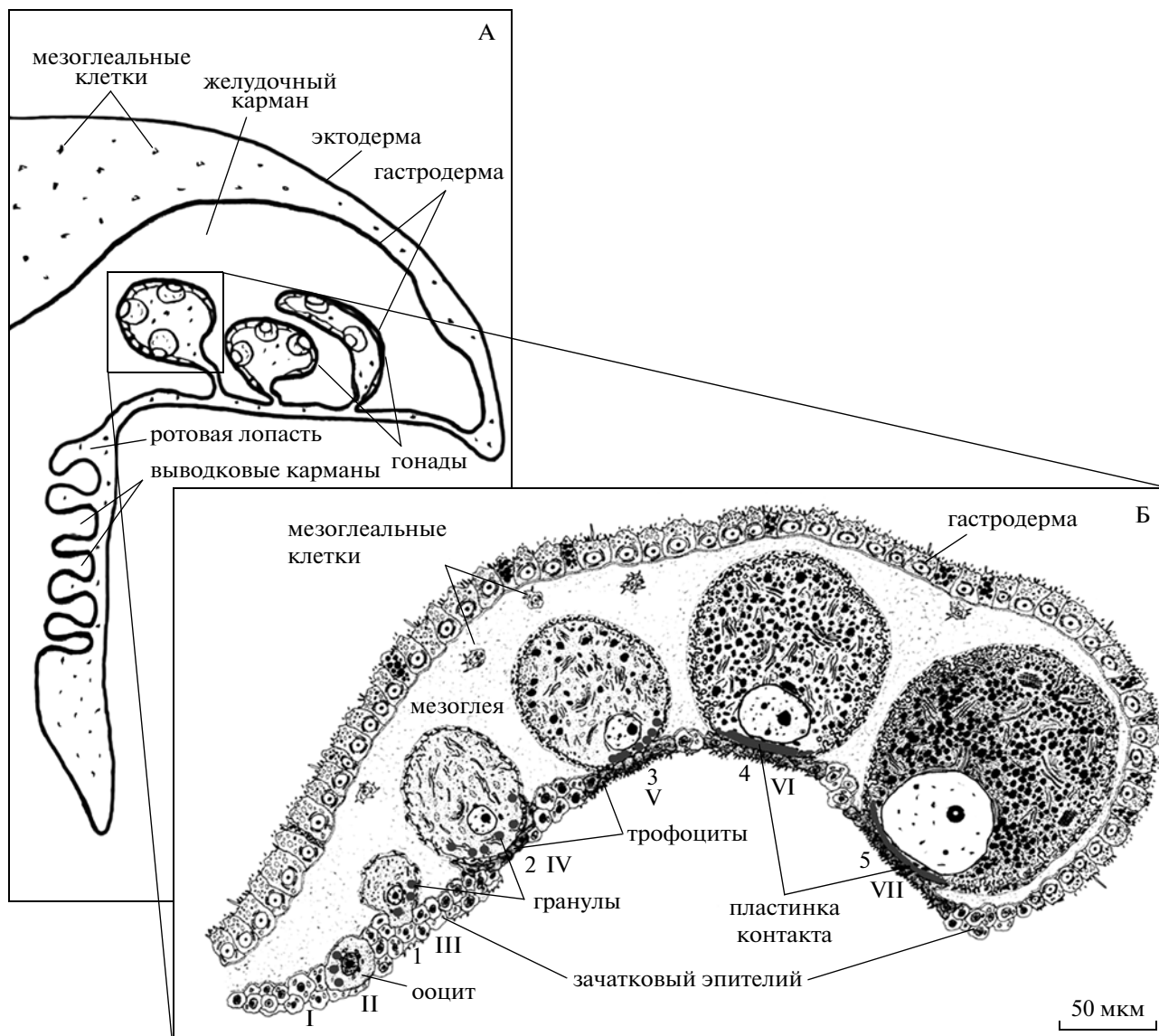


**Рис. 1.** Стадии развитие ооцита сцифоидной медузы *Aurelia aurita*. А — общая схема расположения гонады, продольный срез через тело медузы. Б — схема гонады (из Экельбаргера и Ларсона (Eckelbarger, Larson, 1988), с изменениями). 1–5 — стадии развития ооцита по Экельбаргеру и Ларсону; I–VII — стадии развития ооцита по Адонину и др. (2009).

стиллированной водой. Наблюдение и фотосъемку проводили на микроскопе Leica DM 6000B.

**Ультратонкие срезы.** Материал для приготовления ультратонких срезов фиксировали так же, как описано в разделе “Полутонкие срезы”. Заливка в эпоновые блоки производилась согласно методике производителя (Sigma, USA). Приготовление ультратонких срезов (65–70 нм толщиной) осуществлялось на ультратоме Leica EM UK6.

После переноса срезов на поддерживающие сеточки (West Chester, PA, USA), срезы контрастировали по следующей методике: насыщенный раствор уранилацетата (20–25 мин), после которого следовала отмывка под струей дистиллированной воды, 0.02 M NaOH (в течение 10 минут), раствор

цитрата свинца (25 мин при +4°C в темноте) после чего вновь раствор смывали под струей дистиллированной воды. Срезы высушивали. Наблюдение проводили на микроскопах: Libra 120, Leo 910 OMEGA.

**Иммунофлюоресценция.** Кусочки гонады с прилегающей мезоглеей фиксировали в растворе 4% параформальдегида на 0.1 M фосфатном буфере, тоничность подводили сахарозой и NaCl. Материал хранили в 70%-ом этаноле. Зафиксированный материал заливали в парафиновые блоки. Изготавливали серийные срезы толщиной 3–5 мкм при помощи санного микротомы Leica SM 2000 R. Перед окрашиванием срезы обеспарафинивали, переводя в водную среду по классической методике

(Пирс, 1962). После депарафинирования срезы споласкивали в дистиллированной воде и двух сменах TBS-Tween. Выявление антигенов производили по стандартной методике (Кэтти и др., 1991), инкубируя срезы с антителами RA47 в конечном разведении 1 : 4000. Получение и определение специфичности антител RA47 описано ранее (Shaposhnikova et al., 2005). Использовали вторые антитела, конъюгированные с FITC или Rhodamin (GAR-FITC, GAR-Rhodamin, Sigma). Все операции проводили при комнатной температуре (20°C). Окрашенные срезы заключали в глицерин и наблюдали под микроскопом Leica DM 6000B. В контроле вместо 1-х антител срезы инкубировали в растворе PBS-Tween, содержащем 5% лиофилизированного обезжиренного молока и 1.5% бычьего сывороточного альбумина.

Использованные реактивы и материалы: BSA, BCIP, NBT, Coomassie G-250, Epon, SDS, PVDF, GAR-AP, Tween, PMSF, EDTA (все — Sigma, USA); глицин, NaCl, сахараза (все — ICN, USA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На ультраструктурном уровне отмечают следующие особенности организации ооцита *A. aurita*: на начальных стадиях развития (I стадия, диаметр клетки 10 мкм) в центре клетки находится крупное прозрачное ядро, в котором выявляется одиночное плотное фибриллярное образование, определяемое нами как ядрышко. Хроматин диспергирован и равномерно распределяется по всему объему ядра. Вокруг ядра в периферической цитоплазме располагается большое количество митохондрий. Здесь же, в цитоплазме, отмечается появление немногочисленных гранул (рис. 2А, 2Б, I). Это округлые окруженные мембраной цитоплазматические пузырьки размером от 1.5 до 3 мкм.

На основании ультраструктурного анализа мы подразделяем эти гранулы на 2 типа. Гранулы 1 типа — округлые мембранные пузырьки диаметром от 1.5 до 3 мкм, заполненные электронно-плотным гомогенным содержимым. Гранулы 2 типа представляют собой сферические образования (диаметр 2—3 мкм), окруженные мембраной, внутри которых находится рыхлый неоформленный материал, формирующий толстые переплетающиеся тяжи (рис. 2Б). Численное соотношение гранул на I—II стадиях развития ооцита примерно одинаково.

Начиная с III стадии по мере увеличения объема ооцита происходит его выталкивание в прилежащую к зачатковому эпителию мезоглею, связь ооцита с герминативным эпителием сохраняется только на анимальном полюсе (рис. 2А, IV, V, VII). Клетки последнего, контактирующие с ооцитом, начинают уплощаться, а к финальным этапам формирования ооцита эпителий в этой области представлен слоем сильно уплощенных клеток

(рис. 2А, 2Б). В области контакта ооцита с зачатковым эпителием отмечается скопление цитоплазматических гранул обоих типов: гомогенные гранулы 1 типа и заполненные тяжами гранулы 2 типа. При этом в остальной цитоплазме данные гранулы отсутствуют. Ядро заполнено тонким фибриллярным содержимым, какие-либо ядерные структуры нами не были выявлены.

На IV стадии развития по мере роста ооцита (диаметр 30—40 мкм) объем ядра продолжает увеличиваться, оно еще больше смещается к анимальному полюсу. Здесь же выявляются гранулы 2-х типов, при этом общее количество гранул, декорирующих данную зону ядра, увеличивается, а их численное соотношение смещается в сторону гранул 1 типа (рис. 2Б, IV).

Диаметр ооцита к VII стадии увеличивается до 150—170 мкм, соответственно, диаметр ядра достигает 70 мкм (рис. 2А, VII). В центре ядра присутствует плотная фибриллярная структура, по нашему мнению являющаяся ядрышком. Ядро находится в непосредственной близости к анимальному полюсу клетки и заполнено электронно прозрачным содержимым. Количество специфических гранул, расположенных на анимальном полюсе ооцита, значительно увеличивается на завершающих стадиях роста, они заполняют практически все узкое пространство между ядром и цитоплазматической мембраной. При этом отмечается численное преобладание гранул 2 типа (рис. 2Б, VII) по сравнению с гранулами 1 типа. На последней стадии нами была прослежена динамика преобразования гранул 2 типа в более крупные структуры, достигающие в диаметре 5—8 мкм. Также было выявлено, что в этот период происходит слияние гранул 1 и 2 типов. А в некоторых участках цитоплазмы можно было наблюдать подготовку гранул к экзоцитозу (рис. 2Б, VII, стрелки).

Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание парафиновых срезов гонады *A. aurita* антителами RA47 показало, что в зоне контакта ооцита с зачатковым эпителием с антителами специфически взаимодействует материал тех гранул, которые заполняют пространство между ядром и плазматической мембраной ооцита и формируют в итоге пластинку контакта (рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Блестящая оболочка (Zona Pellucida), окружающая ооцит высших позвоночных (мыши, коровы, кролика) состоит из 3 гликопротеинов содержащих ZP-домен (Wassarman et al., 2001). Ооцит членика экспрессирует 4 ZP-доменных гликопротеина (ZPA, ZPB1, ZPB2 и ZPC), которые обнаруживаются в блестящей оболочке (Tarin, Cano, 2000). К настоящему моменту описано большое количество аналогов Zona Pellucida и у других животных: хорион костистых рыб, перивителлиновый слой

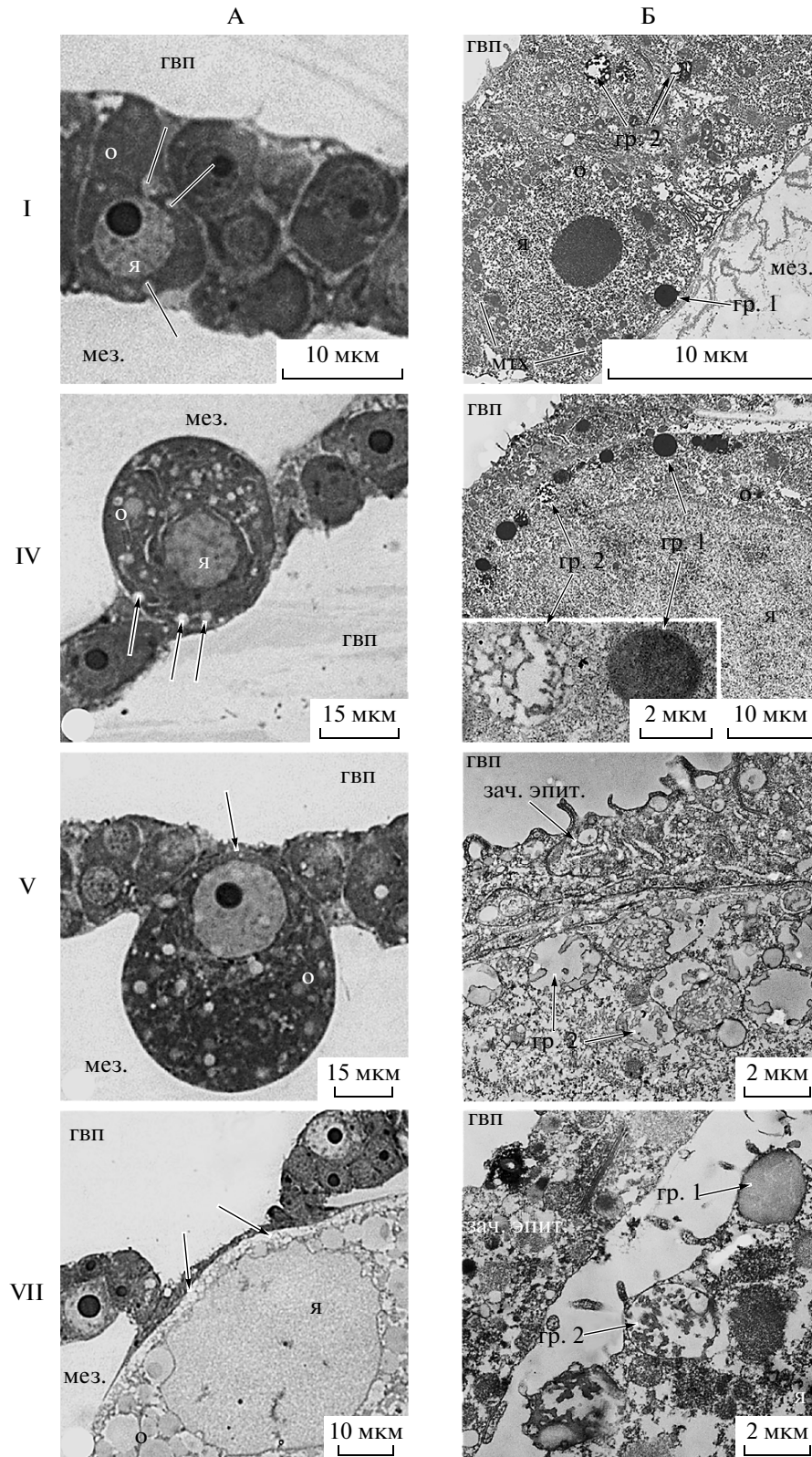


**Рис. 2.** Стадии развития ооцита сцифоидной медузы *Aurelia aurita* на светооптическом (А) и электронно-микроскопическом (Б) уровнях. I, IV, V и VII — стадии развития ооцита; Стрелками на полутонких (А) и ультратонких срезах (Б) указаны гранулы и формирующаяся пластинка в области контакта ооцита с зачатковым эпителием. гвп — гастроваскулярная полость; гр. 1 — гранулы 1 типа; гр. 2 — гранулы 2 типа; зач. эп. — зачатковый эпителий; мез. — мезоглея; мтх — митохондрии; о — ооцит; я — ядро ооцита.

птиц, *вителлиновая оболочка* и *Zona Radiata* амфибий, моллюсков и ракообразных, *вителлиновый слой* иглокожих, а также *вителлиновая мембрана* и *хорион* некоторых насекомых из отряда Diptera (Tarin, Cano, 2000). Основными компонентами всех перечисленных яйцевых оболочек являются ZP-доменные гликопротеины. Однако, до сих пор у низших многоклеточных животных, в частности кишечнополостных, подобные структуры или белки не были описаны.

Наличие пластинки контакта у *Aurelia aurita* вызывает ряд вопросов. Очевидно, что пластинка является именно пластинкой, а не покрывает весь ооцит в отличие от других типов яйцевых оболочек. По аналогии с данными о синтезе и формировании яйцевых оболочек (Wassarman, 2009, Tarin, Cano, 2000) можно полагать, что собственно пластинка является внеклеточной структурой, но синтез ее компонентов идет в цитоплазме ооцита. Об этом свидетельствует цитоплазматическая локализация гранул на ранних стадиях развития ооцита и подготовка гранул к экзоцитозу на последней стадии (рис. 2).

В области контакта ооцита с герминативным эпителием самок сцифомедузы *A. aurita* ранее описывали структуру, которую мы определяем как пластинку контакта (Eckelbarger, Larson, 1988). Авторы предполагали, что данная структура — это определенным образом организованный желток. Они описали клетки герминативного эпителия, находящиеся в месте прикрепления ооцита, названные “трофоцитами”. Согласно гипотезе авторов именно эти клетки являются источником желтка, поступающего в ооцит. Однако, по нашим наблюдениям, синтетический аппарат “трофоцитов” развит недостаточно для выполнения трофической функции. Подобные клетки ранее были названы “клетками-няньками” (Widersten, 1965). Но сделанное позже автораддиографическое исследование трофических функций “клеток-нянек” не подтвердило их участия в процессах передачи питательных веществ и желтка ооциту (Avian et al., 1987). Гистохимические данные с использованием дифференциального окрашивания свидетельствуют о том, что химический состав пластинки и гранул отличен от окружающего их желтка (Адонин и др., 2009). Отсутствие трофических функций у “клеток-нянек” также свидетельствует в пользу синтеза материала пластинки самим ооцитом.

Преобразование гранул 2 типа (укрупнение, вакуолизация), а также объединение гранул 1 и 2 типов, вероятно, и приводит к образованию видимой на парафиновых (Адонин и др., 2009) и полутонких срезах (рис. 2А, VII) структуры — пластинки контакта. Однако точная локализация пластинки контакта в момент оплодотворения (внутри ооцита или вне его) до сих пор остается неясной.

Сыворотка RA47 была получена против мезоглеина (Shaposhnikova et al., 2005), в аминокислот-

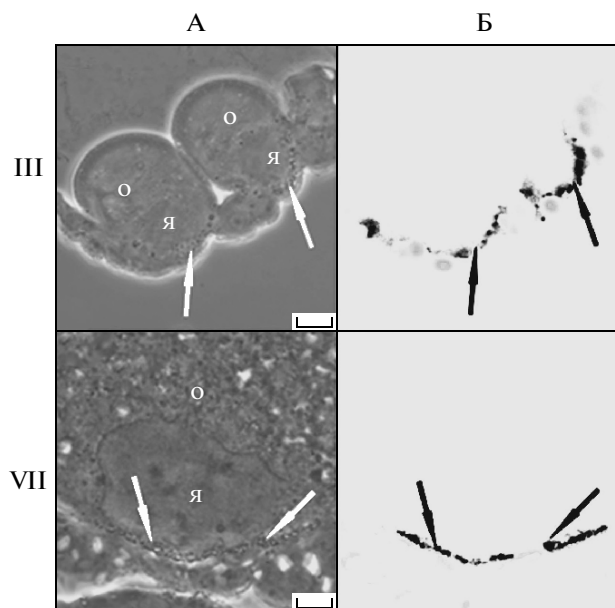


**Рис. 3.** Иммунофлуоресцентное окрашивание парафиновых срезов гонад самок сцифомедузы *Aurelia aurita* антителами к мезоглеину (RA47). А — фазовый контраст, Б — флуоресцентная микроскопия. III и VII — стадии развития ооцита; Стрелками указаны гранулы и формирующаяся пластинка в области контакта ооцита с зачатковым эпителием. о — ооцит; я — ядро ооцита.

ной последовательности которого обнаружен ZP-домен, составляющий более половины всего белка (Matveev et al., 2007). Весьма вероятно, что сыворотка содержит значительное количество антител именно против ZP-домена. Для проверки этого предположения был проведен частичный трипсинолиз мезоглеина с последующим разделением белковых фрагментов с помощью SDS-электрофореза по Лэмбли. Результаты иммуноблоттинга показывают, что антитела связывают протеолитический фрагмент с молекулярной массой около 30 кДа, что соответствует расчетной массе ZP-домена —  $250 \text{ aa} \times 110 \text{ Da} = 27 \text{ kDa}$ , погрешность в пределах разрешающей способности метода (наши неопубликованные данные). Таким образом, частичный трипсинолиз вырезает из мезоглеина фрагмент с молекулярной массой, соответствующей ZP домену, и как раз этот фрагмент связывает антитела. Совпадение молекулярных масс триптического фрагмента и ZP-домена не является абсолютным доказательством направленности антител RA47 против ZP-домена, но повышает такую вероятность. В дальнейшем мы предполагаем провести белковое секвенирование иммунореактивного фрагмента.

На иммуноблоте после SDS-электрофореза гомогената гонад самок медузы *A. aurita* антитела из сыворотки RA47 связываются двумя иммунореактивными белковыми зонами. Их относительные молекулярные массы составляют 180 и 210 кДа

(Адонин и др., 2009), т.е. больше, чем мезоглеина (молекулярная масса 47 кДа). По-видимому, белки именно из этих зон входят в состав специфических гранул ооцита и пластинки контакта. Вероятно, в пластинке контакта и гранулах-предшественниках присутствуют белки, в состав которых входит ZP-домен, но, в соответствии с их молекулярной массой, они могут содержать и другие функциональные домены.

Возможны два объяснения различий в молекулярных массах мезоглеина и белков гонад. Во-первых, для ZP-белков характерны пост-трансляционные изменения (Jovine et al., 2005). Мезоглеин подвергается модификациям при включении в мезоглею (Shaposhnikova et al., 2005). Вторая возможность состоит в том, что белки гонад могут оказаться другими представителями ZP-семейства. Геномы большинства животных, представленных в базах данных, содержат более одного гена ZP-доменного белка. Наличие ZP-белков, специализированных для участия в оплодотворении, кажется более вероятным, и мы предполагаем проверить такую возможность.

При оплодотворении у представителей класса Scyphozoa, как и у большинства Cnidaria, сперматозоид контактирует с яйцеклеткой только на одном полюсе (Arai, 1997). Процессу оплодотворения у *A. aurita* предшествует уплощение клеток зачаткового эпителия в месте прикрепления ооцита (рис. 2А, IV, V, VII). В месте контакта ооцита с зачатковым эпителием уплощенные клетки образуют воронкообразные углубления. Мы наблюдали в них *in vivo* скопления сперматозоидов, что согласуется с описаниями (Иванова-Казас, 1975). Соответственно, способ прикрепления яйцеклетки к эпителию и находящиеся в этом месте структуры могут иметь принципиальное значение для процесса оплодотворения. Ооцит ориентирован таким образом, что пластинка контакта экспонирована в сторону предполагаемого контакта со сперматозоидом (рис. 3).

Несмотря на 400 миллионов лет, прошедших после разделения предков форели и мыши, и на переход от внешнего оплодотворения и развития к внутреннему, белки оболочек яйца у форели и мыши имеют структурное сходство как между собой, так и с белками оболочек птиц и амфибий (Litscher, Wassarman, 1999). Эволюционный консерватизм отражает ключевую роль ZP-доменных белков при оплодотворении у многих животных. Их роль в формировании блестящей оболочки и при оплодотворении у млекопитающих изучена сравнительно хорошо. Они (в частности, ZP3 мыши) отвечают за первичное прикрепление сперматозоида и участвуют в процессе инициации акросомной реакции (Jungnickel et al., 2003). Обнаруженные в составе пластинки белки, по-видимому, являются ZP-домен-содержащими, поэтому можно предположить, что пластинка пластинка играет

определенную роль в процессе контакта сперматозоида и ооцита. Пластинка маркирует и сужает область контакта; ядро находится в непосредственной близости к пластинке, которая ориентирована в просвет кармана, к потоку морской воды, несущему сперматозоиды (рис. 1). Экспериментальный материал для проверки такого сценария оплодотворения получен. Более высокая молекулярная масса ZP-доменных белков гонад по сравнению с мезоглеином предполагает существование в них других доменов, выполняющих, например, рецепторные функции распознавания сперматозоида.

Пластинка контакта, покрывающая только анимальный полюс ооцита, но обнаруженная по наличию ZP-доменных белков, может оказаться простейшей структурой среди эволюционно более продвинутых яйцевых оболочек и представлять собой некий аналог этих оболочек у *Aurelia aurita*.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 07-04-10086-к, 09-04-01145-а) и Правительства Санкт-Петербурга (проект № 2.6/4-05/85).

Авторы признательны коллективу Беломорской биологической станции Картеш Зоологического института РАН за теплый прием и постоянную поддержку, к.б.н. с.н.с. Института цитологии РАН Почукалиной Г.Н. за ценные замечания и консультации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chapman D.M. Cnidarian histology. Coelenterate biology. Reviews and new perspectives. Eds. Muskatine L., Lenhoff H. Acad. Press. NY—SF—London. 1974. P. 1–93.
- Cnidaria. In: Microscopic anatomy of invertebrates. Harrison, F.W. and Westfall, J.A. (Eds.), Volume 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. Wiley-Liss, New York, 1991. P. 91–358.
- Bouillon J., Coppo G. Etude comparative de la mesoglee des cnidaires // Cahiers Biol. Marine. 1977. V. 13. P. 339–368.
- Weber C., Schmid V. The fibrous system in the extracellular matrix of hydromedusae // Tissue and Cell. 1985. V. 17. P. 811–822.
- Chapman G. The structure and function of the mesoglea. Cnidaria and their evolution, ed. Rees. Symp. Soc. London. 1966. V. 16. P. 147–168.
- Заварзин А.А. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. М.: Медгиз, 1945.
- Matveev I.V., Shaposhnikova T.G., Podgornaya O.I. A novel *Aurelia aurita* protein mesoglein contains DSL and ZP domains // Gene. 2007. V. 399. P. 20–25.
- Shaposhnikova T., Matveev I., Napara T., Podgornaya O. Mesogleal cells of the jellyfish *Aurelia aurita* are involved in the formation of mesogleal fibres // Cell Biol. Int. 2005. V. 29. № 11. P. 952–958.
- Кэтти Д., Райкундалия Ч., Браун Дж., Линг Н.Р., Гордон Д., Арвие Ж., Уильямс А.Ф. Антитела. М.: Мир. 1991. 287 с.

- Пурс Э. Гистохимия, Москва: Издательство иностранной литературы. 1962. 964 с.
- Arai M.N. A functional biology of Scyphozoa. Chapman and Hall, 1997.
- Jovine L., Costel C., Darie, Eveline S., Litscher, Paul M., Wassarman. Zona pellucida domain proteins. Annu. Rev. Biochem. 2005. V. 74. P. 83–114.
- Wassarman P., Chen J., Cohen N., Litscher E., Liu C., Qi H., Williams Z. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida // J. Exp. Zool. 1999. V. 285. P. 251–258.
- Tarin J.J., Cano A. Fertilization in Protozoa and Metazoan Animals. Springer. 2000.
- Wassarman P.M. Mammalian fertilization: the strange case of sperm protein 56 // BioEssays. 2009. V. 31. № 2. P. 153–158.
- Адонин Л.С., Подгорная О.И., Матвеев И.В. и др. Пластика в зоне контакта ооцита с зачатковым эпителием у сцифомедузы *Aurelia aurita* имеет иммунологическое сходство с ZP-домен-содержащим белком мезоглеин // Цитология. 2009. Т. 51. № 5. С. 435–442.
- Morandini A.C., Da Silveira F.L. Sexual reproduction of *Nausithoe aurea* (Scyphozoa, Coronatae). Gametogenesis, egg release, embryonic development, and gastrulation // Sci. Mar. 2001. V. 65. № 2. P. 139–149.
- Иванова-Казас О.М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Новосибирск: Наука, 1975. 372 с.
- Eckelbarger K.J., Larson R.J. Ovarian morphology and oogenesis in *Aurelia aurita* (Scyphozoa: Semaestomeae): ultrastructural evidence of heterosynthetic yolk formation in a primitive metazoan // Mar. Biol. 1988. V. 100. P. 103–115.
- Eckelbarger K.J., Larson R.J. Ultrastructure of the ovary and oogenesis in the jellyfish *Linuche unguiculata* and *Stromolophus meleagris*, with a review of ovarian structure in the Scyphozoa // Mar. Biol. 1992. V. 114. P. 633–643.
- Wassarman P.M., Jovine L., Litscher E.S. A profile of fertilization in mammals // Nat. Cell Biol. 2001. V. 3. P. E59–E64.
- Widersten A. Genital organs and fertilization in some Scyphozoa // Zool. Bidrag Uppsala. 1965. V. 37. P. 45–58.
- Avian M., Micali F., Sciancalepore M. Vitellogenesis in *Pelagia noctiluca* primi risultati di eucitocy autoradiografiche. Atti della Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna Classe di Scienze Fisiche Rendiconti. 1987 V. 3. P. 139–146. In Italian; English abstract.
- Litscher E.S., Qi H., Wassarman P.M. Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 12280–12287.
- Jungnickel M.K., Sutton K.A., Florman H.M. In the beginning: lessons from fertilization in mice and worms // Cell. 2003. V. 114. P. 401–404.

## Morphodynamics of the Contract Plate in the Course of Oocyte Maturation in the Scyphozoan *Aurelia aurita* (Cnidaria: Semaestomae)

L. S. Adonin<sup>a,b</sup>, O. I. Podgornaya<sup>a,b</sup>, and T. G. Shaposhnikova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Cytology and Histology, St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

<sup>b</sup> Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

e-mail: leo.adonin@gmail.com

**Abstract**—The structure forming in the area of contact between the oocyte and the germinal epithelium in the course of oocyte maturation of the scyphozoan *Aurelia aurita* is termed the contact plate. This study traces the successive stages of contact plate formation in the course of oocyte maturation at the light microscopic and ultrastructural levels. At early stages of oocyte development, the appearance of granules is observed in the peripheral cytoplasm of the oocyte; these granules accumulate at the pole, which retains its connection with the germinal epithelium of the gonads. Two types of these granules are recognized: (1) granules with homogeneous content and (2) granules containing loose shapeless material in the form of thick cords. The transformation of type two granules into larger structures, as well as the consolidation of type one and type two granules at later stages of oocyte development, are probably the processes that lead to the formation of the characteristic structure and contact plate, visible in paraffin and semithin sections. It remains unclear where exactly the contact plate is localized at the moment of fertilization: inside or outside the oocyte. The content of granules and components of the plate specifically bind the antibodies (RA47) against mesoglein, the ZP domain-containing protein of the mesoglea of *A. aurita*. The contact plate, covering only the anomalous pole of the oocyte but detected by the presence of ZP domain-containing proteins, may prove to be the simplest egg membrane of the zona pellucida type.

**Keywords:** *Aurelia aurita*, extracellular matrix, mesoglein, ZP domain-containing proteins

УДК 581.1

## ФОРМИРОВАНИЕ ПРОВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ СОЗРЕВАЮЩИХ ПЛОДОВ ФАСОЛИ (*Phaseolus limensis* L.) ПО ДАННЫМ ЯДЕРНОЙ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ МИКРОТОМОГРАФИИ

© 2012 г. И. С. Виноградова<sup>1</sup>, О. В. Фалалеев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный технологический университет, 660049  
Красноярск, проспект Мира, 82  
E-mail: vis@akadem.ru

<sup>2</sup> Институт физики им. Л.В. Киренского, Красноярский научный центр СО РАН, 660036 Красноярск,  
Академгородок-50, стр. 38  
E-mail: falaleev\_ov@mail.ru

Поступила в редакцию 07.04.10 г.  
Окончательный вариант получен 02.05.11 г.

Метод <sup>1</sup>H магнитно-резонансной микротомографии применен для изучения проводящих систем плодов фасоли *Phaseolus limensis* в процессе их формирования. Используя методику градиентного эха получены 2D томографические срезы в сагиттальной и аксиальной плоскостях на плодах, снятых с вегетирующего растения через 10, 17, 24 и 31 день после появления завязи. Не обнаружено сосудистой связи между материнскими тканями растения (створки боба и кожура семени) и зародышем. Зародыш имеет автономную, разветвленную сетку прокамбиальных тяжей в семядолях, стягивающихся к зародышевой оси. Створки плода покрыты сеткой проводящих пучков, крупные сосудистые тяжи проходят вдоль спинного и брюшного швов. Проводящие пучки кожуры формируются в процессе роста семени, и в стадии физиологической зрелости они представлены обширной сосудистой системой, разветвляющейся многократно в средней части основной паренхимы. С источником ассимилятов они связаны через латеральные жилки стручка и крупный проводящий пучок, входящий через плаценту в семя ниже рубчика. Через проводящие пучки фуникулуса и ткань рубчика ассимиляты поступают на внешнюю часть семенной кожуры, которая не содержит проводящих пучков.

**Ключевые слова:** <sup>1</sup>H магнитно-резонансная микротомография, плоды лимской фасоли (*Phaseolus limensis*), рост и формирование семян, проводящие пучки, транспорт ассимилятов.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается активное внедрение методов ядерной магнитно-резонансной томографии (МРТ), исключительно глубоко развитой в медицине (Ринки, 2003), в практику биохимикофизических исследований (Callaghan, 1991; Коптюг, Сагдеев, 2002) в виде нового, формирующегося направления — ЯМР микротомографии, главным образом, по ядрам <sup>1</sup>H. Метод непрерывно развивается и совершенствуется и в настоящее время применяется широко к исследованию растений. Микроскоп ЯМР обнаруживает свободную воду в тканях и создает анатомические томограммы тканей без их разрушения.

Приложение метода к исследованию растений можно найти в обзорах: (Chudek and Hunter, 1997; Ishida et al., 2000; Scheenen et al., 2000; Köckenberger, 2001; Ciobanu et al., 2003; Köckenberger et al., 2004; Scheenen et al., 2007; Van As et al., 2009). Методом МРТ изучалась динамика набухания на семенах сои (Pietrzak et al., 2002), фасоли (Kikuchi

et al., 2006), люпина (Garnczarska et al., 2007), табака (Manz et al., 2005), риса (Akemi et al., 2006) и др. В результате этих исследований были найдены участки, через которые вода поступает в набухающие семена, и изучено ее пространственное распределение, которое оказалось неоднородным. На семенах риса (Ishida et al., 2004), ячменя (Glidewell, 2006) и гороха (Garnczarska et al. 2008) изучены процессы естественной сушки при созревании семян.

Одной из важных задач физиологии растений является изучение потоков питательных веществ, которые осуществляются через проводящие пучки. В решении этой задачи метод МРТ также внес свой вклад. На плодах земляники (Goodman et al., 1992), малины (Williamson et al., 1994), яблок (MacFall and Johnson, 1994), винограда (Glidewell et al., 1997) и др. изучалась архитектура проводящих пучков. В результате дальнейшего развития метода МРТ появились методики, позволяющие дифференцировать ткани проводящих пучков и

изучать потоки растворов питательных веществ через них (Köckenberger et al., 1997; Verscht et al., 1998; Scheenen et al., 2000). В этих исследованиях на томограммах, полученных от стеблей растений или гипокотилей проростков, удалось дифференцировать ксилему и флоэму, вычислить в естественных условиях скорости и расходы потоков воды через них и показать, что имеет место внутреннее обращение воды между флоэмой и ксилемой. Следует отметить, что в стеблях проводящая система сравнительно простая и представлена параллельными сосудистыми пучками, расположенными концентрически вокруг центральной части стебля. Пучки достаточно крупные, например, в стебле огурца диаметр ксилемы 0.35 мм. Их архитектура и внутреннее строение хорошо изучены с помощью световой микроскопии. Однако, очень мало известно о проводящей системе семян растений, а те сведения, которые имеются, получены в основном с помощью световой микроскопии на тонких срезах.

Изучая методом МРТ процессы поступления воды в воздушно-сухие семена лимской фасоли (*Phaseolus limensis* L.) при их контакте с водой (Виноградова и Фалалеев 2010а) мы обнаружили, что после прохождения первой стадии набухания на томограммах внутри семядолей появляются водонасыщенные структуры. Анализ литературных данных (Цингер, 1958), в том числе микротомографических (Garczarska et al., 2008), показал, что обнаруженные нами структуры относятся к проводящим пучкам. Проведенные далее исследования на выращенных нами плодах лимской фасоли (*Phaseolus limensis*) в стадии физиологической зрелости (Виноградова и Фалалеев, 2010б) показали, что на томограммах четко фиксируются отдельные ткани плодов и семян, а также проводящие пучки. Проводя последовательные томографические срезы на плодах фасоли, мы получили картины проводящих пучков разной архитектуры в створках и швах плода, в семенной кожуре, семядолях и зародышевой оси. По результатам этих исследований была поставлена задача с помощью метода МРТ изучить плоды фасоли на разных стадиях их созревания, проследить за формированием отдельных тканей и сосудистой системы, что и явилось целью настоящего исследования. Представляло также интерес сравнить результаты, полученные с помощью двух микроскопов: МРТ и светового.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Растительные образцы.** Растения лимской фасоли выращивались в теплице из семян, поставляемых ООО “Мистраль Трейдинг”. Они быстро росли вверх, достигая высоты более 2-х метров. Цветonoсы многоцветковые, но практически все цветы опадали без завязи. И лишь на некоторых в

августе появились первые завязи. Дата появления завязей фиксировалась, и от нее отсчитывалось время созревания плодов. Первые эксперименты проводились на плодах, снятых через 10 дней после отмеченного срока, далее плоды снимались через каждую неделю. Всего было изучено 4 партии плодов (с трехкратным повтором), отличающихся сроками созревания: на 10, 17, 24 и 31 день после появления завязей. При записи томограмм семена оставались внутри плода, прикрепленные семяножками к его брюшному шву.

**Метод МРТ.** Метод ЯМР-микротомографии появился в середине 1980-х годов. Он характеризуется относительно невысоким пространственным разрешением порядка десятков и сотен микрометров, что определяется относительно низкой чувствительностью и спектральной шириной сигнала ЯМР, которая значительна в случае твердых тел. Неоспоримым достоинством является возможность исследовать внутреннюю структуру и свойства объектов, в том числе и оптически непрозрачных, без их разрушения, что особенно важно в медицине и биологии. Другим достоинством метода является возможность получать информацию вдоль любого направления. Подавляющая часть исследований выполняется с использованием сигналов ЯМР  $^1\text{H}$ . Получение изображения методом МРТ — мощное средство исследования воды в живых системах. Описание метода МРТ можно найти в монографиях (Farrar and Becker, 1971; Morris, 1986; Pfeffer and Gerasimowicz, 1989; Callaghan P.T., 1991; Hausser and Kalbitzer, 1991; Blümich and Kuhn, 1992).

В ЯМР резонансная частота сигнала (например, протонов воды) обычно прямо пропорциональна величине приложенного к образцу внешнего магнитного поля, которое в ЯМР-спектроскопии высокого разрешения делают максимально однородным. Если же исследуемый образец поместить в неоднородное поле, которое изменяется линейно вдоль выбранного направления в пространстве, то есть если создать градиент поля, как это предложил Лаутербур (Lauterbur, 1973), то резонансная частота будет изменяться пропорционально координате в данном направлении. Для исследования объемного тела необходим градиент поля в трех взаимно перпендикулярных направлениях. Данный метод позволяет делать как бы анатомические срезы трехмерного тела. Для этого достаточно на время возбуждения образца создать градиент внешнего поля в направлении, перпендикулярном плоскости нужного среза. В результате при заданной частоте “возбуждения” атомных ядер будут переведены в возбужденное состояние только те ядра, для которых данная частота является резонансной, т.е. те, что лежат в некотором плоском сечении тела. Метод дает возможность получать изображение всего среза, глубина и ориентация которого задается

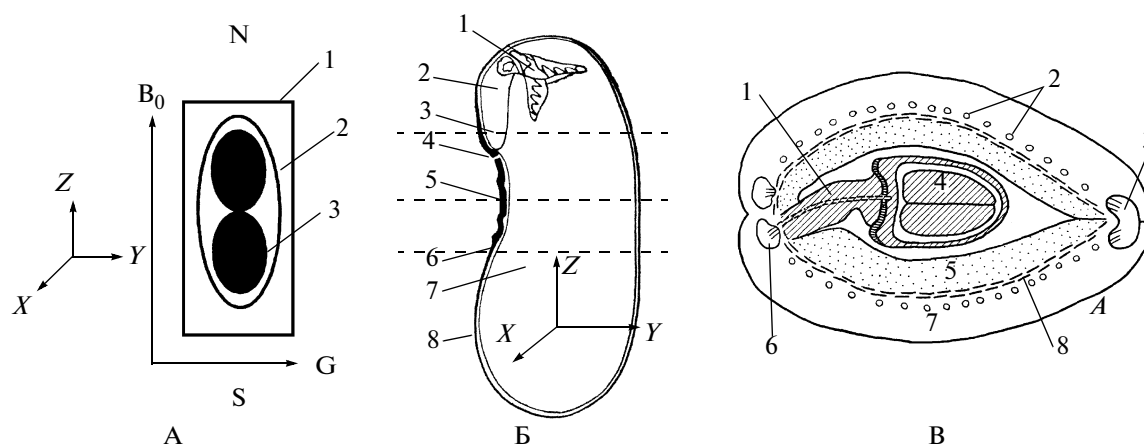


**Рис. 1.** А — Расположение плода лимской фасоли в радиочастотном контуре относительно статического магнитного поля  $B_0$ , X, Y и Z — оси лабораторной системы координат. Градиент магнитного поля ( $G$ ) создается вдоль оси Y. (1 — держатель образца, 2 — плод фасоли, 3 — семя фасоли); Б и В — схематическое изображение семени фасоли Б — продольный срез, 1 — почечка, 2 — гипокотиль, 3 — корешок, 4 — микропиле, 5 — рубчик семени, 6 — линза (строфиолум), 7 — семядоли, 8 — семенная кожура. Пунктиром показаны плоскости поперечных томографических срезов: верхний — через корешок зародышевой оси (рис. 2Г), средний — через рубчик (рис. 2Д) и нижний — ниже рубчика в месте входа проводящего пучка в кожуру (рис. 2Е). В — поперечный срез плода на уровне семядолей зародыша. 1 — фуникулус; 2 — проводящие пучки кожуры плода; 3 — срединный плодолистиковый пучок; 4 — семядоля; 5 — внутренняя паренхима; 6 — латеральный плодолистиковый пучок; 7 — наружная паренхима; 8 — склеренхима. (Рис. В воспроизводится из работы Эсау, 1980).

оператором. Изображение строит компьютер, выполняющий двумерное преобразование Фурье. Обычно параллельно можно регистрировать до 30-ти срезов и более.

Магнитное поле создается катушкой со сверхпроводящей обмоткой при использовании в системе охлаждения жидкого азота и жидкого гелия. Возбуждение атомных ядер осуществляется с помощью катушки, питаемой радиочастотным генератором, при этом различные части образца оказываются в магнитном поле различной величины и дают сигнал ЯМР от одной пространственной координаты. Использование трех взаимно перпендикулярных градиентов поля позволяет исследовать зависимость сигнала ЯМР от двух или трех пространственных координат и тем самым получать двумерные и трехмерные изображения соответственно.

Наш томографический эксперимент проводился в Красноярском региональном центре коллективного пользования СО РАН на микротомографе фирмы "Bruker" (Германия), сконструированном из следующих элементов. Вертикальный сверхпроводящий магнит US 200/85 на 4.7 Тл, электронная стойка DPX 200, градиентная стойка GRE AT 40, датчики PH 200 WB (MINI 0.5 и MICRO 2.5) операционная система LINUX (KDE 3.5), программное обеспечение Para Vision 4.0. Максимальный размер образцов ограничен внутренним диаметром радиочастотной катушки 37 мм, диапазон стабилизируемой температуры  $\pm 70^\circ\text{C}$ . Томографические снимки восстанавлива-

лись с помощью матрицы  $512 \times 512$  пикселей с использованием поля наблюдения (field of view) от 1.5 см для маленьких образцов до 3.0 см для больших. В данной работе использовалась методика градиентного эха (Gyngell, 1988). Период повторения импульсной последовательности ( $T_R$ ) составлял от 300 до 400 мс, время эха  $T_E$  составляло 4 мс, угол поворота намагниченности возбуждающим радиочастотным импульсом составлял 30 град.

Отдельные плоды фасоли располагались в радиочастотном контуре спектрометра так, как это показано на рисунке 1А. Семена лимской фасоли достаточно крупные и внутри плода могли находиться от одного до трех семян. Для томографического эксперимента выбирались плоды с двумя семенами, которые размещались внутри датчика вертикально. Срезы проводились для одного семени. Выбирались плоды, внутри которых семена имели примерно одинаковые размеры. Измерения проводились при комнатной температуре ( $20-23^\circ\text{C}$ ). Томографические срезы производились в двух взаимно перпендикулярных плоскостях — сагитальной, перпендикулярной оси X и параллельной зародышевой оси (рис. 1Б), мы их в дальнейшем обозначаем как продольные, и аксиальной, перпендикулярной зародышевой оси (перпендикулярной оси Z на рис. 1Б), мы их в дальнейшем обозначаем как поперечные. Толщина срезов указана на соответствующих рисунках. Количество срезов составляло от 25 до 36. Большое количество срезов связано с тем, что сосуди-

стая система как в оболочке плода, его брюшном и спинном швах, так и в коже, семядолях и зародышевой оси семени, имеет разную архитектуру и вследствие этого картина проводящих пучков быстро меняется. Вследствие этого приходилось делать достаточно тонкие срезы, проигрывая при этом на отношении сигнал-шум, особенно на образцах ранних стадий роста. Чтобы увеличить отношение сигнал-шум, мы использовали 40-кратное накопление. Все это привело к увеличению времени записи томограмм, (4 часа), хотя одно из главных преимуществ методики градиентного эха состоит в коротком времени измерения за счет малого угла поворота намагниченности.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Созревание семян фасоли происходит в течение 53–56 дней с начала цветения (Örik, 1968). Следующее за оплодотворением развитие семени обычно разделяют на три фазы (Weber et al., 2005), соответствующие X, XI и XII этапам органогенеза (Физиология...). Наши результаты получены для X и XI фаз.

Хотя в процессе МРТ-исследований выполнялось большое количество срезов для каждого образца, все их невозможно привести в рамках одной статьи, поэтому отбирались срезы, проходящие через кожуру створок плода, кожуру семени, фуникулус, зародышевую ось, семядоли, чтобы отобразить архитектуру проводящих пучков и пути поступления питательных веществ от материнского растения в растущее семя.

На рис. 2 приведены поперечные томографические срезы, под каждым снимком указано время от появления завязи; стрелками показан масштаб 5 мм. Рис. 2А; 2Б; 2В и 2Г отображают срезы в плоскости, проходящей через зародышевую ось. Чтобы показать основные пути поступления воды и питательных веществ в растущее семя, на рис. 2Д приведен срез, проходящий через середину семени, ткань рубчика и семяножку; на рис. 2Е срез проходит ниже рубчика, в месте входа крупного проводящего пучка. Места срезов показаны пунктиром на рис. 1Б. Для идентификации тканей плода мы использовали рис. 1В, взятый из книги Эзау (1980, С. 467) для фасоли.

На рисунке 2А ранняя стадия развития. В створках боба (1) четко фиксируются ткани внешней и внутренней паренхимы, разделенные сеткой проводящих пучков. Внутренняя паренхима более обширна чем внешняя, ранее дифференцированная. В спинном и брюшном швах плода расположены тяжи проводящих пучков (3). Ткани зародыша (2) дифференцированы. Выделяется зародышевая ось, семядоли и более светлая ткань вокруг семядолей, из которой впоследствии диф-

ференцируется многослойная кожа семени с проводящими пучками.

На рис. 2Б (возраст 17 дней) наиболее заметные изменения в коже семени, в которой формируется несколько слоев. Наружный тонкий слой равномерно и обильно оводнен. Внутренний на томограммах выглядит темным и в его средней части начинают формироваться проводящие пучки сначала в виде отдельных уплотнений (рис. 2Б), а затем (24 дня, рис. 2В) в виде отдельных пучков. Семя увеличивается в размерах.

В это же время дифференцируются проводящие ткани зародышевой оси, появляются прокамбиальные тяжи внутри семядолей, и более четко выделяются проводящие пучки, покрывающие створку боба (9). На рис. 2Г, Д и Е созревшее семя с проводящими пучками кожуры семени (7), створок плода (9), и заполняющими семядоли прокамбиальными тяжами (8). Для этого возраста (31 день) приведены также срезы, проходящие через фуникулус и ткань рубчика (рис. 2Д), а также срез 2Е, содержащий вход крупного проводящего пучка ниже области рубчика (11).

На рис. 3 томограммы продольных срезов: 3А–3В – первый съем плодов на 10 день после появления завязи, масштаб для них показан на 3Б. На 3Г–3И – томограммы плода, снятого через 31 день, показаны продольные срезы на разных уровнях. 3А – срез проходит через кожуру плода, проводящие пучки в створках очень тонкие и образуют едва заметную сеточку; 3В – срез примерно в центре семени. На снимке видны проводящие пучки, идущие вдоль швов плода; 3Г–3И – созревшее семя со сформировавшейся проводящей системой; 3Г – светлыми линиями с сеточной структурой выделена проводящая система кожуры плода (1). 3Д – в центральной части – проводящие пучки кожуры семени (3), идущие от линии рубчика к противоположной стороне семени. На 3Е появляются прокамбиальные тяжи внутри семядолей (4) в их внешней части. 3Ж–3З – срезы в центральной части семени, содержащие зародышевую ось; на 3И – срез в третьей перпендикулярной плоскости – планарной, проходящей через зародышевую ось.

Прокамбиальные ткани внутри семядолей образуют разветвленные тяжи, идущие от зародышевой оси. На 3З видна проводящая ткань внутри зародышевой оси (6), фуникулуса (7) и крупный проводящий пучок ниже рубчика (8), а также проводящие пучки вдоль брюшного шва (5).

Срез в планарной проекции (рис. 3И) позволяет более четко зафиксировать проводящую ткань в области зародышевой оси.

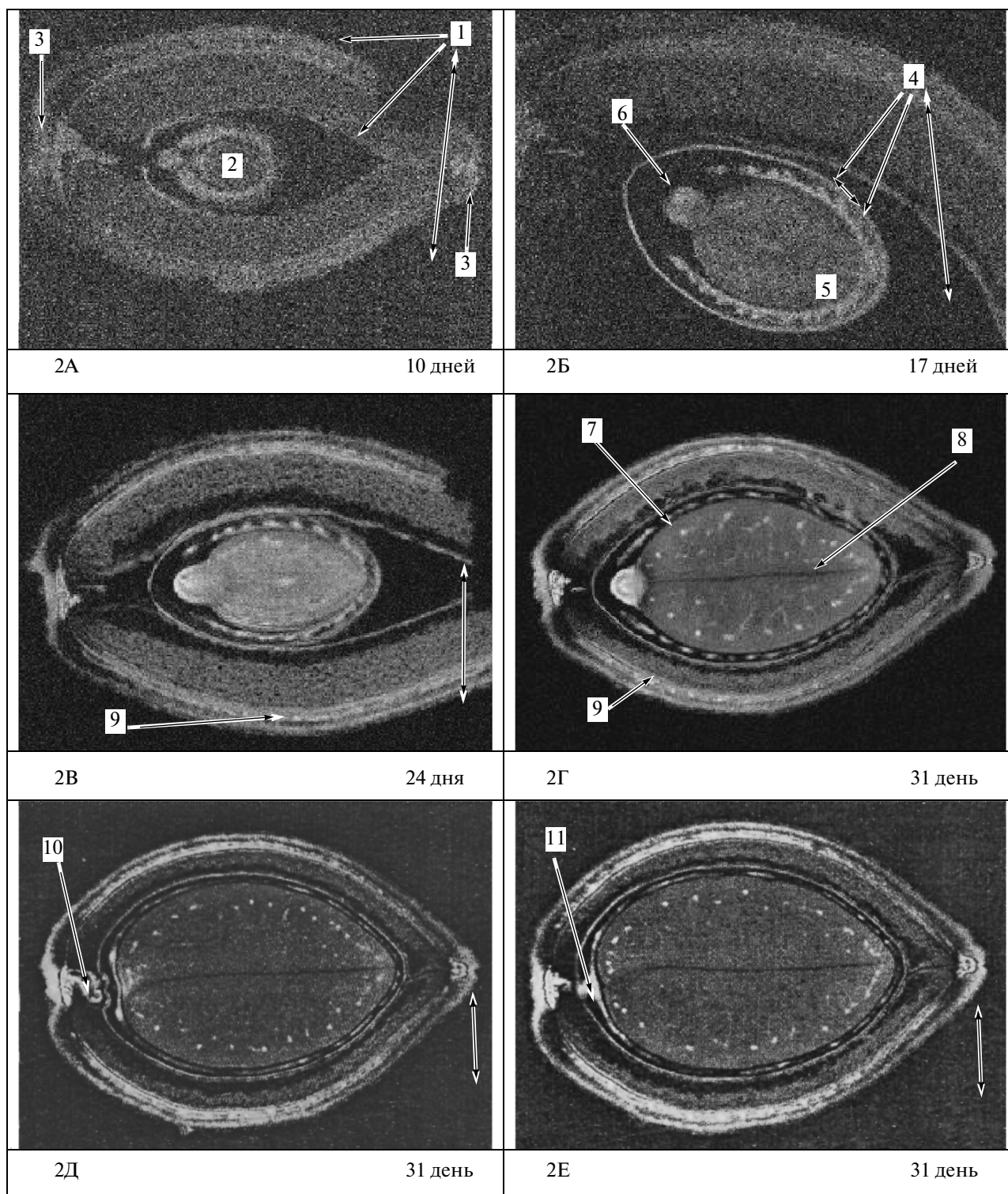


**Рис. 2.** Поперечные томографические срезы плодов *Phaseolus limensis* на разных стадиях созревания. Рисунки сделаны при различном увеличении, белыми стрелками показан масштаб 5 мм. Расположение плодов в контуре соответствует рис. 1А. Томограммы получены методом градиентного эха используя матрицу  $512 \times 512$  пикселей и поле наблюдения 1.5 см для 2А и 2Б; 2.5 см для 2В и 3 см для остальных (2Г, Д и Е). Толщина срезов составляет 0.3 мм для 2А и 2Б, 0.4 мм для 2В и 0.7 мм для 2Г, Д и Е. На рисунке цифрами обозначены: 1 – кожура плода, 2 – зародыш, 3 – проводящие пучки в боковых швах плода, 4 – кожура семени с проводящими пучками, 5 – семядоли, 6 – зародышевая ось, далее – проводящие пучки кожуры семени (7), семядолей (8) и кожуры плода (9), ткани фуникулуса (10) и крупный проводящий пучок под рубчиком (11). Подробное описание рисунка дано в тексте.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Семена бобовых являются хорошими модельными объектами для исследования процессов роста и развития семян, изучения потоков питательных веществ в процессе онтогенеза и факторов, контролирующих эти потоки, а также возможности получать более ценные пищевые продукты. Поэтому их структура и ростовые процессы интенсивно исследуются и в настоящее время.

### Ткани и проводящие пучки кожуры плода

Стенки плода образуются из плодолистика, свернутого вдоль по его главной (средней) жилке, и соединенного краями (Bailey and Swamy, 1951). Край стручка, на котором возникают яйцеклетки, называется брюшным швом, он содержит брюшные или латеральные (Эсау, 1980) сосудистые связки. На противоположной стороне стручка спинной шов содержит также сосудистые связки (Reeve and Brown, 1968). На томограммах они представлены несколькими мощными параллельными тяжами, (рис. 3Ж и 3З) и обозначены цифрой 5. Створки плодов покрыты сеткой проводящих пучков, напоминающей жилкование в листьях; в морфологии растений завязь считается модификацией листового образования (Александров, 1954).

Все сосудистые ткани стен стручка возникают в пределах молодой внешней паренхимы в течение цветочного и раннего послецветочного роста (Reeve and Brown, 1968). Сосудистые связки никогда не развиваются во внутренней зоне паренхимы. Уже на ранней стадии роста (10 дней) поверхность створок плода (рис. 3А) покрыта сеткой мелких еле различимых проводящих пучков, которые с ростом плода становятся более мощными (рис. 3Г, 1) и содержат как флоэмные, так и ксилемные элементы. В мелких жилках возможны неполные (только флоэма) проводящие пучки (Яковлев, 1991). Поскольку внешняя паренхима стручка содержит хлоропласты (Эсау, 1980), она может выполнять ассимиляционную функцию, подводя питательные вещества через флоэмные элементы створок к латеральным сосудистым связкам в дополнение к потокам ассимилятов из листьев.

### Ткани и проводящие пучки кожуры семян

Ранее признавалась только защитная функция кожуры зрелых семян. В настоящее время многочисленными исследованиями установлено, что кожа семян бобовых — многофункциональный орган, поставляющий питательные вещества к зародышу в течение развития семени (Thorne, 1985; Murray, 1987; Zhang et al., 2007 и др.).

Архитектура проводящих пучков семенной кожуры в семействе Fabaceae является изменчивой и может иметь таксонометрическое значение. Так, семена сои (*Glycine max*) и фасоли (*Phaseolus*

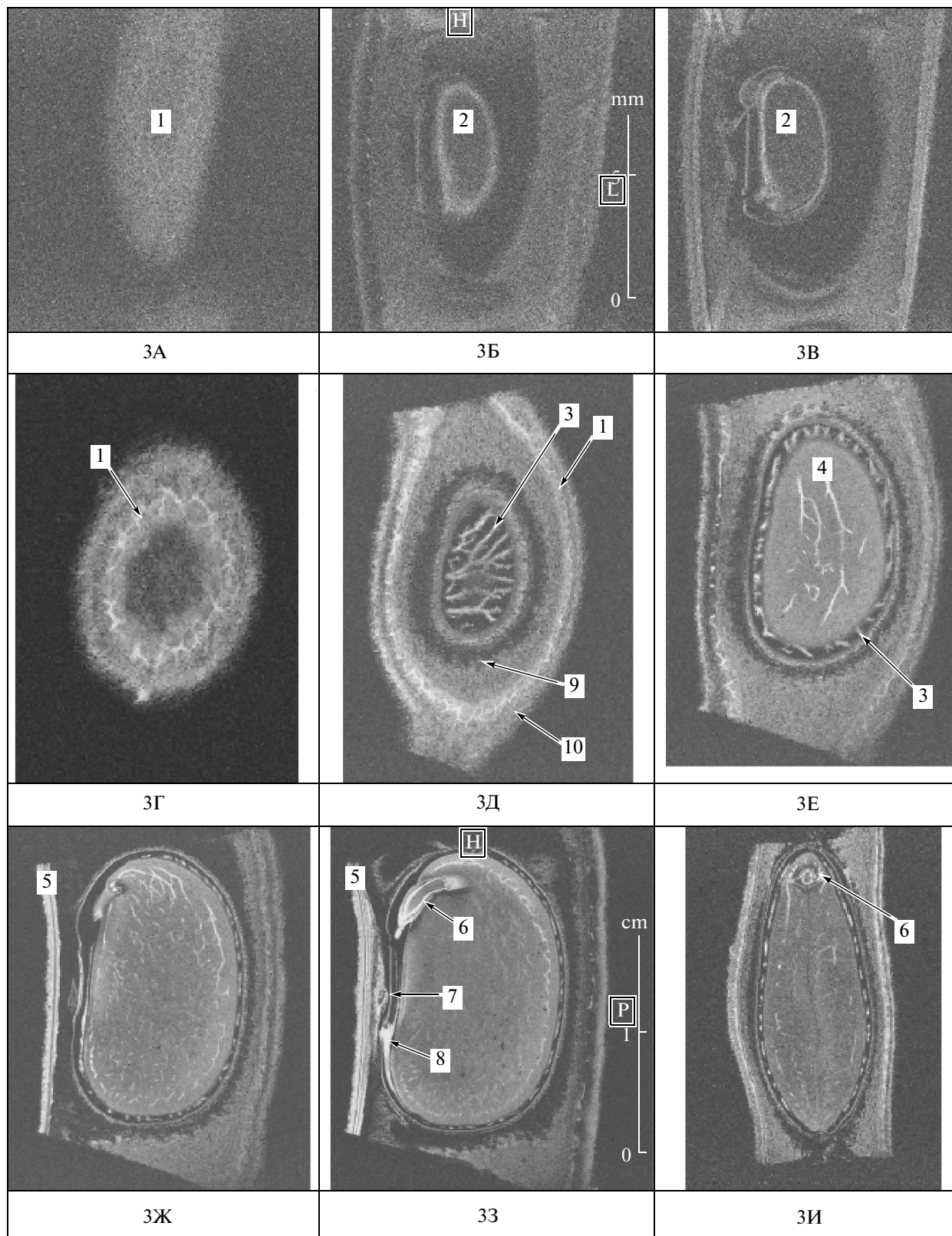
*vulgaris*), которые относятся к трибе Phaseoleae, имеют семенную кожуру с разветвленной сеткой проводящих пучков; в то же время семенная кожура гороха (*Pisum sativum*) и бобов (*Vicia faba*), которые относятся к трибе Viciaeae, содержит только одну халазальную жилку с двумя латеральными ветвями (Van Dongen et al., 2003).

Кожа семени является генетически материнским органом, зародыш является дочерним органом. Между зародышем и растением матери посредничает кожа семени. В течение фазы созревания, сахароза и другие питательные вещества поступают в семена через брюшную сосудистую систему, локализованную вдоль по стручку, в область вокруг рубчика и от него разветвляются по коже до противоположной стороны семени.

Строение семенной кожуры фасоли изучалось многократно с использованием световой и электронной микроскопии. Было показано, что она многослойная. Детали ее строения можно найти в работах (Sterling, 1954; Эзау, 1980; Zhou et al., 2007 и др.). На рис. 4А приведен снимок поперечного среза кожуры из (Zhou, 2007). Наружный слой составлен из макросклеридов. Под ним расположены клетки в виде песочных часов с большими межклетниками. Под ними расположена склеренхима — рыхлая ткань с большими промежутками между клетками. Далее идет основная паренхима, в средней части которой расположены проводящие пучки. За основной паренхимой расположен слой клеток разветвленной паренхимы (branch parenchyma), однако, в семенах сои эта часть семенной кожуры обозначена как аэренхима (Thorne, 1981).

На томограммах ткани семенной кожуры разделяются по интенсивности водного сигнала. Ткань наружного слоя с сильным сигналом от воды можно отнести к той части кожуры, которая содержит клетки макросклеридов, песочных часов и склеренхимы. Ее большая оводненность объясняется тем, что в районе рубчика проходят проводящие пучки, идущие от плаценты через фуникулус. Это хорошо видно на поперечных срезах рис. 2Д. В этот слой заходит несколько проводящих пучков, но они сообщаются только с внешним слоем кожуры, не содержащим проводящих пучков. Поскольку структура этого слоя довольно рыхлая, питательные растворы могут занимать там свободные места.

Темные на томограммах участки кожуры относятся к паренхимным тканям. Расположенные в них проводящие пучки связаны с латеральными тяжами плода через крупный проводящий пучок, вход которого четко фиксируется как на поперечных (рис. 2Е, 11), так и на продольных (рис. 3З, 8) томографических срезах. Этот вход расположен между рубчиком и линзой. Мы его увидели сначала в работе Анискина (Анискин, Сапрыкина,



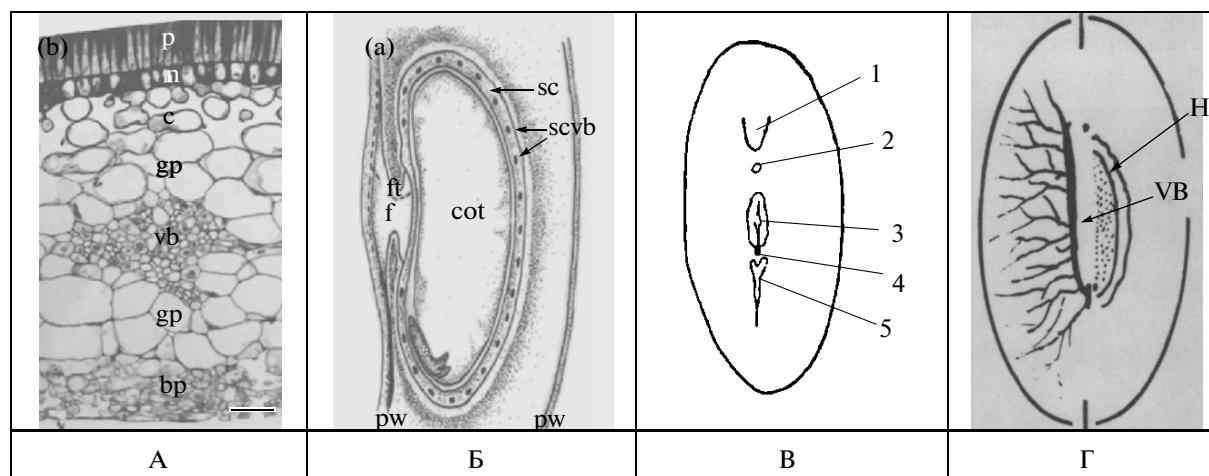


**Рис. 4.** А — поперечный срез кожуры семян *Phaseolus vulgaris*, полученный на световом микроскопе; р — палисадный слой; н — гиподерма; с — хлоренхима; гр — основная паренхима; бр — разветвленная паренхима; vb — проводящие пучки (воспроизводится из работы Zhou et al., 2007). Б — схематическое изображение семени фасоли *Phaseolus vulgaris* в плоде с проводящими пучками; pw — кожура стручка; f — фуникулус; ft — фуникулярный след; cot — семядоли; sc — кожура семени scvb — проводящие пучки в кожуре семени (воспроизводится из работы Zhou et al., 2007). В — Схематическое изображение области рубчика семени *Phaseolus*. 1 — корешок; 2 — микропиле; 3 — рубчиковая щель, 5 — строфиолум; 4 — место входа сосудистого пучка (воспроизводится из работы Анискина, Сапрыкина, 1962). Г — схематическое изображение проводящих пучков кожуры семян сои; Н — рубчик, VB — проводящие пучки (воспроизводится из работы Thorne, 1981).

1962), рисунок из которой приведен на рис. 4В, а затем зафиксировали на томограммах. Таким образом, томограммы дают два входа проводящих пучков в кожуру через плаценту и фуникулус. В упоминавшихся работах по исследованию транспорта ассимилятов в семена фасоли рассматривается только один единственный пучок через фуникулус, (напр., рис. 4Б).

Низкая оводненность паренхимы кожуры может быть связана с разрушением ее клеток (Эзау, 1980), заполнением ее клеточных оболочек пробкой, кутином, лигнином и пр. для придания прочности (Цингер, 1958), а также с облитерацией (Сравнительная..., 1996).

Наши данные по архитектуре проводящих пучков кожуры семян *Phaseolus limensis* хорошо согласуются с результатами, полученными микроскопическими методами для сои (Thorne, 1981), которые мы приводим на рис. 4Г. В этой работе показано, что, после входа в семенную кожуру крупный, проводящий пучок соединяется с двумя другими, расположенными почти под прямым углом к нему и огибающими с двух сторон ткани рубчика. От этих больших связок с двух сторон по внутренней паренхиме кожуры отходят

многочисленные меньшие связки, анастомозируя неоднократно в пределах паренхимы. От мелких связок ассимиляты разгружаются в ткани паренхимы. Методом МРТ мы не обнаружили никакой сосудистой связи между кожей семени и семядолями растущего зародыша.

#### Проводящая система зародыша — семядолей и зародышевой оси

Томографическая методика позволила неразрушающим методом впервые зафиксировать формирование и архитектуру проводящих тканей зародыша.

Согласно Александрову нормально дифференцированные зародыши должны иметь хорошо выраженную проводящую систему, которая проходит в центре зачатков корня и стебля, давая разветвления в семядоли (Александров, 1954). По мнению Цингер она представлена прокамбияльным тяжами, которые из центрального цилиндра корешка переходят в семядоли и нередко образуют там анастомозы. Проводящая система зародыша — вполне самостоятельная, обособленная система и никакой связи между ней и

**Рис. 3.** Томограммы продольных срезов плодов *Phaseolus limensis*. 3А, Б и В получены на плодах через 10 дней после появления завязи; остальные снимки соответствуют сроку созревания 31 день. Расположение плодов в контуре соответствует рис. 1А. Томограммы получены методом градиентного эха используя матрицу 512 × 512 пикселей и поле наблюдения 1.5 см для 2А, Б и В и 3 см для остальных (2Г–И). Толщина срезов составляет 0.3 мм для всех. На рисунке цифрами обозначены: 1 — кожура плода с сеткой проводящих пучков, 2 — зародыш; далее цифрами обозначены проводящие пучки: 3 — кожуры семени, 4 — семядолей, 5 — брюшного шва плода, 6 — зародышевой оси. На рис. 3Д указаны наружная (10) и внутренняя (9) паренхима, разделенные проводящими пучками; на рис. 3З — ткань фуникулуса (7) и крупный проводящий пучок ниже рубчика (8). Подробное описание рисунка дано в тексте.

проводящими путями материнского растения нет (Цингер, 1958).

Проводящие ткани безусловно имеют примитивную структуру и представлены прокамбиальными тяжами, в зрелом семени согласно томографическим снимкам они пронизывают все его части, располагаясь в виде кольцевой зоны в корешке и гипокотиле, заходят в почечку (рис. 33), от зародыша они спускаются в семядоли, где образуют разветвленную сеть и особенно густо заполняют внешние части семядолей (рис. 3Ж). На томограммах мы не обнаружили связи между ними и проводящими пучками кожуры. Действительно, проводящая система зародыша является самостоятельной и она закладывается для того, чтобы начать функционировать при прорастании семян. Так, в зародыше арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) гистологическими исследованиями не были обнаружены никакие зрелые или дифференцированные сосудистые элементы и сосудистая система была представлена непрерывной сетью прокамбиальных клеток в корне, гипокотиле и семядолях. После прорастания семени прокамбий дифференцируется на ксилему и флоэму, и уже в 6-ти дневных проростках эти ткани можно различать (Busse and Evert, 1999).

Дифференцированные сосудистые элементы найдены также в гипокотиле 6-ти дневных проростков клеверины при томографическом исследовании (Verscht et al., 1998).

Пути поступления питательных веществ в плоды и семена фасоли. Вопрос этот многократно исследовался и является дискуссионным и сейчас. К настоящему времени признана модель, согласно которой необходимые для роста зародыша вещества ассимилируются в листьях и по проводящим пучкам поступают в створки боба, затем через фуникулус в семенную кожуру, ее проводящие пучки, вложенные в срединную часть внутренней основной паренхимы. Поскольку нет непосредственной связи этих каналов с зародышем, то из флоэмных элементов кожуры ассимиляты сливаются в передаточные клетки паренхимы, разгружаясь по всей длине жилок кожуры и по симпласту перемещаются от элементов решета в смежные сосудистые клетки паренхимы. Затем они транспортируются радиально внутрь симпластическим маршрутом и сливаются к семени через апопласт по межклеточному пространству (Patrick J.W., Offler C.E., 2001).

В процессе развития семян кожа должна импортировать излишки воды. Учитывая непроницаемость эпидермальной кутикулы, окружающей семенную кожуру, любая эвакуация воды от семени должна произойти через фуникулус и створки плода. Семена, вероятно, возвращают воду к проводящим пучкам стручка через ксилему кожуры, фуникулус, и жилки спинного шва, иначе бы по-

ступающий сок флоэмы растворялся. В пределах семенной кожуры вода должна возвратиться через ксилему (Pate et al., 1985; Peoples et al., 1985).

В работе показана возможность неразрушающим методом МРТ изучать процессы роста и формирования семян, их проводящей системы, анализировать пути поступления питательных веществ. Не достигая высокого уровня разрешения, характерного для световой и электронной микроскопии, метод МРТ позволяет работать с растительными объектами при отсутствии артефактов, связанных с разрушением образца.

Работа выполнена при поддержке целевой программы "Развитие научного потенциала высшей школы" по проекту РНП. 2.1.1/2584.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александров В.Г. Анатомия растений. М.: Советская наука, 1954. 499 с.
- Анискин В.И., Сапрыкина Е.Г. О водопроницаемости семян кормовых бобов и люпина // Селекция и семеноводство. 1962. № 4. С. 18–22.
- Виноградова И.С., Фалалеев О.В. Применение магнитно-резонансной микротомографии для исследования внутреннего строения растений // Сельскохозяйственная биология. 2010а. № 3. С. 118–124.
- Виноградова И.С., Фалалеев О.В. Применение метода магнитно-резонансной микротомографии при изучении внутренней структуры семян бобовых культур // Вестник российской академии сельскохозяйственных наук. 2010б. № 6. С. 10–12.
- Коптюг И.В., Сагдеев Р.З. Современные физико-химические приложения ЯМР-томографии. Специфика метода и его применение для исследования объектов, содержащих жидкости // Успехи химии. 2002. Т. 71. № 7. С. 672–699.
- Ринки П.А. Магнитный резонанс в медицине / Пер. с англ. М.: Гэотар-Мед. 2003. 247 с.
- Физиология сельскохозяйственных растений. Том VI. Зернобобовые растения. Многолетние травы. Хлебные злаки. Под ред. Н.С. Туркова. М.: изд. МГУ, 1970. 654 с.
- Цингер Н.В. Семя, его развитие и физиологические свойства. М.: изд. АН СССР, 1958. 285 с.
- Эзау К. Анатомия семенных растений. Книга 2 / Пер. с англ. М.: Мир, 1980. 220–558 с.
- Яковлев Г.П. Бобовые земного шара. Ленинград: Наука, Ленинградское отделение, 1991. 123 с.
- Bailey I.W., Swamy B.G.L. The conduplicate carpel of dicotyledons and its initial trends of specification // Am. J. Botany. 1951. V. 38. P. 373–379.
- Blümich B., Kuhn W. Magnetic resonance microscopy: methods and application in materials science, agriculture and biomedicine. New York: VCH Publishers, 1992.
- Busse J.S., Evert R.F. Pattern of differentiation of the first vascular elements in the embryo and seedling of *Arabidopsis thaliana* // International Journal of Plant Science. 1999. V. 160. P. 1–13.

- Callaghan P.T. Principles of nuclear magnetic resonance microscopy. Oxford: Oxford University Press, 1991. 512 p.
- Chudek J.A., Hunter G. Magnetic resonance imaging of plants // Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. 1997. V. 31. P. 43–62.
- Ciobanu L., Webb A.G., Pennington C.H. Magnetic resonance imaging of biological cells // Progr. Nucl. Mag. Res. Sp. 2003. V. 42. P. 69–93.
- Connelly A., Lohman J.A.B., Loughman B.C. et al. High resolution imaging of plant tissue by NMR // J. Exp. Bot. 1987. V. 38. P. 1713–1723.
- Farrar T.C., Becker E.D. Pulse and Fourier transform NMR: introduction to theory and methods. New York: Academic Press, 1971.
- Foster M.P., Hutchinson J.M.S. Practical NMR imaging. Oxford: IRL Press, 1987.
- Garnczarska M., Zalewski T., Kempka M. Water uptake and distribution in germinating lupine seeds studied by magnetic resonance imaging and NMR spectroscopy // Physiologia Plantarum. 2007. V. 130. P. 23–32.
- Garnczarska M., Zalewski T., Wojtyla L. A comparative study of water distribution and dehydrin protein localization in maturing pea seeds // J. Plant Physiology. 2008. V. 165. P. 1940–1946.
- Glidewell S.M., Williamson B., Goodman B.A. et al. An NMR microscopic study of grape (*Vitis vinifera* L.) // Protoplasma. 1997. V. 198. P. 27–35.
- Glidewell S.M. NMR imaging of developing barley grains // Journal of Cereal Science. 2006. V. 43. P. 70–78.
- Goodman B.A., Williamson B., Chudek J.A. Nuclear magnetic resonance (NMR) micro-imaging of raspberry fruit: further studies on the origin of the image // New Phytologist. 1992. V. 122. P. 529–535.
- Gyngell M.L. The application of steady-state free precession in rapid 2DFT NMR imaging: FAST and CE-FAST sequences // Magnetic Resonance Imaging. 1988. V. 6. P. 415–419.
- Hausser K.H., Kalbitzer H.R. NMR in medicine and biology: structure determination, tomography, in vivo spectroscopy. Berlin, Heidelberg.: Springer-Verlag, 1991.
- Horigane A.K., Takahashi H., Maruyama S. et al. Water penetration into rice grains during soaking observed by gradient echo magnetic resonance imaging // Journal of Cereal Science. 2006. V. 44. P. 307–316.
- Ishida N., Koizumi M., Kano H. The NMR microscope: a unique and promising tool for plant science // Annals of Botany. 2000. V. 86. P. 259–278.
- Ishida N., Naito S., Kano H. Loss of moisture from harvested rice seeds on MRI // Magnetic Resonance Imaging. 2004. V. 22. P. 871–875.
- Kikuchi K., Koizumi M., Ishida N. et al. Water uptake by dry beans observed by micro-magnetic resonance imaging // Annals of Botany. 2006. V. 98. P. 545–553.
- Köckenberger W., Pope J.M., Xia Y. et al. A non-invasive measurement of phloem and xylem water flow in castor bean seedlings by nuclear magnetic resonance micro-imaging // Planta. 1997. V. 201. P. 53–63.
- Köckenberger W. Functional imaging of plants by magnetic resonance experiments // Trends in Plant Science. 2001. V. 6. № 7. P. 286–292.
- Köckenberger W., De Panfilis C., Santoro D. et al. High resolution NMR microscopy of plants and fungi // J. Microsc. 2004. V. 214. P. 182–189.
- Lauterbur P.C. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance // Nature. 1973. V. 242. P. 190–191.
- MacFall J.S., Johnson G.A. The architecture of plant vasculature and transport as seen with magnetic resonance microscopy // Canadian Journal of Botany. 1994. V. 72. P. 1561–1573.
- Manz B., Muller K., Kucera B. et al. Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated *in vivo* by nuclear magnetic resonance imaging // Plant Physiology. 2005. V. 138. P. 1538–1551.
- Morris P.G. Nuclear magnetic resonance imaging in medicine and biology. Oxford.: Clarendon Press, 1986. 278 P.
- Murray D.R. Nutritive role of seed coats in developing legume seeds // American Journal of Botany. 1987. V. 74. P. 1122–1137.
- Öpik H. Development of cotyledon cell structure in ripening *Phaseolus vulgaris* seeds // Journal of Experimental Botany. 1968. V. 19. № 58. P. 64–76.
- Pate J.S., Kuo J., Van Bel A.J.E. et al. Diurnal water balance of the cowpea fruit // Plant Physiol. 1985. V. 77. P. 148–156.
- Patrick J.W., Offler C.E. Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 551–564.
- Peoples M.B., Pate J.S., Atkins C.A. et al. Economy of water, carbon and nitrogen in the developing cowpea fruit // Plant Physiol. 1985. V. 77. P. 142–147.
- Pfeffer P.E., Gerasimowicz W.V. Nuclear magnetic resonance in agriculture. Boca Raton: CRC Press, 1989.
- Pietrzak L.N., Fregeau-reid J., Chatson B. et al. Observation on water distribution in soybean seed during hydration processes using nuclear magnetic resonance imaging // Canadian Journal of Plant Science. 2002. V. 82. P. 513–519.
- Reeve R.M., Brown M.S. Histological development of the green bean pod as related to culinary texture. 1. Early stages of pod development // J. of Food Science. 1968. V. 33 P. 321–326.
- Scheenen T.W.J., Van Dusschoten D., de Jager P.A. et al., Quantification of water transport in plants with NMR imaging // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. P. 1751–1759.
- Scheenen T.W.J., Vergeldt F.J., Heemskerk A.M. et al. Intact Plant Magnetic Resonance Imaging to Study Dynamics in Long-Distance Sap Flow-Conducting Surface Area // Plant Physiology. 2007. V. 144. P. 1157–1165.
- Sterling C. Development of the seed coat of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) // Bulletin of the Torrey botanical club. 1954. V. 81, № 4. P. 271–287.
- Thorne J.H. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds // Annual Review of Plant Physiology. 1985. V. 36. P. 317–343.
- Van As H., Scheenen T.W.J., Vergeldt F.J. MRI of intact plants // Photosynth. Res. 2009. V. 102. P. 213–222.
- Van Dongen J.T., Ammerlaan A.M.H., Wouterlood M. et al. Structure of the developing pea seed coat and the post-

- phloem transport pathway of nutrients // *Annals of Botany*. 2003. V. 91. P. 729–737.
- Verscht J., Kalusche B., Köhler J. et al. The kinetics of sucrose concentration in the phloem of individual vascular bundles of the *Ricinus communis* seedling measured by nuclear magnetic resonance microimaging // *Planta*. 1998. V. 205. P. 132–139.
- Weber H., Borisjuk L., Wobus U. Molecular physiology of legume seed development // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2005. V. 56. P. 253–279.
- Williamson B., Goodman B.A., Chudek J.A. et al. The vascular architecture of the fruit receptacle of red raspberry determined by 3D NMR microscopy and surfacerendering techniques // *New Phytologist*. 1994. V. 128. P. 39–44.
- Xia Y., Sarafis V., Campbell E.O. et al. Non invasive imaging of water flow in plants by NMR microscopy // *Protoplasma*. 1993. V. 173. P. 170–176.
- Zhang W.H., Zhou Y., Dibley K.E. et al. Nutrient loading in developing seeds // *Functional Plant Biology*. 2007. V. 34. P. 314–331.
- Zhou Y., Setz N., Niemietz C. et al. Aquaporins and unloading of phloem-imported water in coats of developing bean seeds // *Plant, Cell and Environment*. 2007. V. 30. P. 1566–1577.

## Formation of the Vascular System of Developing Bean (*Phaseolus limensis* L.) Seeds According to Nuclear Magnetic Resonance Microtomography

I. S. Vinogradova<sup>a</sup> and O. V. Falaleev<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Siberian State Technological University, pr. Mira 82, Krasnoyarsk, 660049 Russia

e-mail: vis@akadem.ru

<sup>b</sup> Kirenskii Institute of Physics, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok-50, 38, 660036 Russia

e-mail: falaleev\_ov@mail.ru

**Abstract**—<sup>1</sup>H magnetic resonance microtomography imaging was applied to study vascular systems in developing bean (*Phaseolus limensis* L.) seeds. Using the gradient echo method, we recorded 2D tomographic sections in the sagittal and axial planes of the fruits sampled from a vegetating plant on days 10, 17, 24, and 31 after fertilization. Any vascular connection between the tissues of maternal plant (bean pod and seed coat) and the embryo were undetectable. The embryo has an autonomous branched network of procambial strands in the cotyledons, converging to the embryonic axis. The bean pods are covered with a network of vascular bundles; large vascular strands run along the dorsal and ventral sutures. The seed coat vascular bundles are formed in the process of seed ripening and are represented by a developed vascular system multiply branching in the middle part of the ground parenchyma at the stage of physiological maturity. They are connected with the source of assimilates via the lateral pod veins and a large vascular bundle, entering the seed below the hilum via the placenta. Assimilates enter the external part of the seed coat, which contains no vascular bundles, via the funiculus vascular bundles and hilum tissue.

**Keywords:** <sup>1</sup>H magnetic resonance microtomography, lima bean (*Phaseolus limensis*) seeds, seed development and ripening, vascular bundles, transport of assimilates

## МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

УДК 591.3:591.481:597.5

### НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ КЛЕТОК ПЕРИВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЫ МОЗГА СИМЫ *Oncorhynchus masou* (SALMONIDAE)

© 2012 г. Е. В. Пущина<sup>1</sup>, Д. К. Обухов<sup>2</sup>, А. А. Вараксин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток  
690041 Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17

E-mail: puschina@mail.ru

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург  
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

Поступила в редакцию 09.12.10 г.  
Окончательный вариант получен 31.01.11 г.

Исследовали локализацию ГАМК, тирозингидроксилазы (ТН), NADPH-диафоразы, транскрипционного фактора Рах6 и пролиферативного ядерного антигена (PCNA) в перивентрикулярной области мозга симы *Oncorhynchus masou* различных возрастных групп. В промежуточном мозге, центральном сером слое дорсомедиального тегмента, продолговатом и спинном отделах мозга симы показано наличие гетерогенных популяций клеток с радиально ориентированными отростками. ТН-, ГАМК-иммунопозитивные и NADPH-d-позитивные клетки расположены в областях PCNA-иммуногенных пролиферативных зон. Возможно, эти клетки являются потомками радиальной глии и участвуют в росте и физиологической регенерации диэнцефалических и медуллярных структур. В разных возрастных группах симы маркирование ТН-, ГАМК, PCNA и Рах6 выявляет нейромерную конструкцию мозга.

**Ключевые слова:** радиальная глия, костистые рыбы, постнатальный нейрогенез, нейротрансмиттерная сигнализация, миграция, тирозингидроксилаза, ГАМК, развитие, Рах6, NADPH-диафораза, пролиферация.

У разных видов рыб, включая нейрогенетическую модель — данио *Danio rerio*, в головном мозге показано наличие пролиферативных перивентрикулярных областей (Zupanc, Horschke, 1995). Результаты недавних исследований на *Danio rerio* (Grandel et al., 2006) показали, что, новообразованные клетки двигаются от желудочка вглубь мозга, где они дифференцируются в нейроны. Интерес к исследованию этих процессов у рыб обусловлен тем, что радиальная глия (РГ) в большом количестве присутствует в их мозге во взрослом состоянии, поскольку мозг рыб продолжает расти на протяжении всей жизни (Zupanc, 2006). Несмотря на имеющиеся в литературе сведения, участие РГ в процессе нейрогенеза взрослых животных мало изучено. Одной из причин недостатка такой информации является отсутствие надежных маркеров РГ у низших позвоночных. Иммуногистохимические маркеры астроцитарной глии млекопитающих, такие как глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP), виментин (V) или протеин S-100 маркирует лишь отдельные клетки РГ рыб, а окрашивание часто ограничивается либо телом клетки, либо ее длинным отростком (Pelligrini et al., 2007). Наши предварительные исследования на симе показали, что в отличие от других видов

рыб ТН в мозге симы маркирует специфический тип перивентрикулярно расположенных клеток, имеющих длинные радиальные отростки. Такие клетки расположены вдоль просвета III желудочка и в каудальных областях мозга (Пущина, 2010). Сходную картину мы наблюдали при иммуномаркировании ГАМК (Pushchina, Obukhov, 2010). Другим нейрохимическим маркером перивентрикулярной глии в мозге костистых рыб является NADPH-диафораза, впервые описанная в перивентрикулярной зоне мозга солнечника (Ma, 1993).

Используя способность популяции перивентрикулярных клеток в мозге симы синтезировать ТН, ГАМК, NADPH-d мы решили исследовать области локализации данных маркеров и оценить изменения в ходе постнатального морфогенеза. В качестве маркера нейродетерминации (Wullmann, Muller, 2004) и “нейрогенетических ниш” (очагов постнатального нейрогенеза млекопитающих, см. Maekawa et al., 2005, Osumi et al., 2008) у симы был использован транскрипционный фактор Рах6. Для идентификации пролиферирующих клеток мы использовали пролиферативный ядерный антиген (Пущина и др., 2007).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования послужили трех- и шестимесячные сеголетки (по 20 экз.), годовики (20 экз.) и половозрелые (20 экз.) особи симы *Onchorhynchus masou* полученные с Рязановского экспериментально-производственного рыбоводного завода в 2009 г. Животных содержали в аквариумах с аэрируемой пресной водой при температуре 17–18°C; анестезировали, помещая в кювету с 1% раствором MS-222 на морской воде на 10–15 мин.

Гистохимическое исследование активности NADPH-d проводили в соответствии с общепринятой методикой (Hope, Vincent, 1989), адаптированной нами для головного мозга рыб (Пущина, 2007). Контрольные препараты помещали в среду с добавлением ингибитора NO-синтазы 10 мМ N-монометил-L-аргинина. Выявление ядерного антигена пролиферации (PCNA) проводили на парафиновых срезах мозга симы в соответствии с ранее описанной схемой (Пущина и др., 2007).

Иммуногистохимическое выявление ТН, ГАМК, и транскрипционного фактора Рахб проводили с помощью стандартного авидин-биотинового пероксидазного маркирования на свободноплавающих срезах. Срезы инкубировали с моноклональными антителами мыши против ГАМК (ICN, Biomedicals, USA), (1 : 5000), тирозингидроксилазы (Vector Laboratories, Burlingame, USA), (1 : 10000), с моноклональными антителами человека против транскрипционного фактора Рахб (Chemicon, USA) (1 : 4000), при температуре 4°C в течение 2 сут. Для визуализации иммуногистохимического маркирования использовали стандартный набор (Vectastain Elite ABC Kit, Burlingame, USA). Для выявления продуктов реакции использовали субстраты синего (ГАМК, Рахб) и красного (ТН) цветов (VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame, USA). Процесс окрашивания контролировали под микроскопом, срезы промывали в воде, монтировали на предметные стекла, обезвоживали по стандартной методике и заключали в бальзам. Препараты просматривали и фотографировали на микроскопе Axiovert Apotome.

Оценку специфичности иммуногистохимической реакции проводили методом негативного контроля. Срезы мозга, вместо первичных антител, инкубировали с 1% неиммунной сывороткой лошади в течение 1 сут и далее проводили как с первичными антителами. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

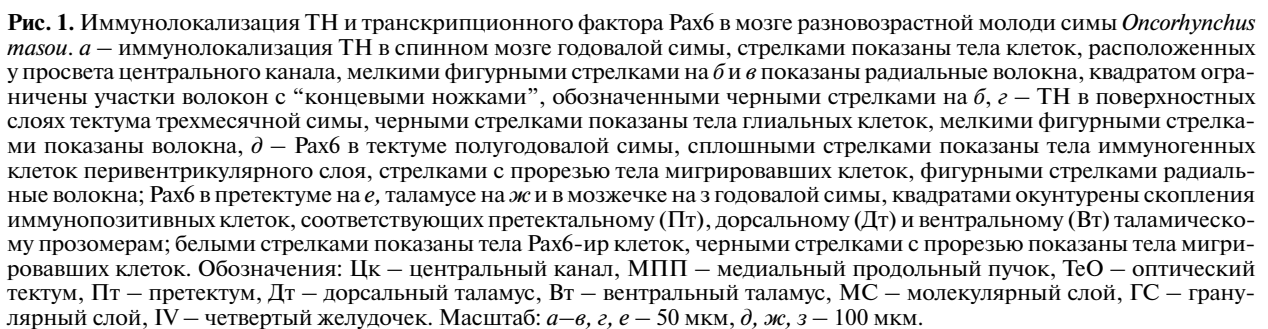
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

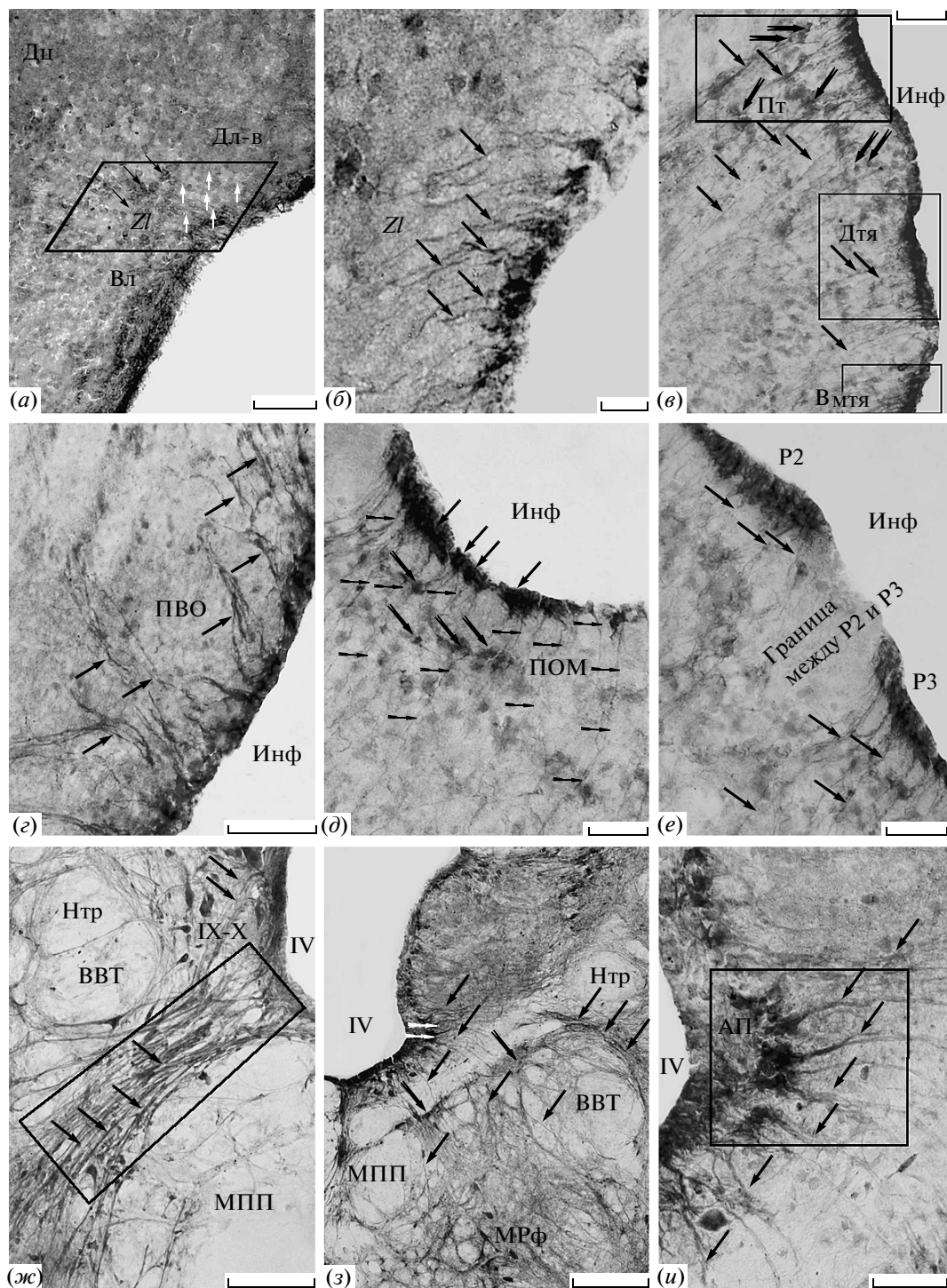
Верификация ГАМК, ТН, NADPH-d и Рахб в мозге симы выявила клетки, расположенные в перивентрикулярной зоне (ПВЗ) различных областей мозга. Результаты исследований мозга раз-

личных возрастных групп симы показали, что ГАМК, ТН и Рахб селективно маркирует перивентрикулярные клетки и волокна в диэнцефалоне, тектуме, мозжечке, продолговатом мозге и спинном мозге. Паттерны распределения данных иммуномаркеров соответствуют нейромерной организации мозга симы. На границах первых трех прозомеров, включающих претектум (P1), дорсальный таламус (P2) и вентральный таламус (P3), и ромбомеров продолговатого мозга иммуномаркирование ГАМК, ТН и Рахб отсутствовало.

В спинном мозге годовалой молодежи симы ТН маркировала тела клеток, расположенных у центрального канала и радиально ориентированные волокна, которые на периферии спинного мозга формировали характерные “концевые ножки” (рис. 1, а–в). Иммуногистохимическое (ИГХ) маркирование транскрипционного фактора Рахб и ТН показало наличие иммунореактивной глии в поверхностных слоях тектума у 3-х и 6 месячной молодежи, а также в перивентрикулярном и центральном фиброзном слоях (рис. 1, г, д). Маркирование Рахб у годовалой симы позволило идентифицировать P1–P3 прозомеры, включающие претектум (P1), дорсальный таламус (P2) и вентральный таламус (P3) (рис. 1, е, ж). В мозжечке годовалой симы Рахб-ир клетки были выявлены в области ганглионарного слоя (рис. 1, з). Наибольшая плотность ГАМК-ир волокон и клеточных тел была выявлена в диэнцефалоне полугодовалой симы.

У взрослых особей симы ТН маркирует клетки с радиально ориентированными отростками в области *zona limitans* – границе отделяющей паллиальную часть конечного мозга от субпаллиальной (рис. 2, а, б). В перивентрикулярных областях промежуточного мозга ТН маркирует клетки с радиально ориентированными отростками, расположенные вдоль всего инфундибулюма; в дорсальной области диэнцефалона – на территории претектума, дорсальных и вентро-медиальных ядер таламуса (рис. 2, в), передней части паравентрикулярного органа (рис. 2, г). В вентральной области – в мелкоклеточной части преоптического ядра (рис. 2, д) и переднетуберального ядра. В промежуточном мозге маркирование ТН идентифицировало границы прозомеров (рис. 2, е). В продолговатом мозге симы ТН маркирует клетки с их длинными отростками вокруг медиального продольного пучка (рис. 2, ж) и вентромедиальном медуллярном сегменте (рис. 2, з). Наиболее крупное скопление ТН-ир клеток и радиально ориентированных волокон в продолговатом мозге симы выявлено в интерфасцикулярной области (рис. 2, ж). В каудальных областях ТН маркирует перивентрикулярные клетки с радиальными отростками в субвентрикулярной области на территории ядер IX–X черепно-мозговых нервов (рис. 2, ж). Иммунопозитивные клетки сходной морфологии были выявлены в медиальной и латеральной обла-





стях *area postrema* (рис. 2, *и*) и межпучковой области спинного мозга.

Иммунолокализация ГАМК в перивентрикулярных областях промежуточного мозга сходна с распределением ТН. ГАМК-ир клетки и радиальные тонкие волокна были выявлены вдоль инфундибулярного просвета, в области крупно- и мелко-клеточной частей преоптического ядра (рис. 3, *а*),

дорсальных таламических ядер (рис. 3, *б*), паравентрикулярного органа и переднотуберального ядра (рис. 3, *в*), дорсального и вентрального таламуса и перивентрикулярного претектума (рис. 3, *г*). Иммунолокализация ГАМК в перивентрикулярной области промежуточного мозга позволила верифицировать границы переднемозговых прозомеров (рис. 3, *г*). В среднем мозге ГАМК-ир клетки и радиальные волокна были выявлены в области

**Рис. 2.** Иммунолокализация ТН в мозге симы *Oncorhynchus masou*. а — иммунопозитивные клетки (черные стрелки) и радиальные волокна (белые стрелки) в области *zona limitans*, Дл — вентральный сегмент дорсо-латеральной области, Вл — вентро-латеральная область, б — клетки с радиальными отростками под большим увеличением (черные стрелки), в — перивентрикулярная область дорсального таламуса, прямоугольниками околнурены претектальный регион (Пт), дорсальные таламические ядра (Дтя) и вентромедиальные таламические ядра (Вмтя), черными стрелками показаны волокна, стрелками с прорезью показаны мигрировавшие клетки, г — перивентрикулярный участок паравентрикулярного органа (ПВО), д — мелкоячеистая часть преоптической области (ПОМ), фигурные стрелки показывают радиальные волокна, черные сплошные стрелки — перивентрикулярные тела ТН-ир клеток, е — граница между переднемозговыми нейронами Р2 и Р3 на которой отсутствует иммуномаркирование ТН, ж — интерфасцикулярный сегмент продолговатого мозга (околнурен прямоугольником), стрелками показаны радиальные волокна, з — вентромедиальный медуллярный сегмент, стрелки с прорезью показывают мигрировавшие клетки, и — клетки с радиальными отростками в вентро-медиальной области *area postrema* (околнурена прямоугольником). Обозначения: Нтр — нисходящий путь тройничного нерва, Ввт — вторичный вкусовой тракт, IX-X — ядра языкоглоточного и блуждающего нервов, МРФ — медиальная ретикулярная формация, Инф — инфундибулум, Зл — *zona limitans*, Ап — *area postrema*, остальные обозначения, как на рис. 1. Масштаб: а, г, ж — 100 мкм, б — 20 мкм, в, д, е, и — 50 мкм, з — 200 мкм.

дорсо-медиального тегмента (рис. 3, д) и полулунного валика. В продолговатом мозге ГАМК-ир элементы и тонкие радиальные волокна обнаружены в межпучковой области ретикулярной формации (рис. 3, е), на территории ядер IX-X нервов (рис. 3, ж), в дорсальной части *area postrema*, среди нейронов вентральной спинномозговой колонны (рис. 3, з).

При гистохимическом маркировании NADPH-d в мозге трехгодовалой симы в области перивентрикулярного диэнцефалона, центрального серого слоя продолговатого мозга, тектуме, базальном мезэнцефалоне, мозжечковой заслонке, были выявлены клетки, имеющие радиальные отростки с высокой активностью NADPH-диафоразы (рис. 4). Роstralно расположенная популяция NADPH-d-позитивных клеток была обнаружена в мелкоячеистой преоптической области перивентрикулярного диэнцефалона (рис. 4, а). Мезэнцефалические скопления клеток глии обнаружены в области базального тегмента и поверхностных слоях тектума (рис. 4, б). В мозжечке NADPH-d-позитивные радиальные волокна обнаружены в медиальной части заслонки (рис. 4, в). Каудальные NADPH-d-позитивные скопления перивентрикулярных клеток симы были выявлены в субвентрикулярной области на территории ядер V, VII, IX-X черепномозговых нервов (рис. 4, г). В отличие от ТН- и ГАМК-иммуногенных элементов в этих же областях, NADPH-d-позитивные клетки имели отростки различной длины, а некоторые клетки вообще не имели отростков. Другая популяция мелких NADPH-d-позитивных клеток была выявлена вокруг медиального продольного пучка (рис. 4, г, д), на территории медиальной ретикулярной формации (рис. 4, д) и постригеминальной клеточной группы центрального серого слоя (рис. 4, е, ж).

Маркирование транскрипционного фактора Рахб в мозге взрослой симы существенно отличалось от иммунолокализации этого маркера у молодки (рис. 5). В промежуточном и продолговатом отделах мозга полугодовалой симы были выявлены скопления Рахб-ир клеток, их распределение соот-

ветствовало распределению дорсальных переднемозговых Р2-Р3 прозомеров и ромбомеров (рис. 5, а, б). У взрослой симы Рахб-ир клетки были выявлены в перивентрикулярном диэнцефалоне в области дорсальных и вентромедиальных таламических ядер, переднего таламического ядра, а на участках между дорсальным и вентральным таламусом были обнаружены волокна (рис. 5, в). Каудальнее Рахб-ир клетки и волокна были выявлены вдоль инфундибулярного просвета в составе паравентрикулярного органа и переднетуберального ядра (рис. 5, г). На границе Р2 и Р3 нейромеров были выявлены Рахб-ир клетки и длинные волокна, вдоль которых распространялись мелкие слабо маркированные Рахб клетки (рис. 5, д). В среднем мозге в области дорсального тегмента и мезэнцефалического центрального серого слоя обнаружено множество мелких Рахб-ир клеток и радиально ориентированных крупных волокон, организованных в пучки (рис. 5, е), вдоль которых были рассредоточены многочисленные мелкие Рахб-ир клетки (рис. 5, ж). Большинство мезэнцефалических пучков Рахб-ир волокон были направлены в область ретикулярной формации.

Маркирование PCNA в перивентрикулярных областях промежуточного и продолговатого мозга сеголеток, годовиков и взрослых особей симы выявило обширную популяцию пролиферирующих клеток (рис. 6, а, в-д). На уровне диэнцефалона и ромбэнцефалона распределение ТН-ир клеток соответствует нейромерной конструкции мозга, подтверждающейся также при маркировании пролиферативных зон с помощью PCNA (рис. 6, б, ж). В промежуточном мозге расположение пролиферативных PCNA-иммуногенных зон соответствует прозомерной конструкции переднего мозга (рис. 6, в). На границе между дорсальными прозомерами Р1-Р3 иммунопозитивное маркирование ТН и PCNA отсутствует (рис. 6, б, в). В продолговатом мозге годовалой и взрослой симы PCNA-ир клетки были расположены на дне ромбовидной ямки роstralно, на уровне V-VII пар черепномозговых нервов (рис. 6, г, д). У симы этих же воз-

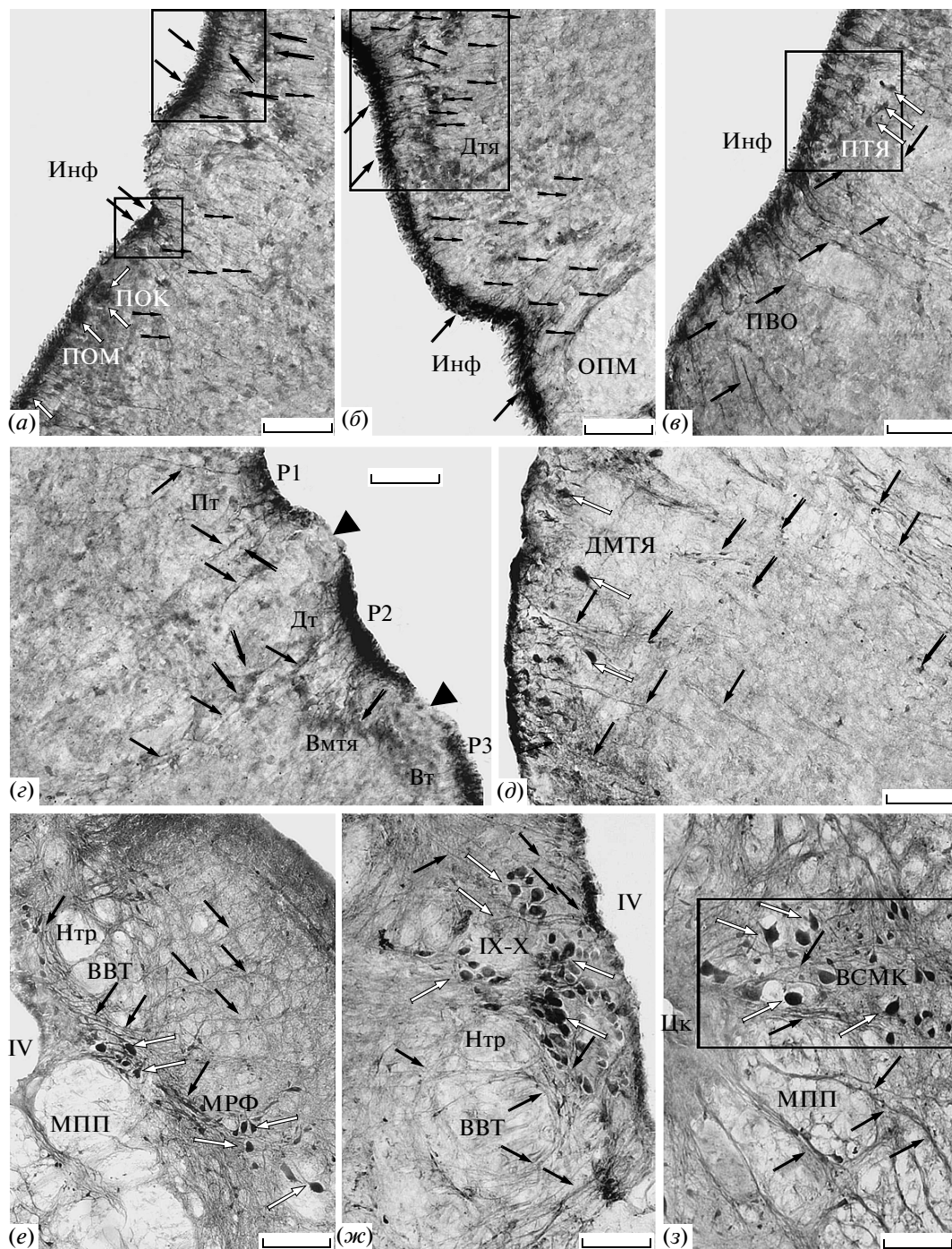


**Рис. 3.** Иммулокализация ГАМК в мозге сиры *Oncorhynchus masou*. *а* – кластеры иммунопозитивных клеток с радиальными отростками (оконтурены квадратами) в преоптической области, белыми стрелками показаны нейроны крупноклеточного (ПОК) и мелкоклеточного (ПОМ) ядер, черными стрелками – тела, фигурными стрелками – радиальные волокна, стрелками с пререзью мигрировавшие клетки, *б* – перивентрикулярные ГАМК-ир элементы в области дорсального таламуса, *в* – паравентрикулярного органа, клетки переднетуберального ядра (оконтурено квадратом) обозначены белыми стрелками, *г* – клетки с радиальными отростками в составе переднемозговых нейромеров Р1, Р2 и Р3 на границе которых (черные острия стрелок) отсутствует иммуномаркирование ГАМК, радиальные волокна (черные стрелки), мигрировавшие клетки в составе претектума (Пт), дорсального таламуса (Дт) и вентро-медиальных ядер таламуса (Вмтя) показаны стрелками с пререзью, *д* – радиальные отростки (черные стрелки) в составе дорсомедиального тегмента, белыми стрелками показаны крупные нейроны дорсомедиального тегментального ядра (ДМТЯ), *е* – радиальные волокна в межпучковой области (черные стрелки), иммунопозитивные клетки МРФ показаны белыми стрелками, *ж* – клетки с радиальными отростками на территории ядер IX–X черепно-мозговых нервов (нейроны показаны белыми стрелками), *з* – радиальные волокна на территории спинного мозга (тела нейронов показаны белыми стрелками). Обозначения: ОПМ – отогнутый пучок Мейнерта, ПТЯ – переднетуберальное ядро, ВСМК – вентральная спинномозговая колонна, остальные обозначения, как на рис. 1 и 2. Масштаб: *а–г, ж, з* – 100 мкм, *д, е* – 200 мкм.

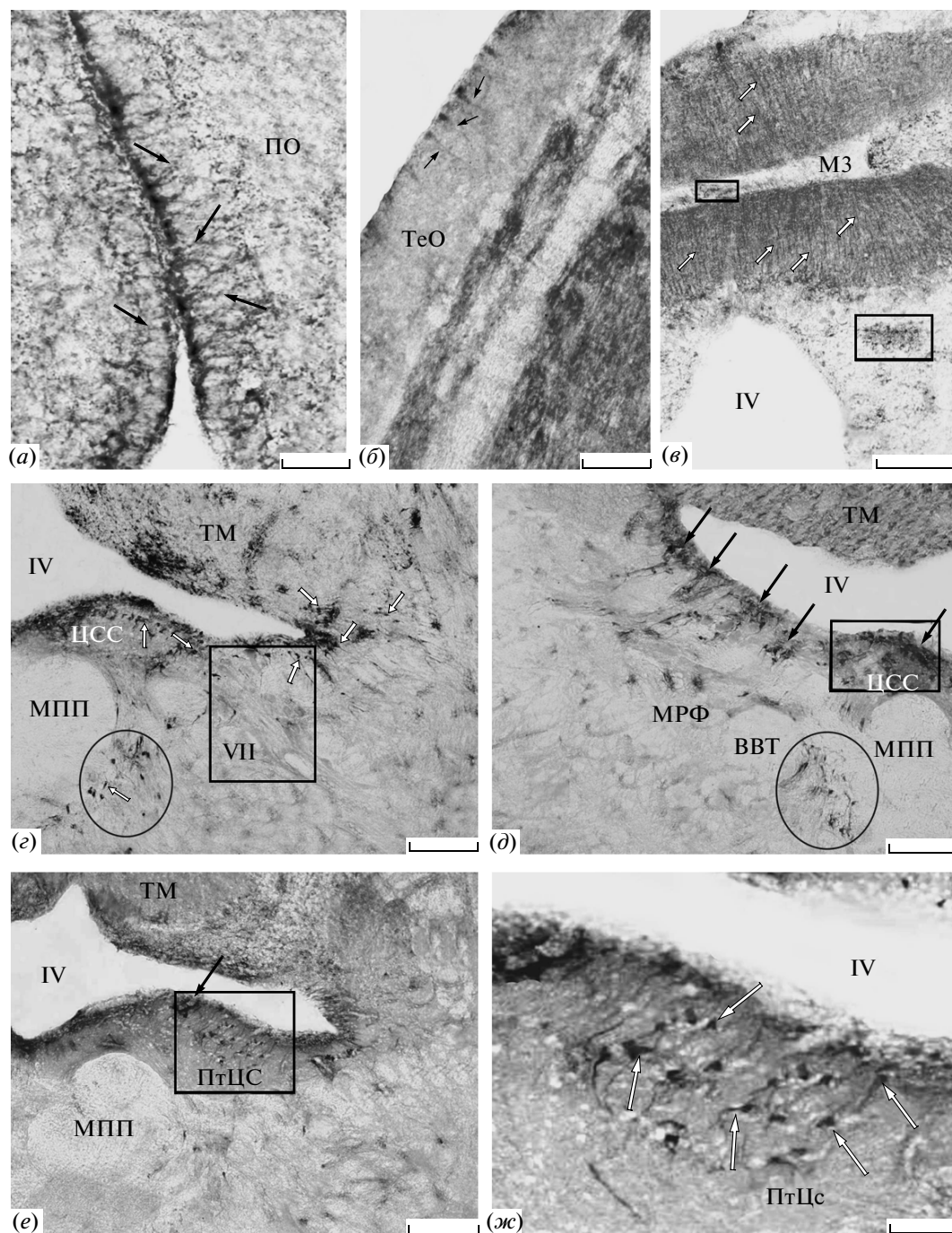


**Рис. 4.** Локализация NADPH-d в мозге симы *Oncorhynchus masou*. *a* — перивентрикулярные глиоподобные клетки в мелкоклеточной преоптической области (черные стрелки), в поверхностных слоях тектума на *б*, радиальные волокна в медиальной части мозжечковой заслонки (МЗ) на *в*, волокна показаны белыми стрелками, прямоугольниками околнурены комплексы сосудов и периваскулярной глии, *г* — перивентрикулярные клетки в центральном сером слое (ЦСС) субвентрикулярной области на территории ядра лицевого нерва (NADPH-d-негативное ядро VII околнурено прямоугольником), в овале прилежащее к медиальному продольному пучку скопление NADPH-d-позитивных клеток (белые стрелки), *д* — кластеры перивентрикулярных клеток (черные стрелки) ЦСС на территории ретикулярной формации, в квадрате кластер NADPH-d-позитивных клеток, прилежащий к сосуду, *е* — перивентрикулярные клетки на территории постригеминальной группы центрального серого слоя (в квадрате), стрелками показаны сосуды, *ж* — постригеминальная группа перивентрикулярной глии (белые стрелки) на большом увеличении. Обозначения: ПО — преоптическая область, ТМ — тело мозжечка, ПтЦс — постригеминальная группа центрального серого слоя, остальные обозначения, как на рис. 1–3. Масштаб: *а, ж* — 50 мкм, *б* — 20 мкм, *в–е* — 200 мкм.

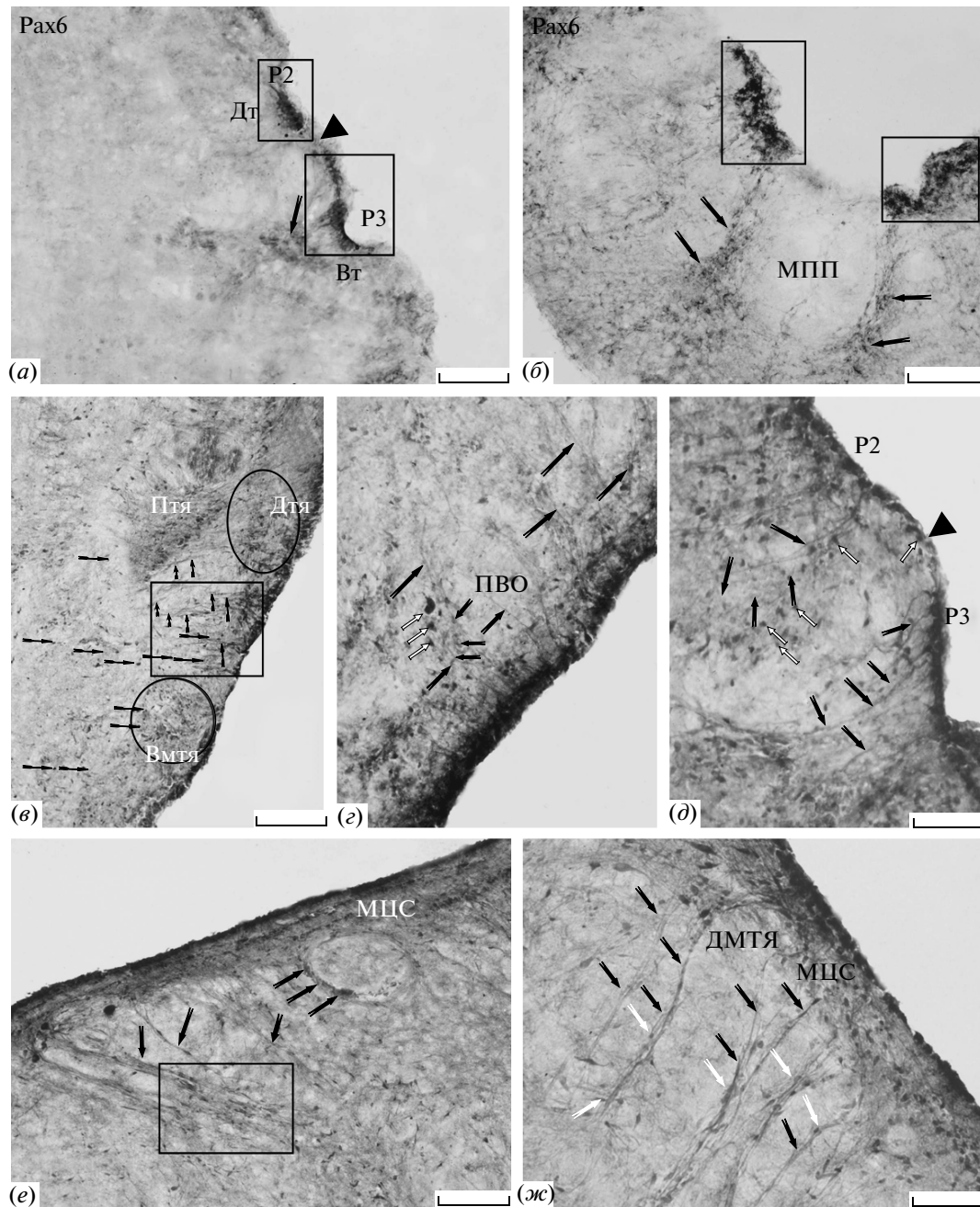


**Рис. 5.** Иммунолокализация транскрипционного фактора Pax6 в мозге 6-месячной молоди (а, б) и взрослой (в–ж) симы *Oncorhynchus masou*. Скопления иммунопозитивных клеток в промежуточном на а и продолговатом на б отделах мозга (в прямоугольниках) маркирует его нейромерную структуру, участки лишенные иммуномечения являются границами переднемозговых Р2 и Р3 нейромеров (черное острое стрелки), стрелки с прорезью показывают скопления мигрировавших клеток, в – маркирование Pax6 в перивентрикулярных ядрах таламуса, овалами околнурены кластеры детерминированных Pax6-ир клеток, лишенных отростков (мелкие фигурные стрелки) в составе дорсальных и вентромедиальных ядер таламуса, разделенных участком (в прямоугольнике), содержащим радиальные волокна (черные стрелки), г – иммунопозитивные клетки (белые стрелки) и волокна (черные стрелки) в составе паравентрикулярного органа, мигрировавшие слабо маркированные Pax6 клетки обозначены стрелками с прорезью, д – Pax6-ир клетки и волокна на границе переднемозговых нейромеров Р2 и Р3, участок лишенный волокон отмечен черным острым стрелки, е – Pax6-ир комплексы в области мезенцефалического центрального серого слоя дорсального тегмента, пучки центростремительных волокон (черные стрелки) вдоль которых рассредоточены мелкие Pax6-ир клетки (околнурены прямоугольником), скопления мелких Pax6-ир клеток вокруг крупного мезенцефалического тракта показано стрелками с прорезью, ж – Pax6-ир комплексы в области дорсомедиальных ядер тегмента (ДМТЯ), пучки волокон показаны черными стрелками, мигрирующие вдоль них клетки – белыми стрелками. Обозначения: МЦС – мезенцефалический центральный серый слой, Птя – переднее таламическое ядро, остальные обозначения, как на рис. 1–4. Масштаб: а, г, д, ж – 100 мкм, б, в, е – 200 мкм.

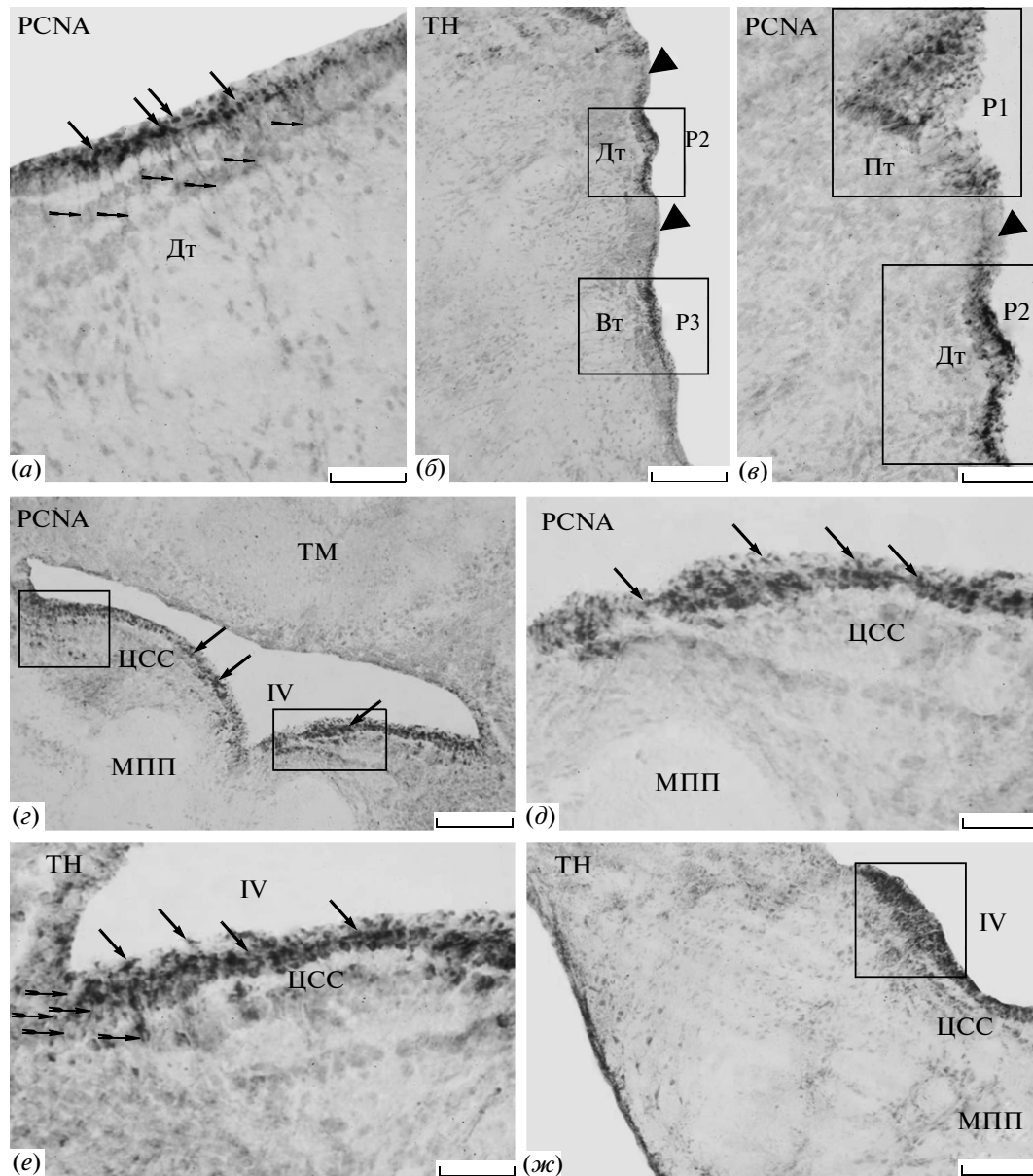


**Рис. 6.** Иммулокализация PCNA и TH в мозге разновозрастной симы *Oncorhynchus masou*. *а* – PCNA-ир клетки в дорсальном таламусе взрослой симы, черными стрелками показаны тела иммунопозитивных нейронов, фигурными стрелками показаны радиальные отростки, *б* – кластеры TH-ир клеток годовалой симы в составе дорсального и вентрального таламических нейромеров (P2 и P3) разделенные иммунонегативной зоной (черное острое стрелки), *в* – PCNA-ир пре-текстальный (P1) и дорсально таламический нейромеры (P2) взрослой симы, *г* – PCNA-ир пролиферативная зона на территории центрального серого слоя продолговатого мозга годовалой симы, *д* – PCNA-иммунопозитивные клетки в продолговатом мозге взрослой симы (показаны стрелками), *е* – TH-иммунопозитивные клетки и радиальные волокна (фигурные стрелки) в составе ЦСС годовалой симы, *ж* – скопление TH-ир клеток (оконтурены квадратом) в каудальной части продолговатого мозга годовалой симы. Масштаб: *а, в, д, е* – 100 мкм, *б, г, ж* – 200 мкм.

растных групп была обнаружена сходная иммунолокализация TH (рис. 6, *е, ж*).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что в перивентрикулярной зоне диэнцефалического, мезенцефалического, медуллярного и

спинного отделов мозга симы локализована гетерогенная в морфологическом и нейрохимическом отношении популяция клеток, часть которых имеет отростки и способна продуцировать TH, ГАМК NADPH-d. Ранее у рыб в перивентрикулярных областях разных отделов головного мозга было показано наличие пролиферативных зон (Extröm et al., 2001; Pellegrini et al., 2007), где молодые клетки

двигаются по направлению от желудочка вглубь мозга, дифференцируясь в нейроны и глию. Результаты настоящего исследования показывают, что у симы в разные возрастные периоды существуют пролиферативные зоны. В этих зонах, расположенных на территории промежуточного и продолговатого мозга были выявлены клетки, экспрессирующие TH, ГАМК и NADPH-d. Мы полагаем, что клетки экспрессирующие данные нейромаркеры являются вновь образованными из радиальной глии нейронами. Возможно, что за счет этих клеток происходит рост диэнцефалических, мезенцефалических и медуллярных структур мозга симы и их физиологическая регенерация.

В настоящее время установлено, что нейроны вскоре после образования из клеток-предшественников и задолго до формирования межнейронных связей и синаптогенеза начинают секретировать характерные для них сигнальные молекулы (Ugrumov, 2010). Сигнальные молекулы участвуют в аутокринной и паракринной регуляции дифференцировки нейронов-мишеней, выступая в качестве транскрипционных и/или морфогенетических факторов. В исследованиях на млекопитающих доказано долгосрочное морфогенетическое влияние на дифференцировку нейронов-мишеней и экспрессию специфического фенотипа (Ugrumov, 2009, 2010). Показано, что молекулы нейротрансмиттеров, оказывают существенное влияние на развитие клеток в течение эмбриогенеза (Platel et al., 2007), а также в ходе постэмбрионального нейрогенеза субгранулярной зоны зубчатой извилины медиальной и нижней поверхности полушария большого мозга (Cameron et al., 1995; Aniol, Stepanichev, 2007). В последнее время появляются сведения о том, что нейротрансмиттеры регулируют постнатальный нейрогенез в субвентрикулярной области головного мозга у различных позвоночных животных. Для некоторых нейротрансмиттеров установлены сигнальные механизмы, включающие рецепторы, источники высвобождения и молекулы-переносчики (Aniol, Stepanichev, 2007; Platel et al., 2010). Результаты проведенных нами исследований позволяют предполагать, что в промежуточном и продолговатом отделах мозга симы TH, ГАМК и NADPH-d могут выступать в качестве сигнальных молекул, регулирующих процессы постэмбрионального нейрогенеза.

Субвентрикулярная зона (СВЗ) млекопитающих образована различными типами клеток, включающими астроцито-подобные клетки, обладающие свойствами нейрональных стволовых клеток. В ходе эмбриогенеза млекопитающих ГАМК-сигнализация обеспечивает двусторонние связи между астроцито-подобными клетками и нейробластами (Platel et al., 2010). Показано, что в мозге взрослых млекопитающих ГАМК регулирует процессы постэмбрионального нейрогенеза (Aniol, Stepanichev, 2007). У рыб было показано участие

ГАМК в эмбриональном и раннем постэмбриональном развитии головного мозга (Extröm, Ohlin, 1995), а участие в процессах постэмбрионального нейрогенеза (adult neurogenesis) ранее описано не было. ГАМК является важнейшим тормозным нейромедиатором в мозге позвоночных. Однако, помимо роли классического нейромедиатора, ГАМК наряду с глутаматом, серотонином, дофамином и норадреналином обладает нейротрофической активностью в ходе онтогенеза (Madtes, Redburn, 1983). В экспериментах *in situ* и *in vitro* на сетчатке и мозжечке млекопитающих показано участие ГАМК в качестве трофического фактора (Madtes, Redburn, 1983). ГАМК модулирует рост аксонов у тектальных и кортикальных нейронов цыпленка и крысы (Michler-Stuke, Wolff, 1987; Michler, Wolff, 1988). В раннем онтогенезе ГАМК деполаризует новорожденные клетки зубчатой формации гиппокампа и мигрирующие клетки-предшественники, поскольку в них высока внутриклеточная концентрация хлоридных ионов (Overstreet Wadiche et al., 2005). Внешняя ГАМК-индуцированная деполаризация и приток ионов кальция необходимы для начала роста дендритов и их удлинения в образованных постнатально обонятельных интернейронах (Gascon et al., 2006). Прекращение ГАМК-ергической деполаризации на гиперполяризацию с помощью нокаутирования хлоридного импортера NKCC1 в прогениторных клетках субгранулярной зоны гиппокампа уменьшает дендритную арборизацию и приостанавливает формирование синапсов (Ge et al., 2006).

Вопрос о том, образуются ли ГАМК-ергические клетки в процессе постэмбрионального развития у рыб в настоящее время остается открытым. В ранее проведенных исследованиях на трехиглой колюшке *Gasterosteus aculeatus* рассматривалось развитие ГАМК-ергических нейронов в ходе раннего онтогенеза (Extröm, Ohlin, 1995). В течение более поздних эмбриональных стадий и раннего личиночного развития количество ГАМК-ергических нейронов в мозге колюшки неуклонно возрастало до заполнения ими фактически всех переднемозговых ядер (Extröm, Ohlin, 1995). Было показано, что в возрасте 1 месяца ГАМК иммунолокализация перемещается из тел нейронов и трактов в так называемое “нейропильное окрашивание” (Extröm, Ohlin, 1995). В наших исследованиях на полугодовалой и годовой молодежи симы выявлены похожие изменения иммунолокализации ГАМК. Исследования распределения ГАМК-ергических нейронов в переднем мозге взрослой золотой рыбки (Martinoli et al., 1990) и угря (Medina et al., 1994), показали, что у обоих видов ГАМК-ергические нейроны присутствуют вдоль всего теленцефалона и диэнцефалона. У этих видов множество медиально расположенных клеток обнаружено в дорсальном и вентральном теленцефалоне, а в латеральных и задних областях количество клеток бы-

ло значительно снижено. Преоптический, перивентрикулярный гипоталамический регионы, таламические и претектальные ядра золотой рыбки и угря, как и у взрослой симы, содержит многочисленные ГАМК-ергические клетки. Интересно, что у этих видов, как и у симы наибольшая плотность распределения ГАМК-ергических клеток выявлена в медиальной области, прилежащей к просвету желудочка. Из-за отсутствия данных о времени формирования ядер в этой области мозга рыб сведения о распределении ГАМК в эмбриональном мозге не могут быть экстраполированы на взрослых животных и, следовательно, выводы о том, что эмбриональные ГАМК-ергические ядра могут позднее трансформироваться в ГАМК-ергические структуры взрослых животных носят спекулятивный характер. Тем не менее, некоторые авторы (Extröm, Ohlin, 1995) заключают, что все ГАМК-ергические кластеры выявленные в переднем мозге колюшки на стадии 101 ч развития присутствуют и у взрослых особей золотой рыбки и угря. Исключение составляют ликвороконтактирующие ГАМК-ир нейроны, окружающие 3-й желудочек на уровне гипоталамуса, выявленные у эмбриона колюшки. Такие нейроны не обнаружены во взрослом мозге золотой рыбки. Их появление в мозге эмбрионов колюшки считается транзитным, а функциональное значение этого явления в настоящее время неизвестно.

У молодых и взрослой симы иммунолокализация ГАМК была выявлена в клетках перивентрикулярной области и радиальных волокнах промежуточного мозга, среднемозгового тегмента, перивентрикулярного серого слоя продолговатого мозга, интерфасцикулярной области, ядер IX–X пары черепно-мозговых нервов, *area postrema* и вентральной спинномозговой колонны. Мы предполагаем, что у симы в перивентрикулярной области диэнцефалического, мезенцефалического, медуллярного и спинального отделов сохраняются ГАМК-ергические нейроны, имеющие признаки фетальной организации. Мы полагаем, что эти клетки могут являться потомками радиальной глии.

В промежуточном, продолговатом, спинном отделах мозга и тектуме годовалой молодой симы в перивентрикулярных клетках определяется ТН. У взрослых особей симы ТН маркирует перивентрикулярные клетки с радиально ориентированными отростками в промежуточном и продолговатом отделах, что ранее не было показано для рыб. Во всех возрастных группах маркирование ТН выявляло нейромерную конструкцию мозга симы.

У взрослых особей симы маркирование ТН было обнаружено на границе отделяющей паллиальную часть полушарий конечного мозга от субпаллиальной. Это согласуется с данными, полученными на *Danio rerio*, где было показано наличие ТН-иммунореактивных потомков нейробластов,

мигрировавших в составе ростральной миграционной волны (Adolf et al., 2006). ТН-иммунопозитивные элементы, напоминающие радиальную глию, были локализованы в ростральных областях спинного мозга, где наиболее отчетливо представлены главные нейроморфологические признаки клеток этого типа по классификации Ракича (Rakic, 2007). В настоящее время показано, что ТН может выступать в качестве морфогенетического или транскрипционного фактора в определенные периоды онтогенеза, оказывая долгосрочное влияние на дифференцировку некатехоламинергических нейронов и экспрессию их фенотипа (Ugrumov, 2010). Предполагаемым механизмом такого воздействия ТН является наличие дофаминергических  $D_1$ – $D_3$  рецепторов у клеток-мишеней (Callier et al., 2003). Методами автордиографии и гибридизации *in situ* было показано, что в СВЗ эмбрионов и взрослых животных содержится высокий уровень  $D_3$  рецепторов (Diaz et al., 1997). Рецепторы  $D_2$  типа были выявлены у клеток переходного (transit-amplifying) типа, а  $D_1$  и  $D_2$  рецепторы обнаружены у нейробластов (Hoglinger et al., 2004). Несмотря на то, что некоторые нейробласты из СВЗ млекопитающих дифференцируются в дофаминергические интернейроны обонятельной луковицы, они не экспрессируют ТН (Baker et al., 2001). Этот фермент не был обнаружен и у других типов клеток СВЗ млекопитающих. Тем не менее, было показано, что дофамин выделяется из афферентов *substantia nigra*, которые контактируют с клетками переходного типа субвентрикулярной зоны (Hoglinger et al., 2004). Поскольку в настоящее время распределение дофаминергических рецепторов в головном мозге рыб ограничивается данными по  $D_1$  рецепторам лишь на одном виде (Kapsimali et al., 2000), а иммунолокализация ТН в переднемозговом отделе рыб имеет существенные отличия от таковой млекопитающих (Meek, 1994; Wullmann, Rink, 2001; Пушина, 2009), не исключено, что высокое содержание ТН в перивентрикулярных клетках с радиальными отростками у симы, является примером альтернативного адаптационного механизма, функциональная роль которого на сегодняшний день не известна. Мы предполагаем, что обнаруженные нами перивентрикулярные ТН-ир клетки у симы могут являться потомками радиальной глии. Согласно другому предположению перивентрикулярные ТН-ир клетки симы могут соответствовать так называемым моноэнзиматическим нейронам млекопитающих (Ugrumov, 2009). Такие клетки очень многочисленны, широко распространены в период эмбриогенеза и имеют высокий уровень активности ТН. Моноэнзиматические клетки млекопитающих являются источником метаболического предшественника дофамина — 1-3,4-дигидроксифенилаланина (L-DOPA), синтезируемого тирозингидроксилазой в ТН-ир нейронах и выступающего в

качестве нейротрансмиттера/нейромодулятора, воздействуя на клетки-мишени через катехолами-нергические рецепторы.

В настоящее время Pax6 рассматривается как высоко консервативный транскрипционный фактор, играющий существенную роль в процессах развития ЦНС позвоночных, включая формирование нервной трубки, миграцию нейронов и образование нейронных сетей (Osumi et al., 2008). НСК экспрессируют Pax6 как на начальных стадиях развития ЦНС, так и в течение всей жизни в областях постнатального нейрогенеза – “нейрогенетических нишах” (Götz et al., 1998; Osumi et al., 2008). Семейство генов Pax6 экспрессируется главным образом в клетках митотической вентрикулярной зоны кортекса (Puelles et al., 2000), где эти гены контролируют развитие РГ, и ее воспроизводство путем асимметричных митозов (Götz et al., 1998). Фактор Pax6 контролирует распределение глутаматергических нейронов во все слои коры, которое осуществляется с помощью клеток РГ (Heins et al., 2002). Более специфическим, считается участие генов Pax6 в регуляции региональной специализации клеток-предшественников в вентролатеральной коре (Stoykova et al., 2000). Детальное исследование и описание паттернов экспрессии Pax6 в эмбриогенезе данио (Wullmann, Rink, 2001), показало, что большинство переднемозговых доменов экспрессирующих Pax6 соответствуют миграционному потоку, описанному в области паллиально-субпаллиальной границы амниот. Однако экспрессия Pax6 в пролиферирующих клетках РГ, расположенных перивентрикулярно в паллиуме мыши, в том числе изокортексе (Götz et al., 1998), не была обнаружена в развивающемся паллиуме данио (Wullmann, Rink, 2001). Следовательно, некоторые функции Pax6 в развивающемся мозге данио, такие как ингибирование субпаллиальной клеточной миграции в паллиум при участии Pax6 (Charouton et al., 1999) или же региональная специализация клеток-предшественников в вентролатеральном кортексе (Stoykova et al., 2000) встречается и у млекопитающих и у телеостей и, возможно, характерна вообще для всех позвоночных. Другие же функции Pax6, такие как контролирование внутрипаллиальной радиальной миграции нейронов посредством Pax6-ир РГ, могут быть характерными для амниот или даже исключительно для млекопитающих. В настоящее время установлено, что фактор Pax6 экспрессируется в постнатальный период нейронами различных областей головного мозга, включающих обонятельную луковицу, миндалину, таламус и мозжечок (Osumi et al., 2008). Умеренная экспрессия Pax6 обнаружена в субгранулярной зоне гиппокампа (Maekawa et al., 2005) и эпендимном слое субвентрикулярной зоны латерального желудочка (Kohwi et al., 2005) – областях мозга млекопитающих в которых нейрогенез продолжается в течение всей жизни.

В СВЗ млекопитающих фактор Pax6 экспрессируется в нейрональных стволовых/ранних прогениторных клетках, имеющих морфологию радиальной глии и специфически маркирующихся GFAP и нестином (Maekawa et al., 2005, Osumi et al., 2008). Результаты маркирования Pax6 на мозге симы показали, что этот маркер экспрессируется как у ранней молодежи, в возрасте 3 и 6 месяцев, так и у годовиков и у взрослых животных. У годовиков мы наблюдали специфическое маркирование перивентрикулярно расположенных клеток, образующих кластеры, или домены. Распределение переднемозговых Pax6-ир доменов соответствует локализации переднемозговых P1-P3 прозомеров согласно классификации (Puelles, Ribenstein, 2003). Исследование поздних возрастных стадий симы выявило специфические скопления клеток с длинными, радиально ориентированными отростками и клеточными телами, расположенными у просвета мозгового желудочка, либо вдоль иммунопозитивных волокон. Паттерн распространения Pax6-ир комплексов симы, включающих иммунопозитивные и расположенные по ходу волокон слабо маркированные Pax6-клетки, относящиеся по нашему мнению к популяции мигрирующих нейробластов, вполне соответствует картине клеточной миграции, характерной для раннего эмбриогенеза.

Другим нейрохимическим маркером клеток перивентрикулярной зоны в мозге рыб является NADPH-диафораза – гистохимический маркер NO-синтазы, впервые описанная в перивентрикулярной зоне мозга солнечника (Ma, 1993). Обнаружение NADPH-d-позитивных перивентрикулярных клеточных скоплений в мозге взрослой симы подтверждает участие NO в качестве фактора регулирующего постэмбриональный морфогенез (Aniol, Stepanichev, 2007). Показано, что NO регулирует процессы направленного роста аксонов и дендритов, а также миграции дифференцирующихся нейронов (Biker et al., 2005). Распределение NADPH-d-позитивных перивентрикулярных клеток в мозге симы сходно с локализацией TH- и ГАМК-ир доменов, но популяция NADPH-d-позитивных клеток морфологически более гетерогенна.

На уровне переднего и продолговатого мозга данио *Danio rerio*, вдоль вентрикулярного просвета сосуществуют быстро и медленно пролиферирующие субпопуляции клеток РГ, отличающиеся по характеру маркирования BrdU (Adolf et al., 2006). Маркирование PCNA показало, что у годовиков и взрослой симы в перивентрикулярных областях промежуточного и центрального сером слое продолговатого мозга представлена популяция пролиферирующих клеток. Более того, на уровне переднего мозга распределение TH-, ГАМК-, Pax6-ир клеток соответствует нейромерной конструкции мозга, что подтверждается при маркировании пролиферативных зон PCNA. На границе между дор-

сальными прозомерами P2-P3 иммунопозитивное маркирование TH, ГАМК, Pax6 и PCNA отсутствует. В промежуточном мозге расположение пролиферативных PCNA-иммуногенных зон соответствует прозомерной конструкции переднего мозга. Таким образом, в ЦНС симы выявлено несколько PCNA-ир зон пролиферации, в которых находятся клетки экспрессирующие TH-, ГАМК и NADPH-d. Мы предполагаем, что эти клетки являются вновь образованными нейронами, что согласуется с данными, полученными на данио (Adolf et al., 2006).

В настоящее время установлено, что участие нейротрансмиттерной сигнализации в постэмбриональном нейрогенезе позвоночных ограничивается слабой адресацией такого воздействия. Единобразие с которым распространяется нейротрансмиттерная сигнализация вдоль всей СВЗ противоречит концепции о мозаичности клеточной и молекулярной природы СВЗ (Platel et al., 2010). В настоящее время не известно различаются ли виды сигнализации среди нейротрансмиттеров, обладающих значительным биохимическим сходством: ГАМК и глутаматная, дофаминовая и норадреналиновая. Также не ясно каким образом сходные по структуре нейротрансмиттеры (например глутамат и ГАМК), воспринимаются астроцито-подобными клетками, рассматривающимися в качестве нейрональных предшественников млекопитающих. Согласно данным Меркеля с соавторами (Merkle et al., 2007) имеет значение позиционная информация: подобные нейрональные предшественники расположены в разных регионах СВЗ и являются источниками развития различных линий интернейронов (Merkle et al., 2007; Young et al., 2007). Однако не ясно, каким образом нейротрансмиттерная сигнализация избирательно регулирует субпопуляции нейральных клеток-предшественников. Неизвестно как согласуется единообразная нейротрансмиттерная сигнализация с ее функциями — регуляцией клеточной миграции и пролиферации. Одним из возможных объяснений является то, что каждый нейротрансмиттер активирует различные подтипы рецепторов, состав субъединиц у которых регулируется в ходе онтогенеза, и таким образом, приводят в действие различные внутриклеточные пути.

Таким образом, в перивентрикулярной области промежуточного мозга, центрального серого слоя дорсомедиального тегмента, продолговатого и спинного отделов мозга симы показано наличие гетерогенных популяций клеток с радиально ориентированными отростками. TH-, ГАМК-иммунопозитивные и NADPH-d-позитивные клетки расположены в областях PCNA-иммуногенных пролиферативных зон. Возможно, эти клетки являются потомками радиальной глии и участвуют в росте и физиологической регенерации дизэнцефалических и медуллярных структур. В разных воз-

растных группах симы маркирование TH-, ГАМК, PCNA и Pax6 выявляет нейромерную конструкцию мозга.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пуцина Е.В. Нитроксидергическая организация ядер краниальных нервов продолговатого мозга костистых рыб // Цитология. 2007. Т. 49. № 6. С. 471–483.
- Пуцина Е.В. Роль радиальной глии в пре- и постнатальном гистогенезе нервной системы позвоночных // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2010. № 1. С. 12–17.
- Пуцина Е.В. Тирозингидроксилаза в ядрах конечного и промежуточного мозга горчака (*Rhodeus sericeus*) // Цитология. 2009. Т. 51. № 1. С. 61–75.
- Пуцина Е.В., Флейшман М.Ю., Тимошин С.С. Проллиферативные зоны мозга молоди амурского осетра *Acipenser shrenki*. Взаимоотношение с нейромерами и миграцией вторичных матричных зон // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 5. С. 345–354.
- Adolf B., Chapouton P., Lam C.S., Topp S., Tannhäuser B., Ströhle U., Götz M., Bally-Cuif L. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon // Dev. Biol. 2006. V. 295. P. 278–293.
- Aniol V.A., Stepanichev M. Yu. Nitric oxide and gamma-aminobutyric acid as regulators of neurogenesis in the brain of adult mammals: models of seizure activity // Neurochem. J. 2007. V. 1. P. 265–274.
- Baker H., Liu N., Chun H.S., Saino S., Berlin R., Volpe B., Son J.H. Phenotypic differentiation during migration of dopaminergic progenitor cells to the olfactory bulb // J. Neurosci. 2001. V. 21. P. 8505–8513.
- Bicker G. Stop and go with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains // BioEssays. 2005 V. 27. P. 495–505.
- Callier S., Snapyan M., Le Crom S., Prou D., Vincent J.D., Vernier P. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates // Biol. Cell. 2003. V. 95. P. 489–502.
- Cameron H.A., McEwen B.S., Gould E. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus // J. Neurosci. 1995. V. 15. P. 4687–4692.
- Chapouton P., Gartner A., Gotz M. The role of Pax6 in restricting cell migration between developing cortex and basal ganglia // Development. 1999. V. 126. P. 5569–5579.
- Diaz J., Ridray S., Mignon V., Griffon N., Schwartz J.C., Sokoloff P. Selective expression of dopamine D<sub>3</sub> receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain // J. Neurosci. 1997. V. 17. P. 4282–4292.
- Extröm P., Johnsson C.M., Ohlin L.M. Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones // J. Comp. Neurol. 2001. V. 436. P. 92–110.
- Extröm P., Ohlin L. Ontogeny of GABA-immunoreactive neurons in the central nervous system in a teleost *Gasterosteus aculeatus* L. // J. Chem. Neuroanat. 1995. V. 94. P. 271–288.
- Gascon E., Dayer A.G., Sauvain M.O., Potter G., Jenny B., De Roo M., Zraggen E., Demarex N., Muller D., Kiss J.Z. GABA regulates dendritic growth by stabilizing lamelli-

- podia in newly generated interneurons of the olfactory bulb // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. P. 12956–12966.
- Ge S., Goh E.L., Sailor K.A., Kitabatake Y., Ming G.L., Song H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain // *Nature.* 2006. V. 439. P. 589–593.
- Götz M., Stoykova A., Gruss P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex // *Neuron.* 1998. V. 21. P. 1031–1044.
- Grandel H., Kaslin J., Ganz J., Wenzel I., Brand M. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate // *Dev. Biol.* 2006. V. 295. P. 263–277.
- Heins N., Malatesta P., Cecconi F., Nakafuku M., Tucker K.L., Hack M.A., Chapouton P., Barde Y.A., Götz M. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. // *Nat. Neurosci.* 2002. V. 5. P. 308–315.
- Hoglinger G.U., Rizk P., Muriel M.P., Duyckaerts C., Oertel W.H., Caille I., Hirsch E.C. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease // *Nat. Neurosci.* 2004. V. 7. P. 726–735.
- Hope B.T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // *J. Histochem. Cytochem.* 1989. V. 37. P. 653–661.
- Kapsimali M., Vidal B., Gonzalez A., Dufour S., Vernier P. Distribution of the mRNA encoding the four dopamine D(1) receptor subtypes in the brain of the european eel (*Anguilla anguilla*): comparative approach to the function of D(1) receptors in vertebrates // *J. Comp. Neurol.* 2000. V. 419. P. 320–343.
- Kohwi M., Osumi N., Rubenstein J.L. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. P. 6997–7003.
- Ma P.M. Tanycytes in the sunfish brain: NADPH-diaphorase histochemistry and regional distribution // *J. Comp. Neurol.* 1993. V. 336. P. 77–95.
- Madtes P.C., Redburn D.A. GABA as a trophic factor during development // *Life Sci.* 1983. V. 33. P. 979–984.
- Maekawa M., Takashima N., Arai Y. Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis // *Genes Cells.* 2005. V. 10. P. 1001–1014.
- Martinoli M.G., Dubourg P., Geffard M., Calas A., Rah O. Distribution of GABA immunoreactive neurons in the forebrain of the goldfish *Carassius auratus* // *Cell Tissue Res.* 1990. V. 260. P. 77–84.
- Medina M., Reperant J., Dufour S., Ward R., Le Belle N., Miceli D. The distribution of GABA-immunoreactive neurons in the brain of the silver eel (*Anguilla anguilla* L.) // *Anal. Embryol.* 1994. V. 189. P. 25–39.
- Meek J. Catecholamines in the brains of osteichthyes (bony fishes) // *Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates* / Ed. Smetts W.J.A.J., Reiner A. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. P. 49–76.
- Merkle F.T., Mirzadeh Z., Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain // *Science.* 2007. V. 317. P. 381–384.
- Michler A., Wolff J.R. Modulation of neurite growth by GABA in culture // *Neural development and regeneration* / Ed. Glorio A. Berlin: Springer-Verlag, NATO ASI Series, 1988. V. 22. P. 112–124.
- Michler-Stuke A., Wolff J.R. Facilitation and inhibition of neurite elongation by GABA in chick tectal neurons // *Neurotrophic activity of GABA during development* / Ed. Redburn D.A., Schousboe A. Neurology and Neurobiology, 1987. V. 32. New York: Alan R. Liss. P. 253–266.
- Osumi N., Shinohara H., Numayama-Tsuruta K., Maekawa M. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator // *Stem Cells.* 2008. V. 26. P. 1663–1672.
- Overstreet Wadiche L., Bromberg D.A., Bensen A.L., Westbrook G.L. GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus // *J. Neurophysiol.* 2005. V. 94. P. 4528–4532.
- Pellegrini E., Mouriec K., Anglade I., Menuet A., Page Y., Gueguen M., Marmignon M., Brion F., Pakdel F., Kah O. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish // *J. Comp. Neurol.* 2007. V. 501. P. 150–167.
- Platel J.C., Laca B., Bordey A. GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis // *J. Mol. Histol.* 2007. V. 38. P. 602–610.
- Platel J.C., Stambouliau S., Nguyen I., Bordey A. Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: the first leg // *Brain Res. Rev.* 2010. V. 63. P. 60–71.
- Puelles L., Kuwana E., Puelles E., Bulfone A., Shimamura K., Keleher J., Smiga S., Rubenstein J.R. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1* // *J. Comp. Neurol.* 2000. V. 424. P. 409–438.
- Puelles L., Rubenstein J.R. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model // *TINS.* 2003. V. 26. P. 469–476.
- Puschina E.V., Obukhov D.K. The participation of radial glia cells into histogenesis of nervous system // *Neuroscience for medicine and psychology.* Sudak, 2010. P. 242–243.
- Rakic P. The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering // *Brain Res. Rev.* 2007. V. 55. P. 204–219.
- Stoykova A., Treichel D., Hallonet M., Gruss P. Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. P. 8042–8050.
- Ugrumov M.V. Developing brain as an endocrine organ: a paradoxical reality // *Neurochem. Res.* 2010. V. 35. P. 837–850.
- Ugrumov M.V. Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: distribution in the brain, development and functional significance // *J. Chem. Neuroanat.* 2009. V. 38. P. 241–256.
- Wullimann M.F., Muller T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behavior // *J. Comp. Neurol.* 2004. V. 475. P. 143–162.
- Wullimann M.F., Rink E. Detailed immunohistology of Pax6 protein and tyrosine hydroxylase in the early zebrafish brain suggests role of Pax6 gene in development of dopaminergic diencephalic neurons // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2001. V. 131. P. 173–191.
- Young K.M., Fogarty M., Kessar N., Richardson W.D. Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 8286–8296.

Zupanc G.K. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain // J. Comp. Physiol. A: Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol. 2006. V. 192. P. 649–670.

Zupanc G.K., Horschke I. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study // J. Comp. Neurol. 1995. V. 353. P. 213–233.

## Neurochemical Markers of Cells of the Periventricular Brain Area in the Masu Salm on *Oncorhynchus masou* (Salmonidae)

E. V. Pushchina<sup>a</sup>, D. K. Obukhov<sup>b</sup>, and A. A. Varaksin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Zhirmunskii Institute of Sea Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Pal'chevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia

e-mail: pushchina@mail.ru

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

**Abstract**—Localization of GABA, tyrosine hydroxylase (TH), NADPH-diaphorase, transcription factor Pax6, and the proliferative cell antigen (PCNA) in the periventricular area of the brain of the masu salmon *Oncorhynchus masou* of varying age groups was studied. The presence of heterogeneous cell populations with radially orientated outgrowths in the diencephalon, central gray matter of the dorsomedial tegmentum, medulla oblongata, and spinal cord of the masu salmon was shown. TH-, GABA-immunopositive, and NADPH-d-positive cells are located in the areas of PCNA-immunogenic proliferative zones. It is possible that these cells are descendants of the radial neuroglia and that they participate in the growth and physiological regeneration of diencephalic and medullar structures. In various age groups of the masu salmon, the marking of TH-, GABA, PCNA, and Pax6 reveals the neuromeric structure of the brain.

**Keywords:** radial neuroglia, teleostei, postnatal neurogenesis, neurotransmitter signaling, migration, tyrosine hydroxylase, GABA, development, Pax6, NADPH-diaphorase, proliferation

# МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОГО РЕГУЛЯТОРНОГО КОНТУРА ГЕННОЙ СЕТИ МОРФОГЕНЕЗА МАКРОХЕТ *D. melanogaster*

© 2012 г. Т. А. Бухарина<sup>1</sup>, В. П. Голубятников<sup>2, 3</sup>, И. В. Голубятников<sup>2</sup>, Д. П. Фурман<sup>1, 3\*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева 10

<sup>2</sup>Институт математики им. С.Л. Соболева СО РАН, 630090 Новосибирск, пр. ак. Коптюга 4

<sup>3</sup>Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова 2

E-mail: furman@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 28.12.10 г.

Окончательный вариант получен 09.06.11 г.

Морфогенез макрохет дрозофилы, осуществляющих функцию механорецепторов, состоит из нескольких этапов, каждый из которых имеет собственное генетическое обеспечение, описываемое в терминах генных сетей. Механорецептор развивается из одной родительской клетки (далее РКСО — Родительская Клетка Сенсорного Органа), детерминации которой в развитии макрохет принадлежит определяющая роль. Для РКСО характерно самое высокое, по отношению к окружающим клеткам, содержание пронеуральных белков AS-C, инициирующее нейральную ветвь развития клетки и, тем самым, морфогенез механорецептора. Ключевым объектом генной сети, поддерживающей детерминацию РКСО, представлен комплексом генов *achaete-scute* (AS-C). Активность этого комплекса контролируется центральным регуляторным контуром (ЦРК). В состав ЦРК, помимо AS-C, входят гены *hairy*, *senseless* (*sens*), *charlatan* (*chn*), *scratch* (*scrt*), *daughterless* (*da*), *extramacrochaete* (*emc*), *groucho* (*gro*). Через кодируемые ими белки реализуется система прямых и обратных связей, и осуществляются отношения индукции-репрессии между компонентами ЦРК. В работе рассмотрена математическая модель функционирования ЦРК как регулятора содержания в РКСО пронеуральных белков AS-C, определяющего успешное прохождение основного этапа морфогенеза механорецептора *D. melanogaster*.

**Ключевые слова:** дрозофила, *achaete-scute* комплекс, генные сети, математическая модель, нелинейные динамические системы, стационарные точки.

## ВВЕДЕНИЕ

Большие щетинки (макрохеты) входят в состав периферической нервной системы дрозофилы и выполняют функции механорецепторов (Campuzano, Modolell, 1992; Simpson, Marcellini, 2006). Механорецептор состоит из четырех клеток: трихогена (щетинковой клетки), тормогена (гнездовой клетки), нейрона и текогена (клетки оболочки нерва). Родоначальницей всех этих компонентов является единственная родительская клетка (РКСО — Родительская Клетка Сенсорного Органа). Морфогенез макрохет — это трехстадийный процесс, ключевым событием которого, определяющим самую возможность формирования механорецептора, является обособление родительской клетки из массы эктодермальных клеток крылового имажинального диска. От правильного позиционирования родительских клеток зависит структура расположения 26 макрохет на поверхности головы и тела мухи — т.н. щетиночный рисунок (Фурман, Бухарина, 2008; Furman, Bukharina, 2008).

РКСО отличается от окружающих ее клеток максимальным содержанием белков AS-C, кодируемых одноименным генным комплексом (*achaete-scute complex* — AS-C) (Reeves, Posakony, 2005). Именно это обстоятельство является критическим фактором, предопределяющим нейральную судьбу клеток и специфицирующим нейральную детерминацию РКСО.

Процесс наработки и утилизации белков комплекса находится под строгим контролем набора генов (и кодируемых ими белков), функционально объединенных в генную сеть (Furman, Bukharina, 2009). Ядро генной сети представлено центральным регуляторным контуром (ЦРК), ответственным за необходимый уровень экспрессии AS-C — главного элемента всей генетической системы, обеспечивающей морфогенез макрохет. Именно содержание белков AS-C является инициирующим фактором этого процесса.

Формализованное представление динамики накопления в РКСО требуемого содержания белков AS-C возможно в рамках математической мо-



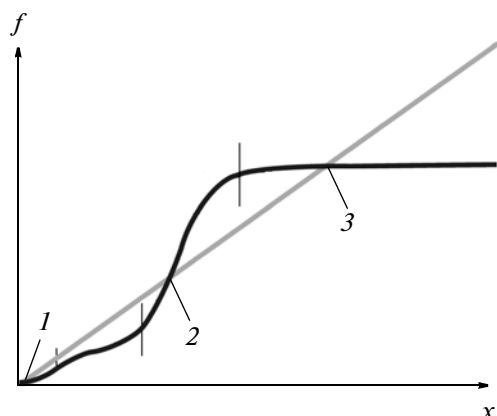


**Рис. 2.** Стационарные точки в системе (1). S-образная кривая представляет график функции  $f = R(x)$ , прямая линия представляет график функции  $f = x$ . Отрезки S-образной кривой между вертикальными линиями соответствуют трем ступеням приращения концентрации белков AS-C.

транскрипционной активности *hairy* (Roark et al., 1995) (рис. 1).

**Модель:** Регуляция активности комплекса *achaete-scute* может быть описана следующей нелинейной динамической системой:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= F_1(x, y, z, w) - x = \\ &= \frac{\sigma_1(D \cdot x) + \sigma_3(w) + \sigma_5(w)}{(1 + Gy)(1 + Ex)} - x; \\ \frac{dy}{dt} &= F_2(u) - y = \frac{C}{1 + u} - y; \\ \frac{dz}{dt} &= S_3(D \cdot x) - z, \quad \frac{du}{dt} = S_4(D \cdot x) - u. \\ \frac{dw}{dt} &= S_5(D \cdot x) - w. \end{aligned} \quad (1)$$

Переменные  $x, y, z, u, w$  обозначают соответственно концентрации белков AS-C, Hairy, Senseless, Scratch, Charlatan, кодируемых генами, входящими в состав ЦРК. Эти компоненты ЦРК обеспечивают прямые позитивные и негативные воздействия на регуляторную зону AS-C.

Параметр  $C$  учитывает отрицательную обратную связь Scratch — Hairy.

Параметры  $D, G$  и  $E$  обозначают концентрации белков-кофакторов Daughterless, Groucho и Extramacrochaete, которые участвуют в регуляции активности AS-C, формируя гетеродимеры с белками-компонентами ЦРК, упомянутыми выше.

Воздействие на активность AS-C через положительные обратные связи описывается сигмоидными функциями  $\sigma_j, j = 1, 3, 5$  и  $S_i(D \cdot x), i = 3, 4, 5$ . При этом сигмоидные функции  $\sigma_j$  соответ-

ствуют активаторным воздействиям на AS-C белков гетеродимера AS-C/DA ( $\sigma_1$ ), Sens ( $\sigma_3$ ) и Chn ( $\sigma_5$ ), а сигмоидные функции  $S_i(D \cdot x)$  соответствуют активаторным воздействиям AS-C/DA на гены *senseless* ( $S_3$ ), *scratch* ( $S_4$ ) и *charlatan* ( $S_5$ ) (рис. 1). Здесь  $S_i(0) > 0, \sigma_j(0) > 0$ ; произведения  $(D \cdot x), (G \cdot y)$  и  $(E \cdot x)$  соответствуют димерам AS-C/DA, HAIRY/GRO и AS-C/EMC.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку в правых частях всех уравнений системы (1) все функции  $F_1, F_2, S_i(D \cdot x), i = 3, 4, 5$  непрерывны и ограничены, все решения системы (1) также должны быть ограничены и попадать в ограниченную область положительного октанта  $x \geq 0, y \geq 0, z \geq 0, w \geq 0$ . Отметим, что это свойство характерно не только для рассматриваемого ЦРК как фрагмента генной сети морфогенеза макрочет, но и для некоторых других генных сетей, функционирование которых регулируется либо отрицательными обратными связями (Голубятников и др., 2010), либо простейшими комбинациями положительных и отрицательных обратных связей (Гайдов и др., 2010).

**Стационарные точки динамической системы (1):** Стационарные точки динамической системы (1), то есть точки ее равновесия (устойчивого и неустойчивого) находятся из системы уравнений

$$\begin{aligned} x &= F_1(x, y, z, w), \quad y = F_2(u); \quad z = S_3(D \cdot x); \\ u &= S_4(D \cdot x); \quad w = S_5(D \cdot x), \end{aligned} \quad (2)$$

которая сводится к одному уравнению

$$x = F_1(x, F_2(S_4(D \cdot x)), S_3(D \cdot x), S_5(D \cdot x)). \quad (3)$$

Решения этого уравнения соответствуют точкам пересечения графиков двух функций:  $f = x$  и  $f = R(x) = F_1(x, F_2(S_4(D \cdot x)), S_3(D \cdot x), S_5(D \cdot x))$  — левой и правой частей уравнения (3). Поскольку числитель правой части первого из уравнений системы (1) состоит из суммы трех сигмоидных функций, график функции  $f = R(x)$  в типичных ситуациях имеет следующий, не более чем трехступенчатый, вид (рис. 2). Найдя из уравнения (3) координату  $x_0$  стационарной точки, мы определяем остальные координаты этой точки из системы уравнений (2):

$$\begin{aligned} y_0 &= F_2(S_4(D \cdot x_0)); \quad z_0 = S_3(D \cdot x_0); \\ u_0 &= S_4(D \cdot x_0); \quad w_0 = S_5(D \cdot x_0). \end{aligned}$$

При изменении параметров DA, GRO и EMC форма графика функции  $f = R(x)$ , конечно же, изменяется, и количество точек его пересечений с прямой  $f = x$  при этом также может изменяться. Мы рассматриваем здесь только случаи трансверсальных (некасательных) пересечений этих графиков.

Перенумеровав точки пересечения этих графиков, можно видеть, что в точке с номером 2 производная функции  $f = R(x)$  больше единицы, а в точках 1 и 3 эта производная меньше единицы.

Матрица линеаризации системы (1) в каждой из полученных таким образом стационарных точек имеет вид

$$M = \begin{pmatrix} P_{11} - 1 & -P_{12} & P_{13} & 0 & P_{15} \\ 0 & -1 & 0 & -P_{24} & 0 \\ D \cdot P_{31} & 0 & -1 & 0 & 0 \\ D \cdot P_{41} & 0 & 0 & -1 & 0 \\ D \cdot P_{51} & 0 & 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}.$$

Здесь положительные величины  $P_{13}$ ,  $P_{15}$ ,  $P_{31}$ ,  $P_{41}$ ,  $P_{51}$  описывают производные монотонно возрастающих сигмоидных функций  $\sigma_3$ ,  $\sigma_5$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ,  $S_5$  соответственно; отрицательные величины  $-P_{12}$ ,  $-P_{24}$  соответствуют отрицательным обратным связям между элементами ЦПК {HAIRY/GRO-|AS-C} и {SCRT-|HAIRY}, знак величины  $P_{11}$  зависит от того, на какой части графика функции  $f = R(x)$ , возрастающей или убывающей, расположена точка его пересечения с прямой  $f = x$ .

Вычисление характеристического многочлена этой матрицы  $M$  показывает, что два его собственных значения  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  кратны и отрицательны:  $\lambda_1 = \lambda_2 = -1$ . Оставшиеся три собственных значения  $\lambda_3$ ,  $\lambda_4$ ,  $\lambda_5$  матрицы  $M$  находятся из уравнения  $\Psi(\lambda) = (1 + \lambda)^3 - P_{11} \cdot (1 + \lambda)^2 - D \cdot (P_{31} \cdot P_{13} + P_{51} \cdot P_{15}) \cdot (1 + \lambda) - D \cdot P_{41} \cdot P_{12} \cdot P_{24} = 0$ , у которого два корня  $\lambda_3$ ,  $\lambda_4$  либо вещественны и отрицательны, либо имеют отрицательные вещественные части. Знак оставшегося (обязательно вещественного) собственного числа  $\lambda_5$  определяет поведение решений динамической системы (1) в окрестности стационарной точки, что описывается величиной производной  $\frac{dR(x)}{dx}$ : если  $\frac{dR}{dx} = P_{11} + D \cdot (P_{31} \cdot P_{13} + P_{51} \cdot P_{15}) + D \cdot P_{41} \cdot P_{12} \cdot P_{24} > 1$  (точка 2 на рис. 2), то  $\lambda_5 > 0$ , в таком случае соответствующая стационарная точка неустойчива;

если же  $\frac{dR}{dx} < 1$  (в точках 1 и 3 на рис. 2), то  $\lambda_5 < 0$ ,

т.е. у такой стационарной точки вещественные части всех собственных чисел отрицательны, значит, эта точка устойчива.

В проведенных численных экспериментах использовались следующие стандартные сигмоидные функции:

$$\sigma_j(v) = d_j \frac{v^2}{1 + v^2}, \quad j = 1, 3, 5;$$

$$S_i(D \cdot x) = B_i \frac{\exp(k_i(D \cdot x - A_i))}{1 + \exp(k_i(D \cdot x - A_i))}, \quad i = 3, 4, 5.$$

Здесь  $d_1$ ,  $d_3$ ,  $d_5$  — величины, характеризующие максимально возможные приращения значений ступенчатых функций  $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ ,  $\sigma_3$ , т.е. высоты этих функций;

$B_3$ ,  $B_4$ ,  $B_5$  — высоты ступенчатых функций  $S_3$ ,  $S_4$ ,  $S_5$ ;

$k_3$ ,  $k_4$ ,  $k_5$  — параметры, характеризующие максимальную скорость роста ступенчатых функций  $S_3$ ,  $S_4$ ,  $S_5$ .

$A_3$ ,  $A_4$ ,  $A_5$  — параметры, показывающие величины сдвигов ступенчатых функций  $S_3(D \cdot x)$ ,  $S_4(D \cdot x)$ ,  $S_5(D \cdot x)$  по оси  $0x$ .

Подбор значений параметров осуществлялся, исходя из экспериментальных данных о функционировании ЦПК. На рис. 2 представлен график функции  $f = R(x)$ , качественно отражающий поведение системы (1) при следующих значениях параметров (S-образная кривая):

$$d_1 = 5.0; \quad d_3 = 6.0; \quad d_5 = 7.0; \quad A_3 = 1.0;$$

$$A_4 = 2.0; \quad A_5 = 1.0; \quad k_3 = 3.0; \quad k_4 = 4.5; \quad k_5 = 4.0$$

$$C = 12.0; \quad D = 1.5; \quad E = 0.5; \quad G = 3.0;$$

$$B_3 = 6.0; \quad B_4 = 5.2; \quad B_5 = 9.0.$$

Параметр  $C$  (второе уравнение системы (1)) показывает амплитуду отрицательной обратной связи Scratch —| Hairu.

Прямая линия на рис. 2 является графиком функции  $f = x$  и отражает теоретически ожидаемое нарастание скорости синтеза белков AS-C, если исходить из предположения о ее прямой зависимости от концентрации этих белков.

В соответствии с допущениями модели, точки пересечения графиков соответствуют стационарным точкам-координатам  $x$  положений равновесия динамической системы (1). Можно видеть, что поведение системы при этих условиях характеризуется наличием трех стационарных точек.

Таким образом, анализ построенной модели позволяет сделать несколько выводов: при любых наборах параметров система не выходит в режим бесконечного увеличения содержания белков AS-C в клетке; нарастание содержания белков AS-C происходит ступенчато; функционирование ЦПК не может носить циклического характера.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Попытки представить формализованное описание функционирования молекулярно-генети-

ческой системы, детерминирующей морфогенез макрохет, ранее ограничивались либо общей логической схемой взаимодействия групп генов на протяжении всего процесса, без ее детализации (Ghysen, Thomas, 2003), либо моделированием межклеточных взаимодействий, происходящих при выделении РКСО из массы эктодермальных клеток имажинального диска (Marnellos, Mjolsness, 1998; Meir et al., 2002). В задачу нашего исследования входило рассмотрение внутриклеточных регуляторных событий, направленных на достижение критической концентрации белков AS-C и в финале приводящих к детерминации клетки как РКСО.

Динамика указанных внутриклеточных событий контролируется центральным регуляторным контуром молекулярно-генетической системы обеспечения морфогенеза макрохет. Функционирование AS-C как центрального элемента ЦРК описывается системой из пяти дифференциальных уравнений, соответствующих числу регуляторных воздействий на этот комплекс-трех активирующих и двух репрессирующих (рис. 1).

Характер изменения концентрации белков AS-C в нейтрально преддетерминированной клетке на графике рис. 2, иллюстрирующем результат, полученный на основе решения этой системы уравнений, качественно соответствует картине, наблюдаемой в эксперименте (Reeves, Posakony, 2005). Известно, что содержание белков AS-C в такой клетке, постепенно нарастая, достигает некоторого критического уровня, после чего ее судьба определяется однозначно — она становится РКСО. На графике это соответствует выходу кривой на плато на уровне максимального достигнутого значения. Фактором, ограничивающим содержание белков AS-C в преддетерминированной клетке достигнутым уровнем, является негативная авто- и транрегуляция активности комплекса гетеродимерами AS-C/EMC и HAIRY/GRO, соответственно.

Трехступенчатость кривой на рис. 2 определяется наличием трех последовательно включающихся прямых активирующих воздействий на гены комплекса *achaete-scute* через AS-C/DA, SENS, CHN. Высота ступеней, зависящая от параметров  $d_j$  и  $B_j$ , отражает скорость изменения концентрации белков AS-C при переходе процесса на следующую ступень.

Стационарные точки соответствуют состоянию системы, в котором она на некоторое время “зависает” перед тем, как появится новый стимул в виде активирующего воздействия одного из факторов к дальнейшему изменению концентрации AS-C и переходу на следующую ступень. Такими стимулами могут быть, в частности, наработки новых порций белков AS-C/DA, SENS, CHN, инициирующих экспрессию AS-C. Число

стационарных точек определяется числом ступеней и их высотой, но в любом случае не может превышать пяти.

Предложенная математическая модель исключает возможность возникновения циклических процессов, что не противоречит всем известным литературным данным о регуляции экспрессии генного комплекса *achaete-scute* и о характере изменения содержания белков этого комплекса в родительской клетке сенсорного органа.

На графике рис. 2 кривые выходят на плато. Из экспериментальных данных, однако, известно, что содержание белков, достигнув максимума, через какое-то время начинает снижаться и к моменту начала деления РКСО падает практически до нуля (Chang et al., 2008). По-видимому, этот процесс обусловлен наличием дополнительного механизма регуляции содержания белков AS-C, связанного с их деградацией, который не учтен в рассматриваемой динамической модели и реализуется через воздействия, лежащие за пределами рассматриваемого ЦРК.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН №119, Проекта Программы фундаментальных исследований Президиума РАН А.П.6, грантов РФФИ 09-01-00070 и РФФИ 09-04-12209-ofi\_m, проекта № 2.1.1/3707 программы АВЦП “Развитие научного потенциала Высшей школы”, Госконтракта с ФАНИ №02.512.11.2332.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бухарина Т.А., Фурман Д.П. Генетический контроль развития механорецепторов у *Drosophila melanogaster* — описание в базе данных “NEUROGENESIS” // Информационный вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. С. 186–193.
- Гайдов Ю.А., Голубятников В.П., Лихошвай В.А. О некоторых нелинейных динамических системах, моделирующих несимметричные генные сети. 2 // Вестник НГУ. 2010. Т. 10. № 1. С. 18–28.
- Голубятников В.П., Голубятников И.В., Лихошвай В.А. О существовании и устойчивости циклов в пятимерных моделях генных сетей // Сибирский журнал вычислительной математики. 2010. Т. 13. № 4. С. 403–411.
- Фурман Д.П., Бухарина Т.А. Генетический контроль формирования щетиночного рисунка у *Drosophila melanogaster* // ДАН. 2007. Т. 417. № 6. С. 484–486.
- Фурман Д.П., Бухарина Т.А. Генетический контроль развития макрохет у *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 4. С. 245–258.
- Cabrera C.V., Alonso M.C. Transcriptional activation by heterodimers of the *achaete-scute* and *daughterless* gene products of *Drosophila* // EMBO J. 1991. V. 10. P. 2965–2973.
- Cabrera C.V., Alonso M.C., Huikeshoven H. Regulation of *scute* function by *extramacrochaete* in vitro and in vivo // Development. 1994. V. 120. P. 3595–3603.

- Campuzano S., Modolell J. Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex // Trends Genet. 1992. V. 8. P. 202–206.
- Chang P.J., Hsiao Y.L., Tien A.C. et al. Negative-feedback regulation of proneural proteins controls the timing of neural precursor division // Development. 2008. M. 135. P. 3021–3030.
- Escudero L.M., Caminero E., Schulze K.L. et al. Charlatan, a Zn-finger transcription factor, establishes a novel level of regulation of the proneural *achaete/scute* genes of *Drosophila* // Development. 2005. V. 132. P. 1211–1222.
- Furman D.P., Bukharina T.A. How *Drosophila melanogaster* forms its mechanoreceptors // Current Genomics. 2008. V. 8. P. 312–323.
- Furman D.P., Bukharina T.A. The gene network determining development of *Drosophila melanogaster* mechanoreceptors // Comp. Biol. Chem. 2009. V. 33. P. 231–234.
- Ghysen A., Thomas R. The formation of sense organs in *Drosophila*: a logical approach // Bioessays. 2003. V. 25. P. 802–807.
- Marnellos G., Mjolsness E. A gene network approach to modeling early neurogenesis in *Drosophila* // Pac. Symp. Biocomput. 1998. P. 30–41.
- Meir E., von Dassow G., Munro E. et al. Robustness, flexibility, and the role of lateral inhibition in the neurogenic network // Curr. Biol. 2002. V. 12. P. 247–349.
- Nolo R., Abbott L.A., Bellen H.J. Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila* // Cell. 2000. V. 102. P. 349–362.
- Reeves N., Posakony J.W. Genetic programs activated by proneural proteins in the developing *Drosophila* PNS // Dev. Cell. 2005. V. 8. P. 413–425.
- Roark M., Sturtevant M.A., Emery J. et al. *scratch*, a pan-neural gene encoding a zinc finger protein related to *snail*, promotes neuronal development // Genes Dev. 1995. V. 9. P. 2384–2398.
- Simpson P., Marcellini S. The origin and evolution of stereotyped patterns of macrochaetes on the nota of cyclorraphous *Diptera* // Heredity. 2006. V. 97. P. 148–156.
- Smith J.E. 3rd, Cronmiller C. The *Drosophila* *daughterless* gene autoregulates and is controlled by both positive and negative cis regulation // Development. 2001. V. 128. P. 4705–4714.
- Vaessin H., Brand M., Jan L.Y. et al. *daughterless* is essential for neuronal precursor differentiation but not for initiation of neuronal precursor formation in *Drosophila* embryo // Development. 1994. V. 120. P. 935–945.
- Van Doren M., Bailey A.M., Esnayra J. et al. Negative regulation of proneural gene activity: *hairy* is a direct transcriptional repressor of *achaete* // Genes Dev. 1994. V. 8. P. 2729–2749.
- Van Doren M., Powell P.A., Pasternak D. et al. Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross-activation of *achaete* is antagonized by *extramacrochaetae* // Genes Dev. 1992. V. 6. P. 2592–2605.

## Model Investigation of Central Regulatory Contour of Gene Net of *D. melanogaster* Macrochaete Morphogenesis

T. A. Bukharina<sup>a</sup>, V. P. Golubyatnikov<sup>b,c</sup>, I. V. Golubyatnikov<sup>b</sup>, and D. P. Furman<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, pr. Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>b</sup> Sobolev Institute of Mathematics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, pr. akademika Koptyuga 4, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>c</sup> Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

e-mail: furman@bionet.nsc.ru

**Abstract**—Morphogenesis of *drosophila* macrochaete functioning as mechanoreceptors includes several steps, each of which has their own genetic support described in terms of gene nets. Mechanoreceptor develops from one parental cell (Parental Cell of Sensor Organ—PCSO), the determination of which has a critical role in macrochaete development. The highest content of AS-C proneural proteins with respect to surrounding cells that initiate a neural way of cellular development and by means of it mechanoreceptor morphogenesis is typical for PCSO. The key object of gene net providing PCSO determination consists of gene complex *achaete-scute* (AS-C). This complex activity is controlled by central regulatory contour (CRC). Besides AS-C, CRC includes the following genes: *hairy*, *senseless* (*sens*), *charlatan* (*chn*), *scratch* (*scrt*), *daughterless* (*da*), *extramacrochaete* (*emc*), and *groucho* (*gro*). The system of direct relation and feedback and induction and repression relations between CRC components are realized via the coding by these genes proteins. A mathematical model of CRC functioning as a regulator of proneural AS-C protein content in PCSO determining successful passing of the main phase of morphogenesis of *D. melanogaster* mechanoreceptor is discussed.

**Keywords:** *drosophila*, *achaete-scute* complex, gene nets, mathematical model, nonlinear dynamic systems, stationary points

УДК 575.164:599.323.4

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МУТАНТНЫХ ГЕНОВ *Fgf5<sup>go-Y</sup>*, *we* И *wal* ИЗМЕНЯЕТ ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ЦИКЛОВ РОСТА ВОЛОС У МЫШИ

© 2012 г. А. П. Нестерова, И. И. Низамутдинов, Б. В. Конюхов

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

119991, Москва, ул. Губкина, д. 3

E-mail: nesterova.anastasia@gmail.com

Поступила в редакцию 12.11.10 г.

Окончательный вариант получен 03.03.11 г.

Ранее в нашей лаборатории было установлено, что мутантный ген *wellhaarig* (*we*) является модификатором мутантного гена *waved alopecia* (*wal*), значительно ускоряя выпадение волос у мыши. В настоящей работе показано, что мутантный ген *angora-Y* (*Fgf5<sup>go-Y</sup>*) удлиняет стадию анагена в первом и втором циклах роста волос у тройных гомозигот (*Fgf5<sup>go-Y</sup>/Fgf5<sup>go-Y</sup> we/we wal/wal*). Продолжительность стадии анагена направляющих волос первой генерации у тройных гомозигот на 4 дня больше по сравнению с длительностью этой стадии таких же волос у двойных гомозигот (+/+ *we/we wal/wal*). Волосы у двойных гомозигот выпадают на стадии катагена, а у тройных гомозигот — только в конце этой стадии или даже в телогене. Такое взаимодействие мутантных генов в морфогенезе волосных фолликулов приводит к частичному восстановлению шерстного покрова у тройных гомозигот.

**Ключевые слова:** мутантные мыши, алопеция, циклы волосных фолликулов, анаген, катаген, телоген.

У млекопитающих рост волос и их выпадение связаны с цикличностью развития волосных фолликулов. В морфогенезе волосного фолликула выделяют три основных фазы (стадии): анаген — период роста, катаген — фаза деструкции и ремоделирования волосного фолликула и телоген — период покоя. Цикл развития волос повторяется много раз, и сбой в нем может привести как к выпадению волос (алопеция), так и чрезмерному их росту. Волосные фолликулы имеют сходное строение у многих видов млекопитающих, поэтому мышь (*Mus musculus*) является традиционным модельным объектом для изучения аналогичных процессов развития волосных фолликулов человека (Porter, 2003). Особую ценность представляют линии мышей, являющиеся носителями того или иного мутантного гена, нарушающего формирование волосного покрова. Примерами таких мутантных линий мышей являются *waved alopecia* (*wal/wal*), *wellhaarig* (*we/we*) и *angora* (*Fgf5<sup>go</sup>/Fgf5<sup>go</sup>*).

Мутантный ген *waved alopecia* (*wal*) расположен на 14 хромосоме (Сорокина, Бландова, 1980). Белковый продукт этого гена неизвестен. У мышей *wal/wal* формируется волнистый шерстный покров с последующим облысением. У двухнедельных гомозигот заметны все стадии дегенерации волосных фолликулов. Через месяц после рождения в коже мышей *wal/wal* происходит резкое уменьшение числа волосных фолликулов. Оставшиеся фолликулы, как правило, искривлены и не происходит формирования нормальных

волос. В 2–4-х месячном возрасте в местах облысения нормальные фолликулы отсутствуют.

Мутантный ген *wellhaarig* (*we*) локализован на второй хромосоме, его белковый продукт также неизвестен. У мышей *we/we* в течение первых двух недель жизни развивается волнистый шерстный покров, в дальнейшем с возрастом волнистость волосного покрова проходит. У мышей *we/we* аномалии волос первой генерации (G1) обусловлены нарушением дифференцировки клеток внутреннего корневого влагалища волоса (Конюхов, Куприянов, 1990). Взаимодействие гена *wal* с геном *we* приводит к развитию прогрессирующей алопеции: мыши *we/we wal/wal* с 1.5-месячного возраста и до старости, в основном, голые или имеют небольшие участки коротких волос (Мартынова и др., 2002).

Дики (Dickie, 1963) описала эффекты мутантного аутосомного рецессивного гена *angora* (*go*), спонтанно возникшего у мышей инбредной линии BALB/c в Джексонской лаборатории (США). Она установила, что у гомозигот по этому мутантному гену направляющие волосы первого порядка первой генерации (G1) были примерно вдвое длиннее, чем в норме. В питомнике “Столбовая” АМН СССР у мышей инбредной линии C57BL также был обнаружен сходный мутантный ген, обуславливающий у гомозигот длинношертность. Скрещивание таких мутантов с мышами *go/go*, полученными из Джексонской лаборатории, подтвердило не только аллельность, но и идентичность этих мутантных генов. Поэтому мутантный ген, обнаруженный у мышей в питомни-

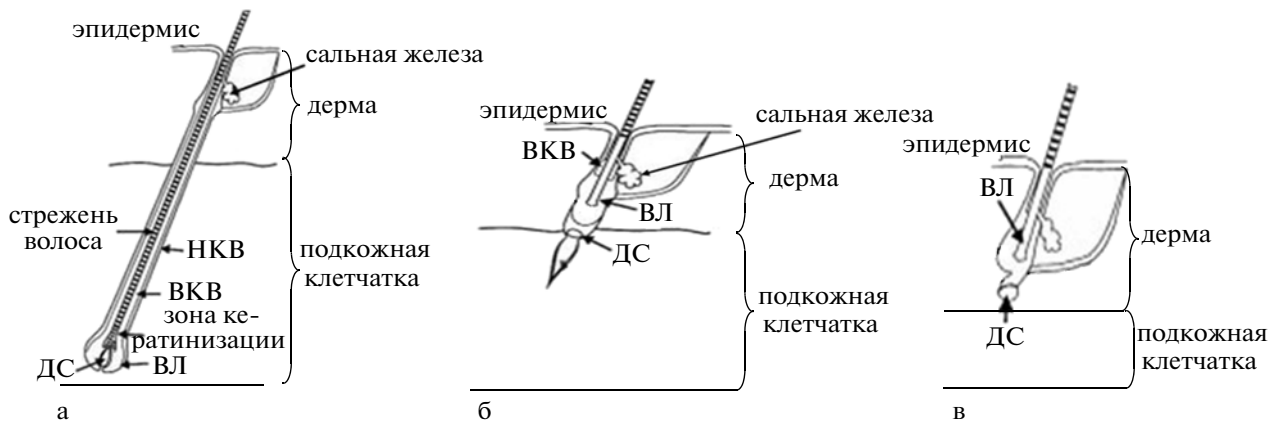


**Рис. 1.** Стадии цикла развития волосяного фолликула мыши (по Muller-Rover, 2001): а — анаген VI — катаген I; б — катаген VII; в — телоген. ВКВ — внутреннее корневое влагалище, НКВ — наружное корневое влагалище, ВЛ — волосная луковица, ДС — дермальный сосочек.

ке “Столбовая” был назван *angora-Y (go-Y)* (Бландова и др., 1983).

В других работах было установлено, что ген *angora* локализован на 5 хромосоме мыши и является делецией гена, кодирующего фактор роста фибробластов 5 (FGF5). Мутантный ген *Fgf5<sup>go-Y</sup>* обуславливает увеличение длины волос у мыши и других млекопитающих. Ген *Fgf5<sup>go-Y</sup>* является модификатором эффекта взаимодействия генов *we* и *wal*. У тройных гомозигот *Fgf5<sup>go-Y</sup>/Fgf5<sup>go-Y</sup> we/we wal/wal* по сравнению с мышами *+/+ we/we wal/wal* алопеция выражена значительно слабее (Конюхов и др., 2009).

В настоящей статье представлены данные о морфологических изменениях структуры и продолжительности стадий циклов волосяных фолликулов при взаимодействии мутантных генов *Fgf5<sup>go-Y</sup>*, *we* и *wal* у двойных и тройных гомозигот.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе были использованы мыши из коллекции вивария Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН: двойные гомозиготы черного окраса *a/a we/we wal/wal* (Конюхов и др., 2004) и тройные гомозиготы также черного окраса *a/a Fgf5<sup>go-Y</sup>/Fgf5<sup>go-Y</sup> we/we wal/wal* (Конюхов и др., 2009). В качестве контроля были использованы двойные гетерозиготы *a/a +/we+/wal* и мыши нормального генотипа C57BL/6.

Для приготовления гистологических срезов использовали кусочки кожи передней области спины размером 10 × 5 мм, которые брали у мышей C57BL/6 на 7, 16, 20, 24, 30, 40, 45 и 50 дни после рождения, согласно данным о длительности разных стадий в цикле волос (Muller-Rover et al., 2001). Кусочки кожи у мышей генотипов *we/we wal/wal* и *Fgf5<sup>go-Y</sup>/Fgf5<sup>go-Y</sup> we/we wal/wal* брали с 7 по 40 день с интервалом в 2 дня, а также на 45, 50, 60 и 90-й день после рождения. Кусочки кожи брали у sibсов из двух или трех помётов. Фикса-

цию кусочков кожи проводили раствором Буэна в течение 24-х часов. Получали продольные и поперечные парафиновые серийные срезы кожи толщиной 7 мкм. Депарафинированные срезы окрашивали по Маллори, эозином и гематоксилином (Соколов и др., 1988).

Стадии цикла волосяных фолликулов (ВФ) направляющих волос первой (G1) и второй генерации волос (G2) у мышей разных генотипов определяли согласно руководству по точной классификации стадий цикла развития волос у мыши, предложенной Мюллер-Ровер с соавторами (Muller-Rover et al., 2001). Такая классификация позволяет выделить шесть подстадий развития ВФ (анаген I–VI), восемь подстадий регрессии ВФ (катаген I–VIII) и стадию покоя (телоген) в цикле роста волоса.

Анаген (I–VI) характеризуется увеличением, а катаген (I–VII) уменьшением размера ВФ. Максимальной длины ВФ достигает во время анагена VI и сохраняет свою форму в течение катагена I и II. На этих стадиях цикла, начиная с анагена VI и до катагена II, дермальный сосочек расположен близко к подкожной мышце. В течение телогена ВФ имеет минимальную длину (рис. 1). На стадиях телогена и анагена I–II ВФ по всей длине окружен дермальными фибробластами и не достигает подкожной клетчатки. ВФ на стадии анагена I отличается от ВФ на стадии телогена по толщине и увеличенной прослойке кератиноцитов между дермальным сосочком (ДС) и основанием волоса. На стадии анагена II ВФ характеризуются расширенным ДС.

ВФ на стадии анагена III характеризуется тем, что волосная луковица окружает ДС, а внутреннее корневое влагалище (ВКВ) доходит до волосного канала. Ключевым критерием для определения ВФ на стадии анагена IV–VI является расположение кончика стержня волоса на верхней границе ВКВ. К концу анагена (поздний анаген VI) стержень волоса выходит через волоса-

**Таблица 1.** Начало стадий анагена, катагена и телогена фолликулов направляющих волос первой и второй генерации у мышей различных генотипов

| Дни после рождения | C57BL/6 +/+ +/+ +/+ | +/+ <i>we/wewal/wal</i> | <i>Fgf5<sup>sgo-Y</sup>/Fgf5<sup>sgo-Y</sup></i><br><i>we/we wal/wal</i> |
|--------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 5–7                |                     |                         |                                                                          |
| 11–13              |                     | катаген G1 (100)        |                                                                          |
| 14–16              | катаген G1 (95)     |                         | катаген G1 (62)                                                          |
| 17–19              |                     |                         |                                                                          |
| 20–22              | телоген G1 (73)     | телоген G1 (74)         |                                                                          |
| 23–25              |                     | анаген G2 (84)          | телоген G1 (23)                                                          |
| 26–28              | анаген G2 (66)      |                         | анаген G2 (66)                                                           |
| 30–32              |                     | катаген G2(62)          | катаген G2 (62)                                                          |
| 38–40              | катаген G2 (72)     |                         | телоген G2 (79)                                                          |
| 48–50              | телоген G2 (54)     |                         |                                                                          |

Примечание: в скобках указан процент волосных фолликулов, морфология которых соответствовала критериям данной стадии. Производили два повтора измерений числа волосных фолликулов на двух разных сериях срезов кожи спины мышей каждого генотипа (при анализе 40 волосных фолликулов в каждом образце).

ной канал на поверхность кожи. ВФ на стадиях анагена VI и катагена I не могут быть различимы с помощью световой микроскопии, поэтому в данной работе началом катагена считали стадию анагена VI–катагена I.

Основными параметрами, характеризующими ВФ на стадии катагена II–IV, являются форма ДС и луковицы. На V–VI стадиях катагена ВФ имеют “эпителиальную прослойку” между ними и дермальным сосочком. ВФ, находящиеся на стадиях катагена VI – VIII, также могут быть определены по длине проксимального по отношению к ДС остатка оболочки ВФ.

На серийных срезах каждого образца кожи определяли стадии цикла у наиболее крупных волосных фолликулов – направляющих волос первого и второго порядка. За начало стадии анагена, катагена и телогена принимали определенный день после рождения мыши, когда был фиксирован образец кожи и морфология более 50% фолликулов (при анализе 40 ВФ в каждом образце) впервые соответствовала критериям данной стадии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ гистологических срезов кусочков кожи спины мышей C57BL/6 в возрасте 7–50 дней подтвердил данные, описанные в литературе о сроках наступления и соотношении длительности стадий цикла первой и второй генерации волос у мышей нормального генотипа. Стадия катагена направляющих волос первой генерации у мышей C57BL/6 начинается на 16 день, а стадия телогена – на 20 день после рождения. У 12-дневных мышей *we/we wal/wal* фолликулы направляющих волос G1 вступают в стадию катагена и начинается выпадение волос в затылочной области (табл. 1). У 20-дневных мышей этого генотипа фолликулы направляющих волос G1 вступают в стадию телогена и развивается сильная алопеция.

Стержни волос искривлены, а гранулы меланина в стержнях всех типов волос дезориентированы (рис. 2, а, б). Аномалии развития волос, очевидно, связаны с эффектами мутантного гена *we*, которые проявляются в нарушении процессов кератинизации клеток внутреннего корневого влагалища.

У мышей *we/we wal/wal* были также обнаружены аномалии в развитии сальных желез волосных фолликулов. Сальные железы волосных фолликулов G1 на стадии катагена у мышей *we/we wal/wal* сильно увеличены в размере и окружают стержень волоса с двух сторон (рис. 2, г). На стадии анагена ВФ G2, размеры сальных желез уменьшаются, и снова увеличиваются в телогене ВФ G2. Увеличение сальных желез у мышей этого генотипа, возможно, является компенсаторным механизмом восстановления нормальной тепло-регуляции, который развивается вследствие выпадения волос.

У 16-дневных мышей генотипа *Fgf5<sup>sgo-Y</sup>/Fgf5<sup>sgo-Y</sup>* *we/we wal/wal* фолликулы направляющих волос G1 еще находятся на стадии анагена V, когда стержень волоса достигает волосного канала. У 18-дневных мышей этого генотипа ВФ вступают в стадию анагена VI – катагена I. Стадия телогена первой генерации волос у тройных гомозигот очень короткая и трудно уловимая: на 24 день после рождения многие фолликулы направляющих волос по-прежнему остаются в подкожной клетчатке (72%), но примерно четверть ВФ дегенерирует (23%). У 26-дневных тройных гомозигот большинство (66%) фолликулов направляющих волос вступают в стадию анагена II. Это указывает, что цикл второй генерации волос у мышей данного генотипа начинается примерно в 25-дневном возрасте. Следовательно, у мышей *Fgf5<sup>sgo-Y</sup>/Fgf5<sup>sgo-Y</sup>* *we/we wal/wal* стадия анагена направляющих волос G1 на 4 дня длиннее по сравнению с мышами +/+ *we/we wal/wal* и на 3 дня больше по сравне-

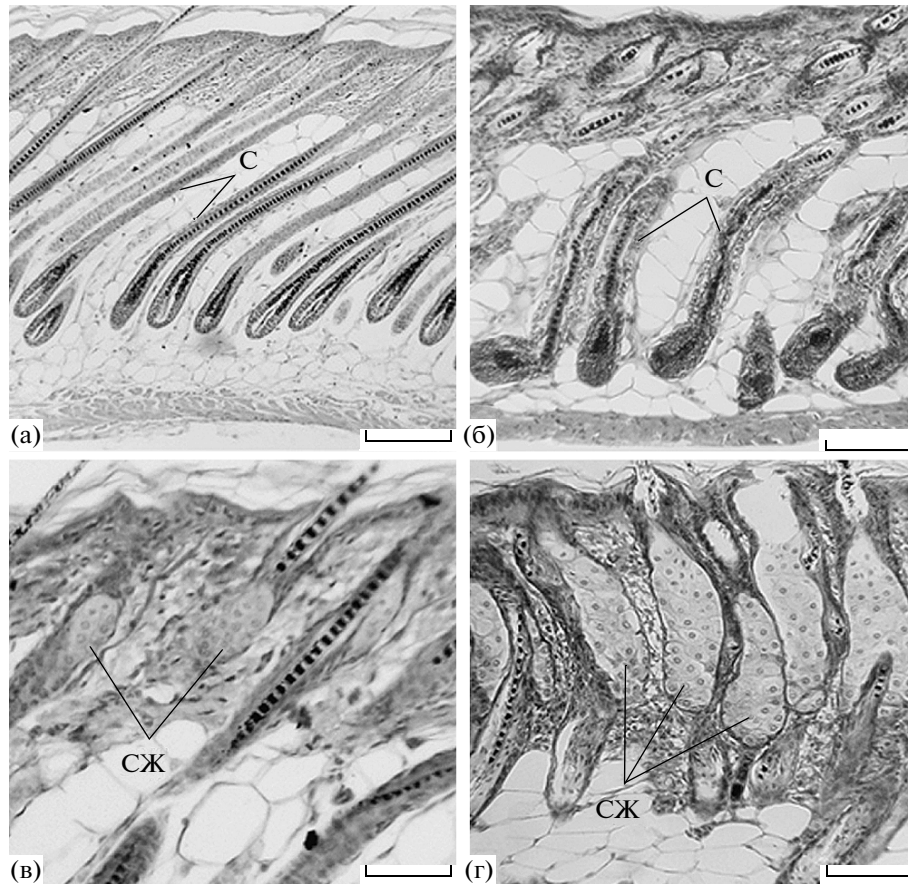


**Рис. 2.** Нарушения развития стержней направляющих волос первой генерации и размеров сальных желез у мышей генотипа *we/we wal/wal*: а – фолликулы первой генерации направляющих волос у 10-дневных мышей C57BL/6, стержни (С) волос нормального строения; б – фолликулы первой генерации направляющих волос у 10-дневных мышей генотипа *we/we wal/wal*, стержни волос изогнуты, нарушена ориентация гранул меланина; в – нормальные сальные железы (СЖ) у 15-дневных мышей C57BL/6; г – увеличенные сальные железы у 15-дневных мышей генотипа *we/we wal/wal*. Масштаб: а, б – 200 мкм, в, г – 80 мкм.

нию с мышами нормального генотипа. Стадия катагена у тройных гомозигот также длится дольше, а стадия телогена значительно короче, чем у двойных гомозигот *+/+ we/we wal/wal* (табл. 1).

Вторая генерация волос (G2) у мышей нормального генотипа развивается менее синхронно по сравнению с первой. У 14-дневных мышей C57BL/6 96% волосяных фолликулов G1 одновременно вступают в стадию катагена. У 38-дневных мышей в стадию катагена вступают только 72% волосяных фолликулов G2. Начало телогена волосяных фолликулов G2 также растянуто во времени.

У мышей мутантных генотипов асинхронность развития волосяных фолликулов направляющих волос G2 выражена значительно сильнее, чем у мышей нормального генотипа. Выпадение волос G2 у мышей *we/we wal/wal* происходит бессистемно. У 50-дневных мышей *we/we wal/wal* формируется мозаичный шерстный покров, состоящий из участков кожи покрытой волосами и голых участков. На голых участках кожи циклическое развитие волосяных фолликулов прекращается. У мы-

шей *Fgf5<sup>go-Y</sup>/Fgf5<sup>go-Y</sup> we/we wal/wal* выпадение волос G2 также растянуто во времени но наступает позже, чем у мышей генотипа *+/+ we/we wal/wal* (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

У мыши рост волос первой и второй генерации проходит по достаточно четкому временному графику (Paus et al., 1999; Muller-Rover et al., 2001). Волосы следующих генераций имеют независимые циклы и растут асинхронно. Морфогенез первой генерации волосяных фолликулов у мыши начинается в позднем эмбриогенезе и заканчивается стадией анагена. Стадия анагена завершается волнообразно: для ВФ кожи головы и передних конечностей на 14 день, а для ВФ кожи спины на 15–17 дни после рождения. У 9-недельных мышей и животных старшего возраста имеются только небольшие участки шерстного покрова с таким синхронным циклом роста волос (Chase et al., 1951).

**Таблица 2.** Стадии цикла волосных фолликулов, на которых начинается выпадение волос у двойных и тройных гомозигот

| Генотип                                 | Анаген G1 | Катаген G1 | Телоген G1 | Анаген G2 | Катаген G2 | Телоген G2 |
|-----------------------------------------|-----------|------------|------------|-----------|------------|------------|
| $+/+we/we\ wal/wal$                     |           | 14–16      |            |           | 30–37      |            |
| $Fgf5^{go-Y}/Fgf5^{go-Y}we/we\ wal/wal$ |           | 21–23      | 24–26      |           |            | 38–45      |

Примечание: цифрами указаны дни после рождения.

У мыши известно более 100 мутантных генов, нарушающих развитие и рост волос (Nakamura et al., 2001). К ним относятся мутантные гены *angora* (*Fgf5<sup>go</sup>*), *wellhaarig* (*we*) и *waved alopecia* (*wal*). В последнее время японскими исследователями было установлено, что мутантные мыши с нокаутированным геном *Sox21* (генотип *Sox21<sup>-/-</sup>*) характеризуются циклической алопецией, эпидермальной гиперплазией и увеличением сальных желез. У нормальных мышей (*Sox21<sup>+/+</sup>*) наблюдается сильно выраженная экспрессия гена *Sox21* в волосных фолликулах и кутикуле волоса в течение стадии анагена (Kiso et al., 2009). Этот факт еще раз показывает, что много генов участвует в контроле развития волосных фолликулов у млекопитающих.

Причиной выпадения волос (алопеции) у млекопитающих часто является генетически детерминированное сокращение продолжительности стадии анагена (роста) волос и преждевременное начало последующих стадий катагена и телогена. Проведенный нами гистологический анализ показал, что в результате взаимодействия мутантных генов *Fgf5<sup>go-Y</sup>*, *we* и *wal* значительно изменяется продолжительность стадий в морфогенезе волосных фолликулов у тройных гомозигот (*Fgf5<sup>go-Y</sup>/Fgf5<sup>go-Y</sup>we/we wal/wal*) по сравнению с двойными гомозиготами ( $+/+we/we\ wal/wal$ ). Ген *we* усиливает эффекты гена *wal* у двойных гомозигот (*we/we wal/wal*), что приводит к более раннему началу стадии катагена первой генерации направляющих волос. Ген *Fgf5<sup>go-Y</sup>*, взаимодействуя с генами *we* и *wal* у тройных гомозигот, наоборот, приводит к значительному удлинению стадии анагена первой генерации направляющих волос.

Сопоставление данных гистологического и визуального анализов развития алопеции у мышей сложных мутантных генотипов, позволяет сделать вывод, что у двойных гомозигот *we/we wal/wal* выпадение волос G1 и G2 происходит на стадии катагена (табл. 2). В то же время у мышей *Fgf5<sup>go-Y</sup>/Fgf5<sup>go-Y</sup>we/we wal/wal* так же, как у мышей нормального генотипа, выпадение волос первой генерации начинается на стадии позднего катагена и продолжается в телогене.

Нарушения циклов волосных фолликулов у изученных нами мышей со сложными мутантными генотипами имеют сходство с таковыми в результате действия других мутантных генов. Алопеция у мышей генотипа *we/we wal/wal* развивается сходно с развитием алопеции в результате

эффектов мутантного гена *Ctst<sup>lnkt</sup>* (Roth et al., 2000; Benavides et al., 2002). У мышей *Ctst<sup>lnkt</sup>/Ctst<sup>lnkt</sup>* волосы начинают выпадать с 21 дня после рождения, и в 28–30 дневном возрасте практически выпадают все волосы. У 7-недельных животных волосы снова отрастают и появляется короткий шерстный покров. У взрослых мышей имеются признаки частичной алопеции (Potts et al., 2004). Мутантный ген *Ctst<sup>lnkt</sup>* у гомозигот приводит к нарушению синтеза трихогиалина, эластина и коллагена и интенсивному апоптозу клеток внутреннего корневого влагалища стержня волоса уже на стадии анагена (Tobin et al., 2002).

В результате мутации гена *Dsg3*, кодирующего синтез десмоглеина — одного из белков межклеточных контактов, закоривающего волосной фолликул в телогене, у мышей генотипа *Dsg3<sup>bal</sup>/Dsg3<sup>bal</sup>* также развивается циклическая алопеция (Koch et al., 1997, 1998; Pulkkinen et al., 2002). У человека нарушение функции белков межклеточных контактов кератиноцитов лежит в основе тяжелого заболевания, одним из сопутствующих симптомов которого является алопеция (McKoy et al., 2000).

Возможно, одной из причин алопеции у мышей *we/we wal/wal* так же, как у мышей *Ctst<sup>lnkt</sup>/Ctst<sup>lnkt</sup>*, может быть нарушение структурных белков стержня волоса (например, трихогиалина). Косвенным доказательством этого является тот факт, что эффекты гена *we* проявляются в клетках внутреннего корневого влагалища, и у мышей *we/we* нарушена структура трихогиалиновых гранул (Конюхов, Куприянов, 1990). У мышей генотипа *wal/wal* волосные фолликулы также искривлены и встречаются дермальные кисты, которые возникают из наружного корневого влагалища ВФ (Сорокина, Бландова, 1980).

Гистологический анализ развития волосных фолликулов у тройных гомозигот *Fgf5<sup>go-Y</sup>/Fgf5<sup>go-Y</sup>we/we wal/wal* показал, что мутантный ген *Fgf5<sup>go-Y</sup>* ослабляет эффект взаимодействия генов *we* и *wal*. У тройных гомозигот по сравнению с мышами *we/we wal/wal* стадия анагена длится дольше, уменьшается интенсивность выпадения волос, большая часть стержней волос на стадиях катагена и телогена остаются в коже и размеры сальных желез не увеличиваются. У мышей *Fgf5<sup>go-Y</sup>/Fgf5<sup>go-Y</sup>we/we wal/wal* мутантный ген *Fgf5<sup>go-Y</sup>* удлиняет стадию роста ВФ и тем самым снижает скорость кератинизации клеток стержней волос и регрессии волосных фолликулов.

Таким образом, полученные данные о влиянии мутантных генов на циклы ВФ показывают, что ген *Fgf5<sup>go-Y</sup>* уменьшает эффект взаимодействия генов *we* и *wal* и приводит к частичному восстановлению волосяного покрова у тройных гомозигот.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бландова З.К., Душкин В.А., Малащенко А.М., Шмидт Е.Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. М.: Наука, 1983. 190 с.
- Конюхов Б.В., Малинина Н.А., Мартынова М.Ю. Ген *we* — модификатор гена *wal* у мыши // Генетика. 2004. Т. 40. № 7. С. 968–974.
- Конюхов Б.В., Нестерова А.П., Малинина Н.А. Ген *angora* ослабляет эффект взаимодействия мутантных генов *wellhaarig* и *waved alopecia* у мыши // Генетика. 2009. Т. 45. № 5. С. 717–720.
- Конюхов Б.В., Курьянов С.Д. Мутантный ген *wellhaarig* нарушает дифференцировку клеток волосяных фолликулов мыши // Онтогенез. 1990. Т. 21. № 1. С. 56–62.
- Мартынова М.Ю., Исаев Д.А., Конюхов Б.В. Анализ действия мутантного гена *wellhaarig* у химерных мышей // Генетика. 2002. Т. 38. № 11. С. 1511–1517.
- Соколов В.Е., Скурят Л.Н., Степанова Л.В. и др. Руководство по изучению кожного покрова млекопитающих. М.: Наука, 1988. 279 с.
- Сорокина Ю.Д., Бландова З.К. Наследственное изменение кожного и шерстного покрова у мышей BALB/c-*wal*. Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных. Материалы Всесоюз. конф. М., 1980. С. 79–80.
- Benavides F., Starost M.F., Flores M. et al. Impaired hair follicle morphogenesis and cycling with abnormal epidermal differentiation in nackt mice, a cathepsin L-deficient mutation // Am. J. Pathol. 2002. V. 161. No. 2. P. 693–703.
- Chase H.B., Rauch H., Smith V.W. Critical stages of hair development and pigmentation in the mouse // Physiol. Zool. 1951. V. 24. P. 1–9.
- Dickie M.M. New mutation: *angora* // Mouse News Letter. 1963. No. 29. P. 39.
- Koch P.J., Mahoney M.G., Ishikawa H. et al. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (*desmoglein 3*) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris // J. Cell Biol. 1997. V. 137. № 5. P. 1091–1102.
- Koch P.J., Mahoney M. G., Cotsarelis G. et al. Desmoglein 3 anchors telogen hair in the follicle // J. Cell. Sci. 1998. V. 111. P. 2529–2537.
- Kiso M., Tanaka S., Saba R. et al. The disruption of *Sox21*-mediated hair shaft cuticle differentiation causes cyclic alopecia in mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 23. P. 9292–9297.
- McKoy G., Protonotarios N., Crosby A. et al. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) // Lancet. 2000. V. 355. № 9221. P. 2119–2124.
- Muller-Rover S., Handjiski B., Carina van der Veen et al. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages // J. Invest. Dermatol. 2001. V. 117. P. 3–15.
- Nakamura M., Sundberg J.P., Paus R. Mutant laboratory mice with abnormalities in hair follicle morphogenesis, cycling and/or structure: annotated tables // Exp. Dermatol. 2001. V. 10. P. 369–390.
- Paus R., Cotsarelis G. The biology of hair follicles // N. Engl. J. Med. 1999. V. 341. P. 491–497.
- Porter R. Mouse models for human hair loss disorders // J. Anat. 2003. V. 202. P. 125–131.
- Potts W., Bowyer J., Jones H. et al. Cathepsin L-deficient mice exhibit abnormal skin and bone development and show increased resistance to osteoporosis following ovariectomy // Int. J. Exp. Path. 2004. V. 85. P. 85–96.
- Pulkkinen L., Choi Y. W., Simpson A. et al. Loss of cell adhesion in Dsg3bal-Pas mice with homozygous deletion mutation (2079del14) in the desmoglein 3 gene // J. Invest. Dermatol. 2002. V. 119. No. 6. P. 1237–1243.
- Roth W., Deussing J., Botchkarev V.A. et al. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling // FASEB J. 2000. V. 14. No. 13. P. 2075–2086.
- Tobin D.J., Foitzik K., Reinheckel T. et al. The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling // Am. J. Pathol. 2002. V. 160. No. 5. P. 1807–1821.

## Interaction of Mutant Genes *Fgf5<sup>go-Y</sup>*, *we*, and *wal* Changes the Duration of Hair Growth Cycles in Mice

A. P. Nesterova, I. I. Nizamutdinov, and B. V. Konyukhov

Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia  
e-mail: nesterova.anastasia@gmail.com

**Abstract**—Mutant gene *wallhaarig* (*wa*) was acting as a modifier of the mutant gene *waved alopecia* (*wal*), substantially increasing hair loss rate in mice, as was previously shown in our laboratory. The current paper is devoted to a study of mutant gene *angora-Y* (*Fgf5<sup>go-Y</sup>*), which had extended anagen stage of the first and second generations hair growth cycles in triple heterozygotes (*Fgf5<sup>go-Y</sup>/Fgf5<sup>go-Y</sup> we/we wal/wal*). First generation guard hair in triple homozygotes had their anagen stage 4 days longer than the same stage in double homozygotes (+/+ *we/we wal/wal*). Hair loss started at a catagen stage in double homozygotes, while it started in triple homozygotes at the end of the same stage or even in a telogen. Such mutant gene interaction in hair follicle morphogenesis led to a partial recovery of a body hair coat in triple homozygotes.

**Keywords:** mutant mice, alopecia, hair follicle cycles, anagen, catagen, telogen

УДК 591

## ТРАНСГЕННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ, СИНТЕЗИРУЮЩИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ

© 2012 г. Г. В. Павлова<sup>2</sup>, Н. Н. Канайкина<sup>1</sup>, Д. Ю. Пантелеев<sup>1</sup>, В. Е. Охотин<sup>1</sup>, А. В. Ревущин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии гена РАН  
117984 Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д. 34/5

<sup>2</sup> ООО “Институт медицины и трансплантации клетки”  
105082 Москва, ул. Большая Почтовая, д. 36, стр. 5

E-mail: lkorochkin@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.10 г.

Окончательный вариант получен 27.07.11 г.

В лаборатории нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена РАН под руководством член-корр. РАН Л.И. Корочкина на протяжении многих лет проводились исследования проблем, связанных с развитием нервной системы, дифференцировкой нервных клеток и возможностями применения генных и клеточных технологий для лечения нейродегенеративных заболеваний. Результаты этих исследований, подтверждают перспективность применения трансгенных нейротрофических факторов и белков теплового шока в качестве нейропротекторов в клеточной терапии. Показана перспективность применения промотора гена белка теплового шока HSP70 дрозоды для создания терапевтических трансгенных конструкций. Дальнейшее совершенствование техники невирусного переноса терапевтических генов и создание многокомпонентных генетических конструкций, которые содержат несколько терапевтических факторов, усиливающих действие друг друга, позволят создавать эффективные клеточные препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний.

**Ключевые слова:** эмбриональные нейральные клетки дрозоды, нейральная дифференцировка, глиальный рубец, трансплантация, спинальный ганглий, нейротрофические факторы, трансгенные клетки.

В лаборатории нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена РАН под руководством член-корр. РАН Л.И. Корочкина на протяжении многих лет проводились исследования проблем, связанных с развитием нервной системы и дифференцировкой нервных клеток, а также потенциалом стволовых/прогениторных клеток и возможностями их применения для лечения нейродегенеративных заболеваний. Первое упоминание понятия “стволовая клетка” можно отнести к 1908 году, когда А.А. Максимов предложил концепцию стволовой клетки для кроветворной ткани. За более чем 100 лет исследователи дали определение эмбриональной стволовой клетке (Stevens, 1970), затем обнаружили, что существуют региональные стволовые клетки, и в конечном итоге была составлена ныне существующая классификация видов стволовых клеток. Новый интерес к данному направлению был спровоцирован обнаружением стволовых клеток в головном мозге млекопитающих, включая человека. Появилось предположение о возможности использования стволовых клеток для введения их в зону пораженного органа человека в целях замещения погибших клеток и/или повышения жизнеспособности клеток окружающей ткани. В 1998 г. была осуществлена пересадка нейральных ство-

ловых клеток человеку после инсульта, а в 2001 г. Филипп Менаш произвел пересадку аутологичных скелетных миобластов больному с инфарктом миокарда (Pouzet et al., 2001). С этого момента начался новый этап исследований, связанных с использованием стволовых и прогениторных клеток в регенеративной медицине. Л.И. Корочкин с сотрудниками своей лаборатории, а также в сотрудничестве с другими российскими и зарубежными лабораториями принял активное участие в развитии этого перспективного направления. Исследования головного мозга позволили ему сделать предположение, что нейрогенез клеток-предшественников зависит от трех условий: 1) от экспрессии собственных генов и от экспрессии генов окружающих клеток; 2) от ниши, в которой поддерживается стволовой статус клетки (эффект ниши); 3) от гормонального статуса организма. Корочкиным был предложен новый принцип выбора пути дифференцировки прогениторными клетками, так называемый “принцип качелей” (Корочкин, Михайлов, 2000). Схема клеточной дифференцировки по Уолдингтону основана на последовательном и однонаправленном сужении перспективных потенций, тогда как Л.И. Корочкин предложил модель ступенчатого

выбора направления дифференцировки, назвав его принципом “качелей”. Каждая клетка-предшественник по его теории, опираясь на три вышеописанных условия, выбирает свой путь не прямолинейно, а испытывая колебания в начале каждого этапа развития с последующим сужением набора экспрессируемых тканеспецифичных генов (Корочкин, Михайлов, 2000). Клетка дочерняя по отношению к нейральной стволовой, выйдя из ниши некоторое время экспрессирует маркеры как глиальных так и нейрональных предшественников. Затем, выбрав нейрональный путь развития, она прекращает экспрессию глиальных маркеров, став нейробластом. По окончании миграции, в начале этапа окончательной дифференцировки нейробласт может снова испытывать колебания экспрессии генов. На ранних стадиях дифференцировки в нейрональном прогениторе активны системы генов, которые ответственны за формирование нейронов различных типов. При этом клетка вступает во взаимодействие с ближним и дальним окружением, которые влияют на дифференцировку и блокируют активность “ненужных” генетических каскадов, за исключением одного, который и необходим для конкретного типа нейронов. Например, дифференцирующийся в адренэргическом направлении нейробласт сначала содержит как мРНК, кодирующую белок, свойственный этому типу нервных клеток, так и мРНК, обслуживающую холинэргический путь развития, и только в конце процесса дифференцировки ферменты холинэргического каскада исчезают (Корочкин, Михайлов, 2000). Корочкин неоднократно подчеркивал огромную роль в управлении дифференцировкой ключевых генов, от которых зависит специфика развития определенной ткани или органа (“гены-господа” по Корочкину), которые запускают каскады структурных генов (“гены-рабы” по Корочкину), обеспечивающих синтез тканеспецифичных белков (Корочкин, 2004). Очевидно, что индивидуальное развитие регулируется иерархически организованной системой генов. Таким образом, изменение экспрессии ключевого гена может изменить дифференцировку не только клетки, но и всей ткани. На основании изложенных выше теоретических предпосылок в лаборатории Л.И. Корочкина была выделена новая аллель гена *Notch* — *Notch*<sup>84k35</sup>, специфическим морфогенетическим проявлением которого является нейрогенная трансформация не только вентральной, но и дорзальной эктодермы (Korochkin, et al., 1991; Ivanov et al., 1993). В результате этого вся эктодермальная закладка трансформируется в нервную ткань. Гигантская нервная система мутантных эмбрионов *Notch*<sup>84k35</sup> позволяет использовать их в экспериментах по трансплантации с минимальной долей клеток других гистотипов (Ivanov et al., 1993).

При исследовании межклеточных взаимодействий и процессов развития нервной системы успешно используются методы ксенопластических трансплантаций. Однако в большинстве работ такого рода применяются трансплантации между видами, принадлежащими к одному роду или семейству. До настоящего времени была предпринята только одна попытка совместить нейральные закладки филогенетически удаленных организмов, которые характеризуются разными стратегиями поведения (Савельев, Корочкин и др., 1990). В этой работе провели трансплантацию нервной ткани дрозофилы в мозг амфибий для исследования дифференцировочного потенциала донорской ткани. В качестве донорской ткани использовали вентральную нейрогенную закладку мутантов *Notch Drosophila melanogaster*. В качестве реципиентов были использованы зародыши сибирского углозуба *Hynobius keyseplingi* и шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* на ст. 20–22 и ст. 20–23 соответственно. Гистологический анализ показал, что в большинстве случаев трансплантат локализовался в полости III-го желудочка головного мозга амфибий, прошедших метаморфоз. Лучшее всего трансплантаты выживали и дифференцировались в нервную трубку зародыша сибирского углозуба. В желудочках мозга трансплантированные клетки нейральной закладки дрозофилы дифференцировались и образовывали несколько типов морфологических структур. Наиболее характерным было формирование в трансплантате выраженного нейропиля. Нейропиль образовывали отростки, выходящие из небольших скоплений клеток. Как во внутренней части, так и на краях трансплантатов возникали ганглиеподобные структуры. Отдельные клетки трансплантата проникали в мозг реципиента и дифференцировались. При этом нервные клетки дрозофилы сохраняли заданные генотипом морфологические особенности (Корочкин, 1992; Савельев и др., 1991; Савельев, Корочкин и др., 1990). У лягушек, обладающих химерным мозгом, повышалась способность к обучению в тесте на выход из лабиринта (Савельев и др., 1991; Saveliev et al., 1997).

Успешные ксенотрансплантации клеток дрозофилы в мозг амфибий стимулировали эксперименты по трансплантации их в мозг млекопитающих — мышей и крыс. Прежде всего, было необходимо разработать простой и эффективный метод идентификации клеток дрозофилы в мозге реципиента. Для этой цели в линии дрозофилы, используемые для ксенотрансплантации и содержавшие мутантные гены *Notch* или *Delta* (с идентичным эффектом на процессы нейрогенеза у мухи), методом микроинъекций в развивающиеся яйца была введена конструкция с геном бактериальной галактозидазы (*lacZ*), продукт которого может быть выявлен с помощью специальной

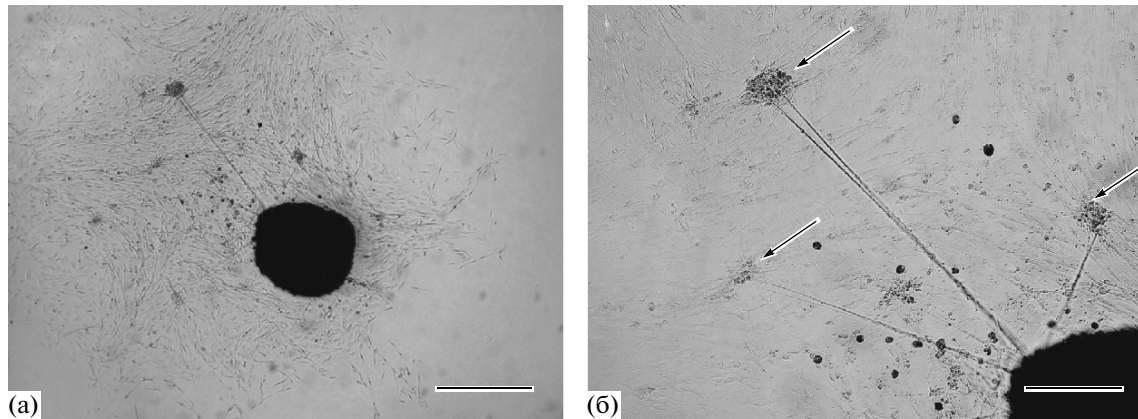
окраски. Этот ген был поставлен под контроль промотора гена белка теплового шока дрозофилы, так что репортерный ген автоматически активировался при температуре тела млекопитающих. Таким образом, были подготовлены условия для проведения экспериментов по введению эмбриональных нейральных тканей дрозофилы в мозг млекопитающих. Предварительные эксперименты показали, что трансплантируемый материал выживал в тканях мозга млекопитающих, однако в отличие от эксперимента с амфибиями клетки дрозофилы постепенно исчезали, так что через месяц обнаруживались лишь единичные клетки трансплантата. Корочкин предложил использовать эмбриональную нервную ткань дрозофилы в качестве носителя трансгенных конструкций для клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона. При паркинсонизме происходит ускоренная гибель дофаминергических нейронов. Данное нарушение связано с образованием альфа-синуклеиновых бляшек. Так как дифференцировка собственных прогениторных клеток не приносит желаемого результата (полученные нейроны также генетически обречены на гибель), в свое время была предложена трансплантация эмбриональных дофаминергических нейронов черной субстанции в поврежденный мозг млекопитающих. Исследования шведских нейробиологов показали, что трансплантация эмбриональных дофаминергических нейронов в мозг взрослых животных с экспериментальной дегенерацией нейронов в черной субстанции, приводит к компенсации дефекта метаболизма дофамина (Bjorklund, 2003; Lindvall, 1998). При аналогичных трансплантациях у человека обнаружили, что рецидив заболевания происходит в течение 1–3 лет. Одной из причин этого является образование глиального рубца, который нарушает связи между трансплантатом и тканью мозга реципиента. Таким образом, необходимо искать пути управления нейральной дифференцировкой трансплантируемого материала для его быстрой интеграции и подавления образования глиального рубца. Для решения этих проблем Корочкиным было предложено использовать генетические конструкции, кодирующие нейротрофические факторы. В ходе работы в лаборатории использовали гены трех факторов: GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor) — глиальный нейротрофический фактор, NGF (nerve growth factor) — фактор роста нервов и BDNF (brain derived neurotrophic factor) — нейротрофический фактор мозга. Выбор трансгенных факторов был обусловлен многочисленными литературными данными о влиянии упомянутых факторов на нервную ткань. Так известно, что инъекция GDNF в желудочки мозга вызывает значительное увеличение тирозингидроксилазной активности в нейронах черной субстанции и стриатума у старых

крыс. Совместное введение GDNF и NGF приводит к повышению холинацетилтрансферазной активности в септуме, гиппокампе, стриатуме и коре и вызывает повышение локомоторной активности у старых крыс (Lapchak et al., 1997).

Поскольку длительное инъектирование фактора в область повреждения чрезвычайно травматично для ткани мозга, а нейротрансплантаты могут долго переживать, не повреждая мозга, то работы были направлены на создание генно-инженерными методами клеток, способных экспрессировать какой-либо нейротрофический фактор. Трансплантаты, содержащие такие клетки, способны длительно выделять факторы в области повреждения мозга.

Для введения генно-инженерных конструкций используют различные популяции соматических или нервных клеток млекопитающих (Tseng et al., 1997). Нами были созданы конструкции на основе вектора pCaSpeг, где исследуемый ген ставится под контроль гена белка теплового шока дрозофилы *HSP70*. Предложенная нами модель выгодно отличается тем, что промотор гена *HSP70* дрозофилы может активироваться при температуре тела млекопитающих, обеспечивая тем самым постоянно высокий уровень экспрессии гена, находящегося под контролем этого промотора.

Чтобы выяснить, будут ли активироваться и функционировать нейротрофические гены млекопитающих в клетках и тканях дрозофилы (Корочкин, 1992; Корочкин и др., 2002) были получены три генно-инженерные конструкции на основе вектора CaSpeг, содержащие один из нейротрофических генов млекопитающих (*Gdnf*, *Bdnf*, *Ngf*). В каждой конструкции нейротрофические гены находились под контролем промотора гена белка теплового шока дрозофилы. Данные конструкции были инъектированы в эмбрионы дрозофилы линии Df(1)w<sup>67c23(2)</sup>, которая содержала ген *white*, обуславливающий фенотип “белые глаза” у взрослых мух. Сами конструкции содержали ген *mini-white*, который позволяет идентифицировать трансформантов в поколении F1 (Павлова и др., 2001; Павлова и др., 2002). В результате селекции мы получили три гомозиготные линии: C3 — содержащая ген человека *Gdnf*, G8 — содержащая ген мыши *Ngf* и G7 — содержащая ген человека *Bdnf*. Каждая из этих линий была скрещена с линией, несущей ген бактериальной галактозидазы *lacZ* и мутацию *Delta* (вызывает трансформацию вентральной нейроэктодермы в нейральном направлении). Полученные линии C3-1M, G8-1M и G7-1M содержали *lacZ* и *Delta*, а также гены млекопитающих *Gdnf*, *Ngf*, *Bdnf* соответственно. Было установлено, что конструкция с геном *Gdnf* встроилась во вторую хромосому линии C3, а конструкции с генами *Ngf* и *Bdnf* встроились в третью хромосому линий G8 и G7 соот-



Совместное культивирование спинального ганглия новорожденной крысы и нервной ткани эмбриона трансгенной дрозофилы, экспрессирующей *Bdnf*. Масштаб а – 100 мкм; б – 50 мкм. Стрелками отмечено положение трансфицированных клеток дрозофилы.

ответственно. Методом блот-гибридизации по Саузерну были подтверждены вставки в геном дрозофилы. Контроль экспрессии встроенных генов был осуществлен методом блот-гибридизации по Нозерну. Аналогичный анализ экспрессии мРНК был проведен и для конечных линий G7-1M, G8-1M и C3-1M (Павлова и др., 2001, 2002; Pavlova et.al., 2003).

Индукцированную экспрессию мРНК нейротрофических факторов наблюдали только при воздействии на эмбрионы шоковой температуры (37°C). Методом гибридизации *in situ* на целых эмбрионах трансгенной линии C3-1M индуцированная транскрипция человеческого *Gdnf* обнаружена на всех стадиях эмбрионального развития, как у гетерозигот *Dl/+*, так и у гомозиготных (*Dl/Dl*) особей. На стадии синцитиальной и клеточной бластодермы реакция была умеренной, равномерно распределенной по поверхности эмбриона. По ходу сегментации повышенная экспрессия гена *Gdnf* наблюдалась в парасегментах, в результате чего формировался характерный “тигровый” рисунок окраски. С развитием нейральных элементов областью преимущественной локализации мРНК гена *Gdnf* являлась центральная нервная система эмбрионов. Соответствующие транскрипты были выявлены как в головном, так и в торакальных ганглиях. После воздействия теплового шока на эмбрионы линий G7-1M и G8p1M были обнаружены мРНК введенных генов *Bdnf* и *Ngf*, соответственно, на всех стадиях эмбрионального развития, а также у личинок. Как и в случае с геном *Gdnf*, на стадии синцитиальной и клеточной бластодермы наблюдали умеренную реакцию равномерно распределенную по всей поверхности эмбриона. При изучении эмбрионов трансгенной линии дрозофилы, экспрессирующей *Ngf*, было обнаружено, что по мере сегментации повышенная экспрессия гена на-

блюдалась в парасегментах, что давало характерный “тигровый” рисунок. С развитием нейральных элементов у эмбрионов линии G8-1M с трансгенным *Ngf* была обнаружена интенсивная окраска в области головного ганглия, в то время как у эмбрионов линии G7-1M с трансгенным *Bdnf* окраска наблюдалась практически во всех областях эмбриона. (Павлова и др., 2001, 2002; Pavlova et.al., 2003).

Далее была проверена способность клеток дрозофилы, содержащих трансгены нейротрофических факторов, влиять на развитие нервных клеток и нейробластов млекопитающих *in vitro*. С этой целью фрагменты нейроэктодермы эмбрионов, содержащих трансгены нейротрофических факторов, ко-культивировали со спинальными ганглиями новорожденных крысят (Pavlova et al., 2003). В контрольных культурах отростки нервных клеток появлялись не ранее 3-х суток. При добавлении в культуру нейроэктодермы эмбриона трансгенной линии дрозофилы, содержащей ген *Bdnf* человека, наблюдался интенсивный рост отростков нервных клеток по направлению к ткани дрозофилы (рис. 1). Этот процесс начинался уже спустя 1 ч. после начала ко-культивирования. Аналогичный эффект оказывали и эксплантаты с двумя другими трансгенами (*Gdnf*, *Ngf*). Нейроэктодерма диких линий дрозофилы не влияла на рост отростков. Известно, что при культивации спинального ганглия новорожденных крысят, отростки появляются на 3-и сут и растут равномерно во все стороны. При добавлении в среду нейротрофических факторов, отростки образуются быстрее, но также не имеют предпочтительного направления роста (Родионов, 1996). В нашей работе трансфицированные клетки стимулировали направленный рост отростков эмбрионального спинального ганглия.

Трансгенные линии дрозофилы с геном, человека, кодирующим глиальный нейротрофический фактор (*GDNF*) трансплантировали в мозг млекопитающих. *GDNF*, член суперсемейства TGF-beta, известен своим трофическим влиянием на дофаминэргические нейроны в развивающемся мозге и мозге взрослых животных (Sauer et al., 1995). *GDNF* оказывает трофическое влияние и на другие популяции нейронов мозга. Его введение в желудочки или паренхиму мозга способствует выживанию ишемизированных нейронов неокортекса (Wang et al., 1997). В экспериментах, проведенных совместно с М.А. Александровой, эмбриональные нервные клетки линии СЗ-1М с трансгенным *Gdnf* и ткань неокортекса 15-суточных эмбрионов крысы трансплантировали в затылочную кору мозга взрослых крыс (Александрова и др., 2000). Через 33 сут трансплантаты были обнаружены у всех исследуемых крыс. При этом нервные клетки дрозофилы при трансплантации в мозг не погибали и образовывали отростки. Иммуногистохимическая реакция на *lacZ* подтвердила успешность приживания трансплантированных нервных клеток дрозофилы. В этих клетках выявлен также белок *GDNF* (Александрова и др., 2000). Таким образом, нейротрофический ген, под контролем промотора *HSP70* дрозофилы активизировался при попадании ткани дрозофилы в мозг млекопитающих. Котрансплантируемый клеточный материал (эмбриональный неокортекс крысы) интенсивно экспрессировал тирозингидроксилазу. Основным результатом этих исследований является достижение блокирования образования глиального рубца между трансплантатом и тканями реципиента. Следует отметить, что клетки дрозофилы через месяц после трансплантации практически исчезали. в трансплантате, не вызывая воспалительных процессов (Александрова и др., 2000).

Таким образом, были получены трансгенные клеточные культуры, в одном случае стимулирующие направленное образование нейральных отростков (трансген *Bdnf*), в другом — повышающие приживляемость трансплантатов (трансген *Gdnf*). Трансгенные клеточные культуры, продуцирующие *BDNF*, можно использовать в тех случаях, где необходима стимуляция образования отростков от нервных тканей или клеток в заданном направлении (например для восстановления слуха при атрофии нервных волокон в кортиевом органе или спиральном ганглии).

Трансгенные эмбриональные нервные клетки дрозофилы, экспрессирующие *Gdnf*, блокируют образование глиального рубца, что важно при лечении нейродегенеративных заболеваний. Было выдвинуто предположение, что это обусловлено сочетанием нейротрофического фактора и белков теплового шока дрозофилы, которые активируются при температуре тела млекопитающих в

клетках дрозофилы после трансплантации. Возможно, *Hsp70*, наряду с трансгенным фактором *GDNF*, позволяет клеткам дрозофилы, а также клеткам котрансплантируемого эмбрионального крысиного мозга, выжить в ишемических условиях нового микроокружения и повышенной температуры. Точный механизм блокирования образования глиального рубца вокруг нейротрансплантата остается неясным и нуждается в дальнейших исследованиях. Короткая продолжительность переживания клеток дрозофилы после трансплантации их в ткань млекопитающих облегчает применение этих клеток в качестве носителя терапевтического фактора, так как при этом ограничивается длительность воздействия препарата и снижается вероятность неоплазии.

При использовании в качестве носителя нейротрофических трансгенов клеток млекопитающих следует учитывать, что материал, используемый для генно-клеточной терапии наращивают и трансфицируют в культуре. Клетки в условиях культуры лишены специфического влияния тканевого окружения (в частности стволовые клетки оказываются вне ниши, поддерживающей их статус) и нуждаются в ростовых и трофических факторах для своей дифференцировки. Для дальнейших исследований был выбран фактор *GDNF*, который способен снижать образование глиального рубца при трансплантациях.

Была получена генетическая конструкция на основе вектора pEGFP-N1, содержащая ген человеческого нейротрофического фактора *Gdnf* и маркерный ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). Данная конструкция была трансфицирована в человеческие клетки линии HEK293. Наличие вставки и ее экспрессия были подтверждены Саузерн-, Нозерн- и Вестерн-гибридизациями. Правильность вставки также была подтверждена сиквенсом. Клетки трансплантировали взрослым (2 мес.) мышам линии СВА. В мозг (полосатое тело) животных подопытной группы вводили клетки, продуцирующие химерный белок *GDNF/GFP*, а животным контрольной группы — клетки, содержащие GFP. Срезы мозга окрашивали иммуногистохимически на маркеры рубцовой ткани с помощью антител на глиальный кислый фибриллярный белок (GFAP), актин, фибронектин и коллаген типа IV. Клетки, синтезирующие GFP, располагались плотной группой в средней части полосатого тела. Глиальная реакция выражалась в увеличении количества клеток, экспрессирующих GFAP, а также в увеличении экспрессии актина, фибронектина и коллагена типа IV (Павлова и др., 2006).

На 5-е сут после трансплантации различия в силе глиальной реакции не обнаружены. 9-е сут различия были минимальны. На 18-е сут после трансплантации глиальная реакция в контрольной группе значительно превышала реакцию в

опытной группе (Павлова и др., 2006). Результаты подтверждают перспективность применения GDNF в качестве нейропротектора в тканевой терапии.

Известно, что при температуре тела млекопитающих клетки дрозофилы активно синтезируют белки теплового шока, имеющие важное адаптивное значение (Samali et al., 1998; Hightower et al., 1989; Houenou et al., 1996; Jaattela et al., 1992; Holmberg, 2001). На этом основании мы предположили, что выделение этих белков из клеток дрозофилы также вносит вклад в торможение формирования рубцовой ткани. Корочкин с соавт. подтвердил, что огромную роль в снижении образования глиального рубца играет белок теплового шока (HSP70), который синтезируется в клетках дрозофилы при температуре тела млекопитающих (Корочкин и др., 2001a, 2002; Korochkin et al., 2004b). Наши эксперименты подтверждают, что оптимальным вариантом факторов для предотвращения образования глиального рубца при трансплантациях является сочетание белка теплового шока и нейротрофических факторов.

Таким образом, трансплантация трансгенных клеток, продуцирующих нейротрофические факторы, в мозг животных тормозит образование глиального рубца. В отличие от клеток дрозофилы, человеческие клетки линии HEK293, в мозге млекопитающих выживали более длительное время. Вместе с тем комбинация эмбриональных нейральных клеток дрозофилы и синтеза трансгенного *Gdnf* давала более полное подавление глиальной реакции и может считаться наиболее оптимальной при трансплантациях.

Результаты исследований, начатых под руководством Л.И. Корочкина подтверждают перспективность применения трансгенных нейротрофических факторов в качестве нейропротекторов в тканевой терапии. Дальнейшее совершенствование техники невирусного переноса терапевтических генов в клетки млекопитающих позволит создавать эффективные клеточные препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний. Наиболее продуктивным мы считаем создание многокомпонентных генетических конструкций, которые содержат несколько терапевтических факторов, усиливающих действие друг друга. Другим аспектом дальнейших разработок будет использование управляющих элементов, включающих экспрессию трансгенов в ответ на внешний сигнал и/или на патологическое состояние тканевого окружения.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 11-04-00790-а, 11-04-01157-а), Государственным контрактом П720, № 16.512.11.2100.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александрова М.А., Павлова Г.В., Ревущин А.В. и др. Влияние чужеродного гена *GDNF* на развитие трансплантата и ксенотрансплантата в мозге крыс // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1553–1560.
- Корочкин Л.И. Перспективы развития нейрогенетики в России // Вестник РАН. 1992. Т. 7. С. 63–75.
- Корочкин Л.И. Новые подходы в генетике развития и генотерапии: ксенотрансплантация эмбриональных, нервных клеток дрозофилы в мозг позвоночных // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1436–1442.
- Корочкин Л.И. Стволовые клетки // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 3. С. 164–166.
- Корочкин Л.И., Александрова М.А., Башкиров В.Н. и др. Ксенотрансплантация эмбриональной нервной ткани нейромутанта *Drosophila* стимулирует развитие трансплантата в мозгу крысы в нейральном направлении и блокирует образование глиального рубца // Цитология. 2002. Т. 44. № 12. С. 1181–1185.
- Корочкин Л.И., Александрова М.А., Павлова Г.В. и др. Влияние семейства HSP70 белков при алло- и ксенотрансплантации в мозг крысы // Цитология. 2001. Т. 40. С. 803–806.
- Корочкин Л.И., Александрова М.А., Ревущин А.В. и др. Эффект белка теплового шока HSP70 на формирование глиального рубца при нейротрансплантации // ДАН. 2001. Т. 383. № 3. С. 113–115.
- Корочкин Л.И. Геном, клонирование, происхождение человека. Фрязино: Век-2, 2004.
- Корочкин Л.И., Михайлов А.Т. Введение в нейрогенетику. Москва: Наука, 2000.
- Павлова Г.В., Ефанов А.А., Башкиров В.Н. и др. Экспрессия генов *ngf* и *bdnf* человека в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster* // Цитология. 2002. Т. 44. № 11. С. 1104–1108.
- Павлова Г.В., Модестова Е.А., Венгрова С.Н. и др. Экспрессия человеческого гена *gdnf* в трансгенной линии *Drosophila melanogaster* // ДАН. 2001. Т. 376. С. 694–696.
- Павлова Г.В., Ревущин А.В., Мирошникова О.А. и др. Влияние чужеродного гена *gdnf* в ксенотрансплантатах на посттравматические процессы в мозге мышей // Молекулярная медицина. 2006. Т. 2. С. 44–48.
- Родионов И.М. Фактор роста нервов // Соросовский образовательный журнал. 1996. Т. 3. С. 17–22.
- Савельев С.В., Иванов А.И., Гулимова В.И. и др. Изменения в развитии амфибий после трансплантации в мозг нейральных зародышевых клеток *Drosophila* // ДАН. 1991. Т. 316. № 3. С. 735–738.
- Савельев С.В., Корочкин Л.И., Иванов А.И. и др. Трансплантация нейральной закладки дрозофилы в нервную трубку зародышей амфибий // ДАН СССР. 1990. Т. 313. № 6. С. 1491–1493.
- Bjorklund A., Dunnett S.B., Brundin P. et al. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease // Lancet Neurol. 2003. V. 2. P. 437–45.
- Hightower L., Guidon P. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins // J. Cell Physiol. 1989. V. 138. P. 257–266.

- Holmberg C.I. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1 // *The EMBO Journal*. 2001. V. 20. P. 3800–3810.
- Houenou L., Li L., Lei M. et al. Exogenous heat shock cognate protein Hsp70 prevents axotomy-induced death of spinal sensory neurons // *Cell Stress Chap*. 1996. V. 1. P. 161–166.
- Ivanov A.I., Frolova I.P., Zakharov I.K. et al. Analysis of disorders in development of the brain in the new Notch mutant of *Drosophila melanogaster* // *Dokl Akad Nauk*. 1993. V. 331(6). P. 776–780.
- Jaattela M., Wissing D., Bauer P.A. et al. Major heat shock protein Hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity // *EMBO J*. 1992. V. 11. P. 3507–3512.
- Korochkin L.I., Alexandrova A., Pavlova G. et al. Genetic engineering methods of the regulation of stem cells differentiation // *Biotechnology and Medicine*, Nova Science Publishers. 2004. P. 121–136.
- Korochkin L.I., Alexandrova A., Pavlova G. et al. Protein Hsp70 blocks the glial scar formation around the neurotransplant // *Biotechnology and Medicine*, Nova Science Publishers. 2004. P. 137–141.
- Korochkin L., Saveliev S., Ivanov A. et al. Nerve cells of *Drosophila* Notch mutant are differentiated inside amphibian brain: a new approach for the analysis of genetic control of nerve cell differentiation // *Genetica (Netherl.)*. 1991. V. 85. P. 23–28.
- Lapchak P.A., Miller P.J., Jiao S. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces the dopaminergic and cholinergic phenotype and increases locomotor activity in aged Fisher 344 rats // *Neurosci*. 1997. V. 77. P. 745–752.
- Lindvall O. Update on fetal transplantation: the Swedish experience // *Mov. Disord*. 1998. V. 13. P. 83–7.
- Nedeljkovich M., Korochkin L.I., Baschkirov V.N. et al. Genetic analysis of transgenic *D. melanogaster* // *DIS*. 1997. V. 80. P. 10–11.
- Pavlova G., Enblom A., Revishchin A. et al. The influence of donor *Drosophila* cells on survival of peripherally grafted embryonic or fetal rat dorsal root ganglia // *Cell Transplantation*. 2003. V. 12. P. 705–715.
- Pouzet B., Hagège A.A., Vilquin J.T. et al. Transplantation of autologous skeletal myoblasts in ischemic cardiac insufficiency // *J. Soc. Biol*. 2001. V. 195. P. 47–49.
- Price M.L., Hoffer B.J., Granholm A.C. Effects of GDNF on fetal septal forebrain transplants *in oculo* // *Exp. Neurol*. 1996. V. 141. P. 181–189.
- Samali A., Orrenius S. Heat shock protein: regulators of stress response and apoptosis // *Cell Stress Chap*. 1998. V. 3. P. 228–236.
- Sauer H., Rosenblad C., Björklund A. Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. V. 92. P. 8935–8939.
- Saveliev S., Lebedev V., Evgenov M. et al. Chimeric brain: theoretical and clinical aspects // *Intern. J. Develop. Biol*. 1997. V. 41. P. 801–808.
- Stevens L.C. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos // *Dev. Biol*. 1970. V. 21. P. 364–382.
- Tseng J.L., Baetge E.E., Zurn A.D. GDNF reduces drug-induced rotational behavior after medial forebrain bundle transection by a mechanism not involving striatal dopamine // *J. Neurosci*. 1997. V. 17. P. 325–333.
- Wang Y., Lin S.Z., Chiou A.L. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia-induced injury in the cerebral cortex // *J. Neurosci*. 1997. V. 17. P. 4341–4348.

## Transgenic Cell Cultures That Synthesize Neurotrophic Factors and the Possibility of Therapeutic Use of Its Cells

G. V. Pavlova<sup>b</sup>, N. N. Kanaykina<sup>a</sup>, D. Yu. Panteleev<sup>a</sup>, V. E. Okhotin<sup>a</sup>, and A. V. Revishchin<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 34/5, Moscow, GSP-1, 117984 Russia

<sup>b</sup>OOO Institute of Medicine and Transplantation of Cells. ul., Bolshaya Pochtovaya 36/5, Moscow, 105082 Russia

e-mail: lkorochkin@mail.ru; revishchin@mail.ru

**Abstract**—Under the leadership of Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences L.I. Korochkin, the Laboratory of Neurogenetics and Developmental Genetics (Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences) for many years has been conducting studies of nervous system development, neural cell differentiation, and application of gene and cell technology to cure neurodegenerative diseases. The results of the study initiated by L.I. Korochkin and continued by his scientific successors support the direction of allocation of transgenic neurotrophic factors and heat-shock proteins as neuroprotectors for cell therapy. Potential for usage of promoter of *HSP70* heat-shock gene of *Drosophila* to create transgenic constructs for therapy has been shown. Further improvement of technology of nonvirus transfer for therapeutic genes, as well as production of multicomponent genetic constructs coding several therapeutic factors with synergy effect, would stimulate creation of efficient cell medicals to cure neurodegenerative diseases.

**Keywords:** neural cells from transgenic *Drosophila* embryos, neural differentiation, glial scar, transplantation, dorsal root ganglion, neurotrophic factors, transgenic cells