

	Название статьи	Страницы	Цит.
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ			
☐	ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭТОПОЗИДА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОННЫХ ТЕЛ, СФОРМИРОВАННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ МЫШИ Гордеева О.Ф.	381	1
КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ			
☐	РАННИЙ МОРФОГЕНЕЗ РЕСНИЧАТЫХ КЛЕТОК В РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ЧЕЛОВЕКА Куртова А.И., Черников В.П., Савельев С.В.	389	0
ФИЗИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ			
☐	ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АДРЕНО- И ПУРИНОРЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИМОСТИ МИОКАРДА КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ Аникина Т.А., Зверев А.А., Ситдилов Ф.Г., Анисимова И.Н.	396	0
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ			
☐	ПОЛУЧЕНИЕ ХИМЕРНЫХ БЛАСТОЦИСТ МЫШИ МЕТОДАМИ ЛАЗЕРНОЙ НАНОХИРУРГИИ Шахбазян А.К., Тарантул В.З., Залесский А.Д., Рябова А.В., Лощенов В.Б., Антонов С.А., Гривенников И.А., Кривохарченко А.С., Карменян А.В., Надточенко В.А.	403	0
ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ			
☐	ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНА ERECTA2 НА РАЗВИТИЕ ПОБЕГА ARABIDOPSIS THALIANA Солтабаева А.Д., Кавай-оол У.Н., Куприянова Е.В., Ежова Т.А.	409	0
ОНТОГЕНЕЗ И ЭВОЛЮЦИЯ			
☐	ОДОНТОЛОГИЧЕСКАЯ АНОМАЛИЯ У АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ NEOVISON VISON(CARNIVORA, MUSTELIDAE) И ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ЕЕ ПОЯВЛЕНИЯ Кораблев П.Н., Кораблев М.П., Кораблев Н.П., Туманов И.Л.	417	0
ОНТОГЕНЕЗ И ЭКОЛОГИЯ			
☐	НАРУШЕНИЕ РАЗВИТИЯ ГОНАД КАРЛИКОВЫХ САМОК И ПОНИЖЕННАЯ ВЫЖИВАЕМОСТЬ ИХ ПОТОМСТВА КАК ПРИЧИНЫ РЕДКОСТИ ЖИЛЫХ ПОПУЛЯЦИЙ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (SALMO SALAR L.) Махров А.А., Пономарева М.В., Хаймина О.В., Гилепп В.Е., Ефимова О.В., Нечаева Т.А., Василенкова Т.И.	423	1
ДИСКУССИИ			
☐	УХУДШЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ СТАРЕНИИ: ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ ИЛИ СТОХАСТИКА? Хохлов А.Н.	434	0
ПОТЕРИ НАУКИ			
☐	ПАМЯТИ АНДРЕЯ ПАВЛОВИЧА ДЫБАНА	441	0
☐	ПАМЯТИ ВЛАДИМИРА НИКИТИЧА ЯРЫГИНА	442	0

УДК 611-013;57.086.835;577.218

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭТОПОЗИДА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОИДНЫХ ТЕЛ, СФОРМИРОВАННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ МЫШИ¹

© 2013 г. О. Ф. Гордеева

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.07.13 г.

Окончательный вариант получен 10.07.13 г.

Начальные стадии *in vitro* дифференцировки эмбриональных стволовых клеток рассматривают в качестве уникальных трехмерных моделей раннего развития млекопитающих для фундаментальных, фармакологических и токсикологических исследований. Ранее было показано (Гордеева, 2012), что оценка эмбриотоксичности на модели недифференцированных эмбриональных стволовых клеток может быть недостаточно точной при прогнозировании токсических воздействий на эмбрионы млекопитающих, поэтому мы провели сравнительное изучение повреждающих эффектов на примере цитостатика этопозид в недифференцированных эмбриональных стволовых клетках и эмбрионидных телах разных стадий дифференцировки, которые имеют сходные трехмерные структуры с ранними эмбрионами. Анализ роста, клеточной гибели и динамики дифференцировки недифференцированных эмбриональных стволовых клеток и эмбрионидных тел, подвергшихся воздействию этопозид, показал, что цитостатические и цитотоксические эффекты этопозид являются стадие-специфическими. Максимальные повреждающие эффекты этопозид выявлены в недифференцированных эмбриональных стволовых клетках, а в процессе роста и дифференцировки эмбрионидных тел степень его цитотоксичности снижается. Мы предполагаем, что увеличение клеточного объема эмбрионидных тел и развитие гипертрофированного слоя внезародышевой энтодермы приводят к снижению диффузии, транспорта и метаболизма химических и биологически активных веществ и препятствуют действию повреждающих факторов.

Ключевые слова: эмбрионидные тела, эмбриональные стволовые клетки, этопозид, цитостатики, цитотоксичность, эмбриотоксичность дифференцировка.

DOI: 10.7868/S0475145013060037

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) млекопитающих представляют собой уникальную *in vitro* модель раннего развития млекопитающих для фундаментальных, фармакологических и токсикологических исследований. В исследованиях механизмов раннего развития млекопитающих с использованием модели *in vitro* дифференцировки ЭСК важную роль играет экспериментальное трехмерное (3D) воспроизведение межклеточных взаимодействий в эмбриональных клеточных субпопуляциях, т.к. 3D-модели наиболее адекватно отражают процессы, протекающие в биологических объектах (Yamada et al., 2007).

На ранних стадиях дифференцировки ЭСК формируют клеточные сфероиды – эмбрионидные тела (ЭТ), которые являются аналогами эмбрионов

на предгастрюляционных стадиях развития. Несмотря на отсутствие трофобласта в ЭТ, 3D-структуры ЭТ начальных стадий дифференцировки имеют значительное сходство с 3D-структурами эмбрионов на стадиях морулы, бластоцисты и раннего яйцевого цилиндра. В процессе дифференцировки ЭТ происходит реорганизация их 3D-структуры: формируется внешний слой внезародышевой энтодермы и внутренний слой эпибласт-подобных клеток, в котором дифференцируются клетки-предшественники трех зародышевых листков (Ducibella et al., 1975; Gardner, 1982; Гордеева и др., 2002). В дифференцирующемся “двухслойном” ЭТ изменяются взаимодействия между соседними клетками и клетками разных слоев, что оказывает влияние на межклеточный транспорт сигнальных белков и низкомолекулярных веществ (Sachlos et al., 2008; Van Winkle et al., 2012). В связи с этим в исследованиях молекуляр-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379-а).

ных механизмов, регулирующих процессы специализации клеток-предшественников трех зародышевых листков и внезародышевых структур, а также при изучении фармакологических и токсикологических эффектов различных химических веществ и лекарственных препаратов необходимо учитывать изменения 3D-структуры и межклеточных коммуникаций в ЭТ в процессе дифференцировки.

В исследованиях влияния цитостатиков на плюрипотентные клетки и бластоцисты мыши было установлено, что цитостатики разных групп вызывали сильный цитотоксический эффект в недифференцированных ЭСК и клетках внутренней клеточной массы бластоцист, тогда как дифференцирующиеся ЭСК и клетки трофобласта бластоцист были менее чувствительны к повреждающим эффектам (Гордеева, 2012). Кроме того, бластоцисты с интактной 3D-структурой продолжали нормальное развитие в течение 48 ч после воздействия цитостатиков. Эти данные свидетельствуют о том, что 3D-структура ранних эмбрионов и различная чувствительность клеток разных эмбриональных популяций к химическим веществам являются ключевыми элементами защиты эмбрионов от повреждающих факторов. В связи с полученными результатами возник вопрос о формировании защитных механизмов от повреждающих факторов в аналогах ранних эмбрионов — ЭТ разных стадий дифференцировки. Поэтому целью данной работы являлось исследование эффектов биологически активных веществ в ЭТ разных стадий дифференцировки с различной 3D-структурой на примере изучения прямых и отсроченных повреждающих эффектов цитостатика этопозиды.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование ЭСК *in vitro*. В работе были использованы ЭСК мыши линии R1, ранее любезно предоставленные доктором А. Макларен (A. McLaren, WTCR Institute of Cancer and Developmental Biology, Cambridge, UK). Для поддержания в недифференцированном состоянии ЭСК мыши культивировали в среде DMEM, содержащей 2 mM L-глутамин, 0.1 mM заменимых аминокислот, 0.1 mM β -меркаптоэтанола и 15% телячьей фетальной сыворотки ("HyClone", США). Недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки мыши поддерживали на фидере из первичных эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ), инактивированных митомицином C (10 мкг/мл) ("Sigma", США), как описано ранее (Гордеева и др., 2009). В ходе экспериментов ЭСК мыши культивировали в бесфидерной системе, в среде с фактором ингибирования лейкемии (leukemia inhibitory factor, LIF, 10 нг/мл) ("Sigma", США).

Получение эмбрионидных тел. Для получения стандартных ЭТ использовали метод "висячей капли". Для формирования сфероидов на крышку чашки Петри помещали капли среды, содержащие 300 клеток. Для формирования и культивирования ЭТ использовали среду для поддержания ЭСК мыши без добавления LIF. Сформированные в течение трех суток культивирования ЭТ собирали из капель, переносили в планшеты с низкодгезивной поверхностью для дальнейшего культивирования и дифференцировки в течение 10 дней. На 1, 5 и 10 дни культивирования ЭТ (ЭТ1, ЭТ5 и ЭТ10) переносили в новые планшеты и подвергали воздействию этопозиды ("Sigma", США).

Изучение эффектов этопозиды в ЭСК и ЭТ. Для изучения цитостатических и эмбриотоксических эффектов этопозиды в ЭСК и ЭТ разных стадий развития были выбраны две активные дозы 1 и 10 μ M на основании данных литературы из базы данных TOXNET, U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>) и наших предыдущих исследований (Гордеева, 2012). Все эксперименты проводили в трех сериях.

Недифференцированные ЭСК, ЭТ1, ЭТ5 и ЭТ10 ($n = 30$) культивировали в течение 24 ч в среде, содержащей 1 и 10 μ M этопозиды. После завершения экспериментов подсчитывали число выживших ЭСК и измеряли диаметры ЭТ в контрольных и опытных группах для определения их объемов.

Для изучения отсроченных эффектов этопозиды ЭСК и ЭТ разных стадий развития, подвергшиеся воздействию этопозиды, отмывали средой DMEM трижды и культивировали в течение последующих 72 ч в среде без этопозиды (24 + 72 ч). По завершении экспериментов подсчитывали число выживших ЭСК и измеряли диаметры ЭТ.

Для оценки эффектов этопозиды в сфероиде вычисляли изменения объемов ЭТ в опытных группах по отношению к соответствующей контрольной группе. Статистический анализ размеров ЭТ проводили с использованием ANOVA и парного критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $p < 0.001$.

Анализ клеточной гибели в ЭТ. Ранние и поздние стадии клеточной гибели исследовали в ЭТ разных стадий развития в контрольных и экспериментальных группах, используя набор для выявления апоптотических и некротических клеток Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor 488 and Propidium Iodide for Flow Cytometry ("Molecular Probes", США). Клетки на ранних стадиях апоптоза выявляли с помощью данного набора, используя реакцию связывания фосфатидилсерина в мембранах апоптотических клеток с ре-

комбинантным аннексином V, конъюгированным с флуорохромом Alexa Fluor 488. Клетки на поздних стадиях апоптоза и некроза выявляли при окраске йодидом пропидия. Живые клетки не окрашиваются этими компонентами набора. ЭТ инкубировали в растворе аннексина V и йодида пропидиума в течение 15 мин, следуя протоколу производителя. После окраски ЭТ помещали в 18-луночные планшеты со стеклянными лунками (Ibidi, Германия) и сразу анализировали на конфокальном микроскопе Leica TSC SP5 1 ("Leica Microsystems GmbH", Германия).

Иммуногистохимический анализ. Экспрессию транскрипционных факторов Oct4 и Gata4 в ЭТ выявляли с помощью иммунофлуоресцентного анализа по методике, описанной ранее (Гордеева и др., 2009). Для выявления экспрессии белков Oct4 и Gata4 использовали антитела к этим белкам в разведениях 1 : 100 ("Santa Cruz Biotechnology", США). В качестве вторичных антител использовали антитела цыпленка против кроличьих иммуноглобулинов кролика и козы, конъюгированные флуорохромами Alexa 594 и Alexa 488, в разведении 1:900 ("Molecular Probes", США). После просветления в глицерине ЭТ сканировали на конфокальном микроскопе Leica TSC SP5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ клеточного роста в ЭСК и ЭТ разных стадий дифференцировки, подвергшихся воздействию этопозида. Исследование цитостатических и цитотоксических эффектов этопозида в ЭСК и ЭТ разных стадий дифференцировки выявило существенные различия в чувствительности к цитостатику между ЭСК и ЭТ, а также между ЭТ разных стадий развития. (рис. 1 и 2). Так, после 24 ч воздействия 1 и 10 μM этопозида выживали лишь $10.25 \pm 1.0\%$ и $0.92 \pm 0.38\%$ ЭСК от контроля соответственно и $9.61 \pm 0.89\%$ и $0.89 \pm 0.19\%$ сохраняли жизнеспособность через 72 ч после отмены этопозида. Причем эффекты этопозида были необратимыми, т.к. выжившие клетки прекращали пролиферировать.

В то же время, после 24 ч воздействия этопозида рост ЭТ замедлялся, однако большинство клеток сохраняли жизнеспособность (рис. 1–3). Анализ роста ЭТ показал, что размеры диаметров ЭТ, подвергшихся воздействию этопозида, были статистически достоверно меньше для ЭТ1 и ЭТ5, однако эти изменения были не столь значительными, как в недифференцированных ЭСК. С другой стороны, анализ изменений объемов ЭТ показал, что клеточные потери в ЭТ1 и ЭТ5 составляли 30–50% клеточной массы по сравнению с контролем, а в ЭТ10 – 5–30%.

Однако наибольшие повреждающие эффекты цитостатика в ЭТ были обнаружены через 72 ч куль-

тивирования после отмены этопозида. Так, объемы ЭТ1, подвергшихся воздействию 1 и 10 μM этопозида, составляли только $10.00 \pm 0.30\%$ и $4.90 \pm 0.15\%$ от контроля, ЭТ5 – $28.10 \pm 0.85\%$ и $16.15 \pm 0.64\%$, а ЭТ10 – $81.75 \pm 1.91\%$ и $30.75 \pm 0.92\%$ соответственно (рис. 2а). Необходимо отметить, что в отличие от ЭСК, все ЭТ, подвергшиеся действию этопозида, за исключением группы ЭТ1 + 10 μM этопозида, были способны восстанавливать свой рост через 7 дней после отмены цитостатика (данные не представлены). Таким образом, анализ роста показал, что цитостатический эффект этопозида наиболее выражен в ЭСК и наименее в ЭТ10.

Анализ клеточной гибели в ЭТ разных стадий дифференцировки, подвергшихся воздействию этопозида. Анализ клеточной гибели в ЭТ показал, что цитотоксические эффекты этопозида являются дозозависимыми (рис. 3). В ЭТ, подвергшихся воздействию этопозида, число клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза (аннексин V- и пропидий-позитивных), было существенно больше, чем в контроле. Наибольшее число погибших клеток было выявлено в ЭТ1 и ЭТ5, в особенности через 72 ч после отмены этопозида (ЭТ1, ЭТ5 24 + 72 ч). В то же время доля погибших клеток в ЭТ10 в контрольных и опытных группах различалась незначительно. Учитывая значительное уменьшение объема ЭТ10 через 72 ч после воздействия 10 μM этопозида, можно предположить, что погибающие клетки быстро слущивались с поверхности ЭТ, поэтому их доля была невелика.

Эффекты этопозида на динамику дифференцировки ЭТ, подвергшихся воздействию этопозида. Для изучения эффектов этопозида на процессы дифференцировки был проведен иммуногистохимический анализ экспрессии транскрипционных факторов Oct4 и Gata4, являющихся специфическими факторами для плюрипотентных клеток и клеток внезародышевой энтодермы соответственно (рис. 4). Было обнаружено, что цитотоксические и цитостатические эффекты этопозида имели опосредованное влияние и на процессы дифференцировки. В ЭТ1, подвергшихся воздействию этопозида, экспрессия Oct4 снижалась в большем числе клеток через 24 ч после воздействия и максимально через 72 ч после отмены. Причем в клетках ЭТ1, подвергшихся воздействию 10 μM этопозида, экспрессия Oct4 полностью прекращалась, а Gata4 не экспрессировался, что указывает на массовую гибель и плюрипотентных, и дифференцированных клеток. В ЭТ5 и ЭТ10 эти эффекты этопозида значительно снижались, даже при дозе 10 μM . Экспрессия Oct4 сохранялась в большинстве клеток ЭТ5 и ЭТ10. Однако динамика дифференцировки ЭТ5 и ЭТ10 изменялась, т.к. экспрессия фактора Gata4 была выявлена в меньшем числе клеток по сравнению

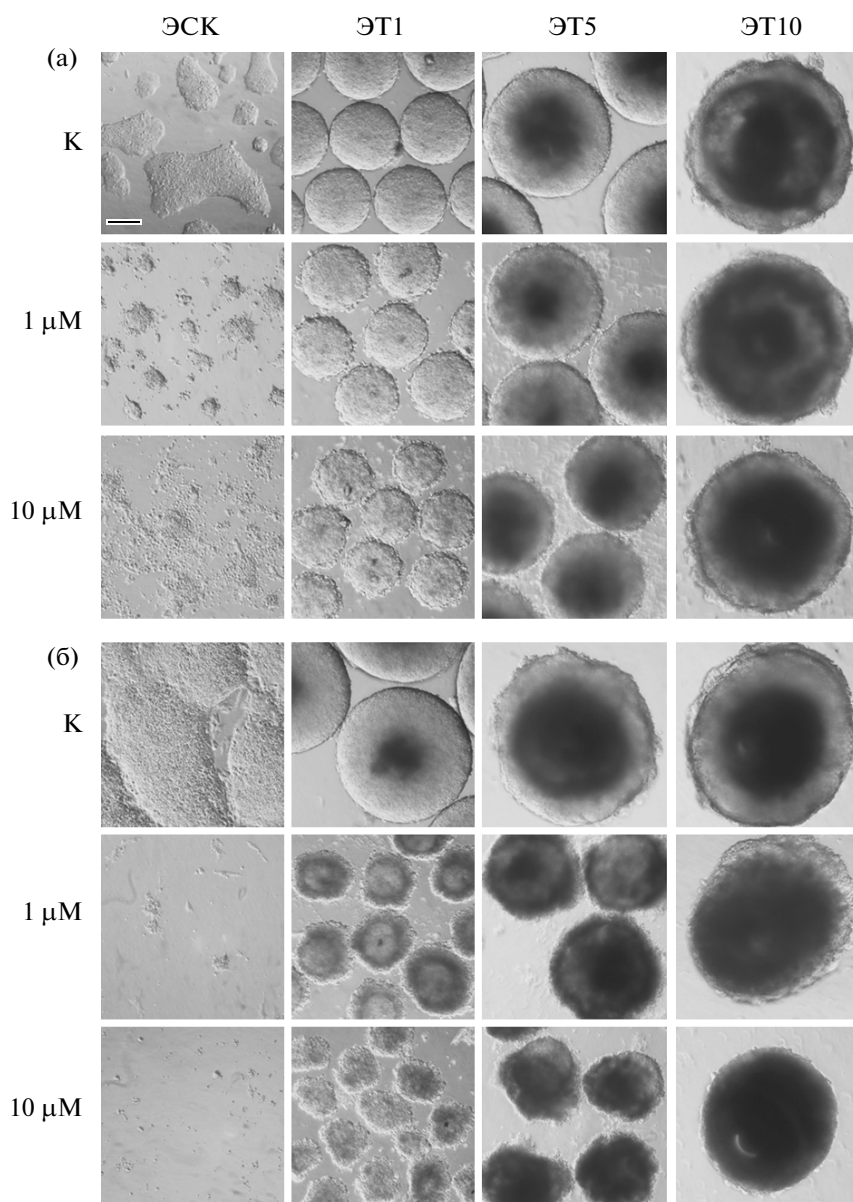


Рис. 1. Морфология ЭСК и ЭТ разных стадий развития после воздействия этопозиды. а — через 24 ч после воздействия; б — через 72 ч после отмены этопозиды (24 + 72 ч). Масштаб: 100 мкм.

с контролем (рис. 4; белые клетки на поверхности ЭТ5 и ЭТ10).

Суммируя полученные данные, можно заключить, что цитостатические и цитотоксические эффекты этопозиды в недифференцированных ЭСК и ЭТ разных стадий дифференцировки являются дозозависимым и стадиейспецифическими. В недифференцированных ЭСК, поддерживаемых в монослойной культуре, эти эффекты были максимальными и необратимыми. В то же время наибольшие эффекты в ингибировании роста и дифференцировки были выявлены в ранних ЭТ1 и

они постепенно снижались по мере роста и дифференцировки ЭТ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Активно делящиеся клетки в ранних эмбрионах имеют высокую чувствительность к химическим и физическим повреждающим факторам. Степень повреждения эмбрионов при воздействии химических веществ зависит от многих факторов: степени токсичности веществ, дозы и времени воздействия, а также стадии развития и чувствительности разных эмбриональных клеток к этому веществу. При создании эффективных

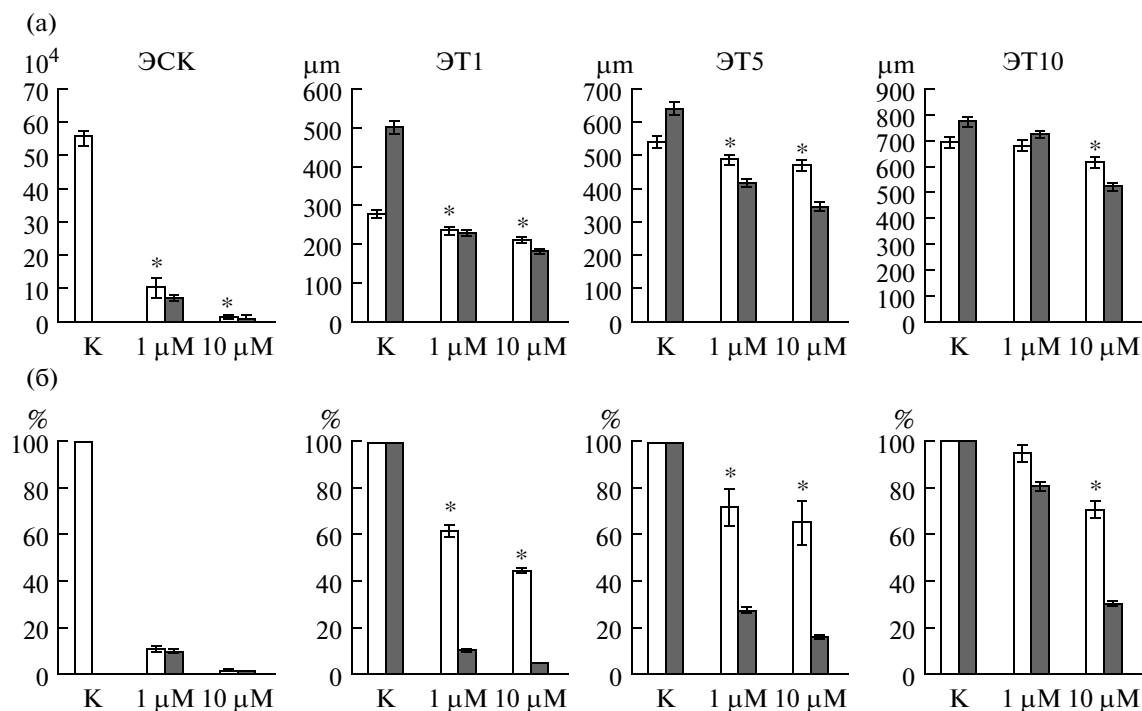


Рис. 2. Анализ роста ЭСК и ЭТ разных стадий развития после воздействия этопозид. Представлены данные по абсолютному числу ЭСК ($\times 10^4$) и диаметрам ЭТ, μm (а), а также изменению числа клеток и объемов ЭТ в процентах от соответствующих контрольных групп (б) через 24 ч после воздействия этопозид (светлый столбец) и через 72 ч после отмены этопозид (темный столбец). Обозначения: К — контроль; 1 и 10 μM — этопозид в соответствующих концентрациях; * — различия достоверны при $p < 0.001$. Различия достоверны при $p < 0.001$ для всех групп по сравнению с контрольной через 72 ч после отмены этопозид.

тест-систем на основе линий ЭСК животных и человека для изучения эмбриотоксичности химических веществ и новых лекарств необходимы исследования, направленные на сопоставление эмбриотоксических эффектов в *in vitro* клеточных моделях и ранних эмбрионах (Seiler et al., 2011).

Как было обнаружено ранее, цитотоксические эффекты в ЭСК и клетках внутренней клеточной массы бластоцисты были одинаковыми (Гордеева, 2012). Однако эффекты цитостатиков в тотальных бластоцистах и ЭСК различались, т.е. бластоцисты мыши с интактной 3D-структурой были более устойчивыми, чем ЭСК. Эти эксперименты показали, что оценка эмбриотоксичности на модели недифференцированных ЭСК недостаточна для точного прогноза токсичности в эмбрионах млекопитающих. В связи с этим в представленной работе мы провели сравнительное изучение повреждающих эффектов цитостатика этопозид в недифференцированных ЭСК и ЭТ разных стадий дифференцировки.

Цитостатические препараты, применяемые в клинической практике для лечения онкологических заболеваний, обладают высокой эмбриотоксичностью и тератогенностью. Этопозид, являющийся ингибитором топоизомеразы II, способен

ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз (Arriola et al., 1999). Он также обладает высокой эмбриотоксичностью и тератогенностью (Nagao et al., 1999; Palo et al., 2005; Monneypenny et al., 2006; Grandela et al., 2007; Nam et al., 2010; Bueno et al., 2011). На основании полученных нами данных можно заключить, что цитостатические и цитотоксические эффекты этопозид в недифференцированных ЭСК и ЭТ разных стадий дифференцировки являются дозозависимым и стадиейспецифическими. Максимальные повреждающие эффекты этопозид выявлены в недифференцированных ЭСК, тогда как его цитотоксичность снижалась в процессе дифференцировки ЭТ.

Различную токсичность этопозид в ЭСК и ЭТ разных стадий дифференцировки можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, в отличие от ЭСК ЭТ являются 3D объектами, а процессы диффузии и транспорта веществ из внешней среды в 2D и 3D клеточных моделях значительно различаются (Casciari et al., 1992; Van Winkle et al., 2012). Скорость диффузии и метаболизма веществ в ЭТ изменяется по мере их роста и дифференцировки, поэтому более крупные ЭТ5 и ЭТ10 были более устойчивыми к по-

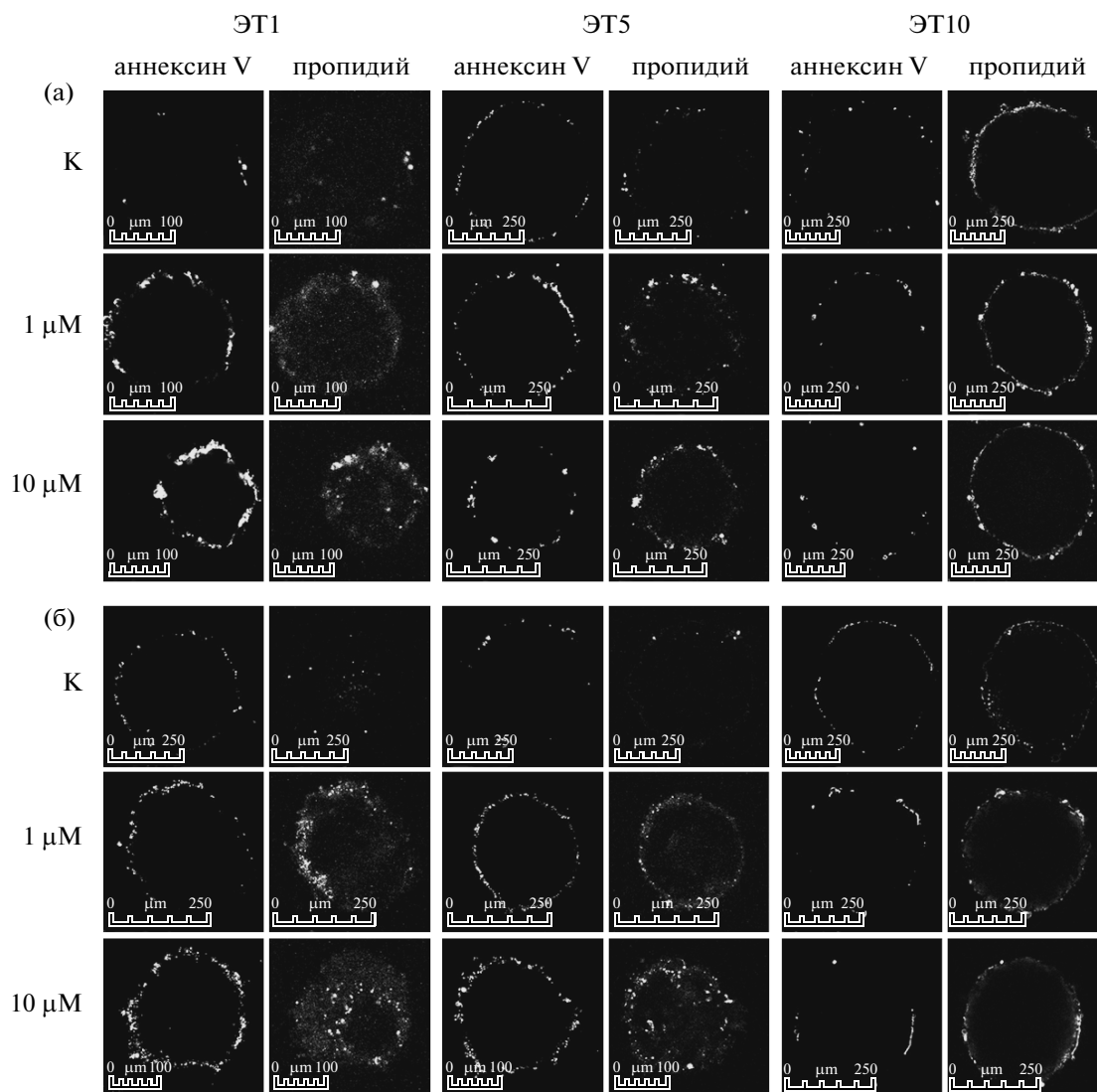


Рис. 3. Анализ клеточной гибели в ЭТ разных стадий развития после 24 ч воздействия этопозида (а) и через 72 ч после его отмены (б).

вреждающим эффектам этопозида, чем ранние ЭТ1. Клетки центральных слоев ЭТ выживали лучше и были способны к восстановлению роста и дифференцировки после отмены цитостатика. Различия в скорости диффузии биологически активных веществ в разных клеточных слоях ЭТ, вероятно, обуславливают и различную направленность и эффективность их дифференцировки в различные типы эмбриональных клеток (Bauwens et al., 2008; Messana et al., 2008; Mohr et al., 2010; Valamehr et al., 2008). Собственно трехмерность ЭТ, как и эмбрионов, обеспечивает концентрационный градиент веществ, который способствует продвижению развития и защите клеток от повреждающих факторов.

Во-вторых, в процессе дифференцировки ЭТ на поверхности сфероидов формировался и развивался слой внезародышевой энтодермы, которая является не только продуцентом сигнальных факторов, но и ограничивает поступление веществ из внешней среды, т.к. формирует плотные контакты между клетками (Гордеева и др., 2002). Поэтому наименьший повреждающий эффект этопозида был выявлен в ЭТ10 с развитой внезародышевой энтодермой. Эта внезародышевая структура гипертрофирована в ЭТ10 по сравнению с таковой в раннем эмбрионе, что в некоторой степени компенсирует отсутствие защитного слоя трофобласта в ЭТ.

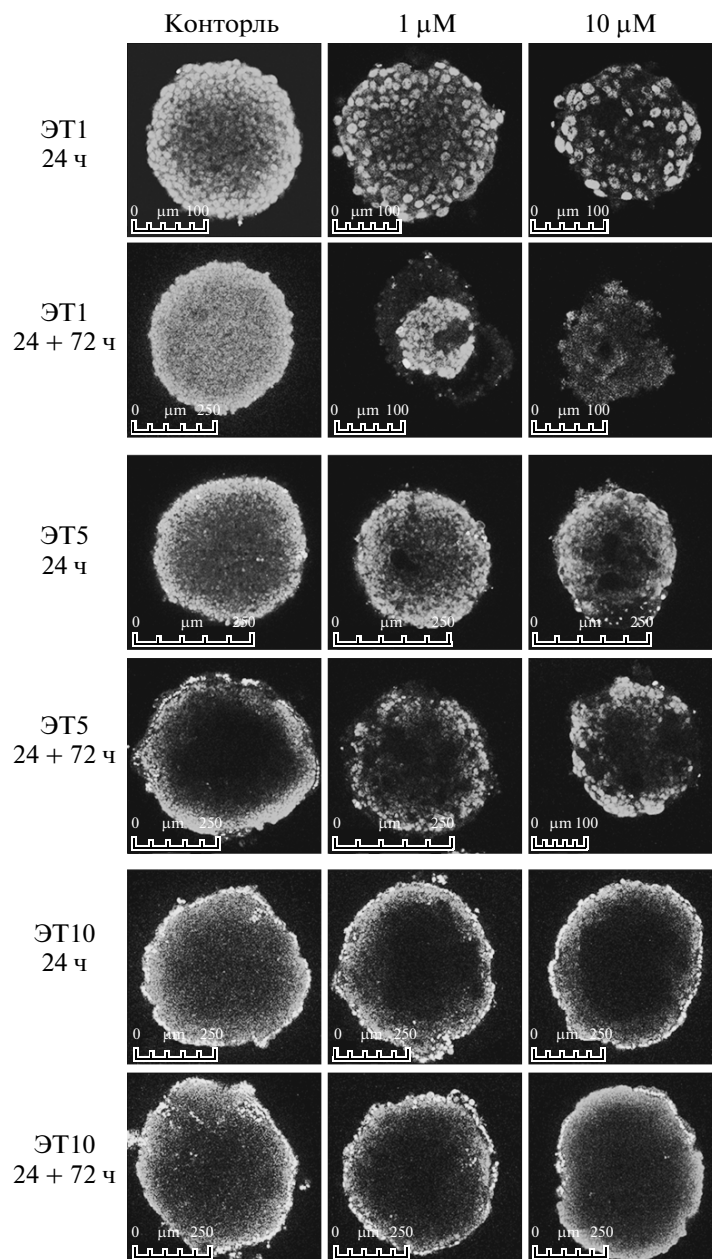


Рис. 4. Анализ дифференцировки ЭТ, подвергшихся воздействию этопозида. Экспрессия транскрипционных факторов Oct4 (серые клетки) и Gata4 (белые клетки на поверхности ЭТ5 и ЭТ10) в ЭТ разных стадий дифференцировки.

Таким образом, развитие гипертрофированного слоя внезародышевой энтодермы и увеличение клеточного объема ЭТ хотя и приводят к снижению диффузии, транспорта и метаболизма химических и биологически активных веществ, необходимых для роста и дифференцировки, но одновременно препятствуют действию повреждающих факторов. В этом контексте, ЭТ можно рассматривать как 3D клеточные структуры более близкие к структурам ранних эмбрионов, а соответственно как более адекватные *in vitro* модели для фармакологических и токсикологических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеева О.Ф., Мануилова Е.С., Гривенников И.А., и др. Характеристика плюрипотентной популяции на начальных стадиях дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в культуре // Доклады Академии наук. 2002. Т. 386. С. 555–558.
- Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Никонова Т.М. Регуляция *in vitro* и *in vivo* дифференцировки эмбриональных стволовых, эмбриональных герминативных и тератокарциномных клеток мыши факторами семейства TGFβ // Онтогенез. 2009. Т. 40. С. 403–418.

- Гордеева О.Ф. Антипролиферативные и цитотоксические эффекты различных типов цитостатиков на плюрипотентные стволовые клетки и клетки тератоканциномы мыши // Онтогенез. 2012. Т. 43. С. 268–277.
- Arriola E.L., Lopez A.R., Chresta C.M. Differential regulation of p21waf-1/cip-1 and Mdm2 by etoposide: etoposide inhibits the p53-Mdm2 autoregulatory feedback loop // *Oncogene*. 1999. V. 18. P. 1081–1091.
- Bauwens C.L., Peerani R., Niebruegge S. et al. Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories // *Stem Cells*. 2008. V. 26. P. 2300–2310.
- Bueno C., Montes R., Catalina P. et al. Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement // *Leukemia*. 2011. V. 25. P. 400–410.
- Casciari J.J., Sotirchos S.V., Sutherland R.M. Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH // *J. Cell. Physiol.* 1992. V. 151. P. 386–394.
- Ducibella T., Albertini D.F., Anderson E. et al. The preimplantation mammalian embryo: characterization of intercellular junctions and their appearance during development // *Dev. Biol.* 1975. V. 45. P. 231–250.
- Gardner R.L. Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1982. V. 68. P. 175–198.
- Grandela C., Pera M.F., Grimmond S.M. et al. p53 is required for etoposide-induced apoptosis of human embryonic stem cells // *Stem. Cell. Res.* 2007. V. 1. P. 116–128.
- Messana J.M., Hwang N.S., Coburn J. et al. Size of the embryoid body influences chondrogenesis of mouse embryonic stem cells // *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* 2008. V. 2. P. 499–506.
- Mohr J.C., Zhang J., Azarin S.M. et al. The microwell control of embryoid body size in order to regulate cardiac differentiation of human embryonic stem cells // *Biomaterials*. 2010. V. 31. P. 1885–1893.
- Moneyppenny C.G., Shao J., Song Y. et al. MLL rearrangements are induced by low doses of etoposide in human fetal hematopoietic stem cells // *Carcinogenesis*. 2006. V. 27. P. 874–881.
- Nagao T., Yoshimura S., Saito Y. et al. Developmental toxicity of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in rabbits after intravenous administration // *Teratog., Carcinog. Mutagen.* 1999. V. 19. P. 233–241.
- Nam C., Doi K., Nakayama H. Etoposide induces G2/M arrest and apoptosis in neural progenitor cells via DNA damage and an ATM/p53-related pathway // *Histol. Histopathol.* 2010. V. 25. P. 485–493.
- Palo A.K., Sahu P., Choudhury R.C. Etoposide-induced cytogenotoxicity in mouse spermatogonia and its potential transmission // *J. Appl. Toxicol.* 2005. V. 25. P. 94–100.
- Sachlos E., Auguste D.T. Embryoid body morphology influences diffusive transport of inductive biochemicals: a strategy for stem cell differentiation // *Biomaterials*. 2008. V. 29. P. 4471–4480.
- Seiler A.E.M., Spielmann H. The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro // *Nat. Protoc.* 2011. V. 6. P. 961–978.
- Valamehr B., Jonas S.J., Polleux J. et al. Hydrophobic surfaces for enhanced differentiation of embryonic stem cell-derived embryoid bodies // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. V. 105. P. 14459–14464.
- Van Winkle A.P., Gates I.D., Kallos M.S. Mass transfer limitations in embryoid bodies during human embryonic stem cell differentiation // *Cells Tissues Organs (Print)*. 2012. V. 196. P. 34–47.
- Yamada K.M., Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D // *Cell*. 2007. V. 130. P. 601–610.

Cytotoxic Effects of Etoposide at Different Stages of Differentiation of Embryoid Bodies Formed by Mouse Embryonic Stem Cells

O. F. Gordeeva

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Received July 7, 2013; in final form, July 10, 2013

Abstract—The initial stages of in vitro differentiation of embryonic stem cells are considered as unique three-dimensional models of early development of mammals for basic, pharmacological, and toxicological studies. It has been previously shown (Gordeeva, 2012) that the assessment of embryotoxicity in the model of undifferentiated embryonic stem cells can be insufficiently accurate in predicting toxic effects on mammalian embryos. In view of this, we performed a comparative study of the damaging effects of the cytostatic etoposide in undifferentiated embryonic stem cells and embryoid bodies of different stages of differentiation that have similar three-dimensional structures with early embryos. The analysis of growth, cell death, and dynamics of differentiation of embryonic stem cells and embryoid bodies exposed to etoposide showed that the cytostatic and cytotoxic effects of etoposide are stage-specific. The damaging effects of etoposide were maximum in the undifferentiated embryonic stem cells and decreased with growth and differentiation of embryoid bodies. We assume that the increase in the cell volume of embryoid bodies and the development of the hypertrophic we suggest that the increase of embryoid body volume and overgrowth of extraembryonic endoderm layer lead to a decrease in the diffusion, transport, and metabolism of chemical and bioactive substances and prevent the damaging effects.

Keywords: embryoid bodies, embryonic stem cells, etoposide, cytostatics, cytotoxicity, embryotoxicity, differentiation

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 576.311.348.2;57.017.642

РАННИЙ МОРФОГЕНЕЗ РЕСНИТЧАТЫХ КЛЕТОК В РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. А. И. Куртова, В. П. Черников, С. В. Савельев

Научно-исследовательский институт морфологии человека РАН

117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

E-mail: reptofly@gmail.com

Поступила в редакцию 21.03.13 г.

Окончательный вариант получен 13.06.13 г.

В эпителии ротовой полости эмбрионов и плодов человека, начиная с 7-й недели внутриутробного развития, обнаружены реснитчатые клетки. На ранних сроках пренатального развития (до 13-й недели) клетки с ресничками покрывают большую часть дорсальной поверхности языка и мягкого неба, а после 17-й недели развития обнаружены только рядом с протоками желез в желобоватых и листовидных сосочках языка. Ультраструктура аксонемы ресничек соответствует строению подвижных ресничек и представлена девятью микротрубочками-дублетами, которые окружают центральную пару микротрубочек-синглетов. В ходе иммуногистохимического исследования на 10–12-й неделе развития выявлены нервные окончания, ассоциированные с реснитчатыми клетками. До 14-й недели развития цитоплазма реснитчатых клеток иммунопозитивна к NSE. Пространственное распределение реснитчатых клеток в эпителии языка до 13-й недели развития не связано морфогенезом вкусовых сосочков, а их роль в ротовой полости человека в течение первого триместра беременности остается неясной и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: реснитчатые клетки, ротовая полость, плоды человека, иммуногистохимия.

DOI: 10.7868/S0475145013060062

ВВЕДЕНИЕ

Реснички — специализированные органеллы клеток, представляющие собой выросты цитоплазмы, основу которых составляет каркас из микротрубочек, называемый аксонемой. У млекопитающих существует две разновидности строения аксонемы: девять микротрубочек-дублетов окружают центральную пару микротрубочек-синглетов (9 + 2), или центральная пара микротрубочек отсутствует (9 + 0) (Satir, Christensen, 2007). Реснички со строением 9 + 2, называемые вторичными ресничками, обладают подвижностью, а их количество в эпителиальной клетке может достигать нескольких сотен. Строение аксонемы типа 9 + 0 встречается в одиночно расположенных ресничках, называемых первичными ресничками. Чаще всего они представляют собой неподвижные специализированные сенсорные структуры, встречающиеся в клетках сетчатки глаза, почечных канальцев, эпифиза, щитовидной железы (Moller, 1974; Martin et al., 1988; Satir, Christensen, 2007; Louvi, Grove, 2011). Подвижные вторичные реснички характерны для клеток респираторного эпителия, эпителия фаллопиевых труб, эпендимомцитов желудочков головного мозга млекопитающих, где они участвуют в перемещении слизи

или жидкости (Satir, Christensen, 2007). Несмотря на то, что реснитчатый эпителий не характерен для ротовой полости позвоночных, реснитчатые клетки с вторичными ресничками присутствуют на вершинах сосочков языка настоящих лягушек (род *Rana*), где они образуют кольцо вокруг вкусовых дисков, участвуя в распределении секрета желез языка (Düring, Anders, 1976). Подобные клетки также были обнаружены на языке птиц подкласса *Paleognathae* — эму (Crole, Soley 2010) и нанду (Santos et al., 2011), и в криптах желобоватых сосочков языка некоторых млекопитающих — крысы (Toyoshima, Shimamura, 1979) и коалы (Kobayashi, 2003). У взрослого человека найдены единичные клетки с подвижными ресничками в стенках крипт желобоватых сосочков, расположенные между выходом протоков желез Эбнера и вкусовыми луковичками (Mattern et al., 1970). Реснитчатые клетки в эпителии слизистой оболочки языка исследованных животных и человека рассматривают как вспомогательный аппарат периферического отдела вкусового анализатора, служащий для увлажнения и очищения вкусовых клеток (Mattern et al., 1970). Данных о наличии реснитчатых клеток в стенке ротовой полости в течение внутриутробного развития позвоночных

Материал, использованный в работе

Гестационный возраст (недели)	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Количество образцов	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2

животных, практически нет. Единичные реснитчатые клетки были обнаружены в эпителии вкусовых сосочков у плодов человека на 14–15-й неделях (Witt, Reutter, 1997), но подробно эти клетки в онтогенезе человека не описаны. Поэтому целью нашего исследования было описать время появления, пространственное распределение и ультраструктуру апикальной поверхности реснитчатых клеток ротовой полости в пренатальном онтогенезе человека, а также сравнить полученные данные с динамикой развития вкусовых луковиц и сосочков языка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на аутопсийном материале плодов человека на разных стадиях внутриутробного развития (таблица) из коллекции лаборатории развития нервной системы НИИ МЧ РАМН. Материал был фиксирован в 4% растворе параформальдегида. Определение гестационного возраста осуществлялось по медицинским документам, копчико-теменному размеру, массе тела, rostrocaudальной длине и описательным признакам в соответствии с принятыми методиками (Пэттен, 1979; Савельев, 2002; Hadlock et al., 1992; Doublet et al., 1997).

На ранних стадиях развития (до 13-й недели) для исследования брали материал головы целиком, на более поздних стадиях выделяли ротовую полость вместе с небными и челюстными костями. При необходимости материал помещали в декальцинирующую смесь на основе азотной кислоты. Материал заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 10 мкм. Для изучения гистологической структуры и пространственного распределения клеток эпителия кассированные серии срезов были окрашены по методике Маллори. Для визуализации нервных окончаний срезы были исследованы иммуногистохимически с антителами к нейрон-специфическому β_3 -тубулину (neuron specific beta III tubulin antibody, rabbit polyclonal, Abcam, США) и нейрон-специфической енолазе (anti-NSE antibody, mouse monoclonal E27, Cell Marque, США). При иммуногистохимической обработке использовали набор UltraVision LP Detection System HRP Polymer (LabVision, Великобритания). В ходе иммуногистохимического исследования депарафинированные, гидратированные срезы обрабатывали 3% раствором H_2O_2 в течение 20 мин для блокировки эндогенной пероксидазы. Затем для демаскирования антигенов

проводили высокотемпературную обработку срезов в 0.01M цитратном буфере (pH 6.0) в течение 5 мин. Для блокировки неспецифического связывания срезы обрабатывались реактивом UltraVBlock из использованного набора в течение 5 минут. Срезы инкубировали с первыми антителами во влажной камере при температуре 37°C в течение 1 часа. В дальнейшем использовали реактивы из набора, согласно спецификации фирмы. Негативным контролем служили реакции с заменой первых антител 0.01M раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) pH 7.3–7.5.

Идентификация и подсчет клеток с ресничками проводились на препаратах, окрашенных по Маллори, под световым микроскопом с использованием иммерсионных объективов с увеличением в 100 раз и окуляров с увеличением в 10 раз. Так как нашей задачей было сравнить относительное количество реснитчатых клеток на разных гестационных сроках, для подсчета выбиралось по 40 случайных полей зрения с эпителием неба и дорсальной поверхности языка для каждого плода. Результаты подсчета представлены средним значением количества реснитчатых клеток, приходящихся на 10 клеток поверхностного слоя эпителия для каждой недели развития.

Для уточнения ультраструктуры апикальной поверхности реснитчатых клеток, эпителий дорсальной поверхности языка плода в возрасте 11–12 недель был исследован в трансмиссионном электронном микроскопе. Материал, фиксированный в 4% растворе параформальдегида, обрабатывали 1% раствором OsO_4 и уранилацетата, обезжизивали в ряду этанола и заливали в смесь эпона с аралдитом. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме 8800 Ultratome III (LKB, Sweeden), дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Libra120 (Carl Zeiss, Germany).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Реснитчатые клетки в эпителии слизистой оболочки ротовой полости обнаружены у всех исследованных эмбрионов и плодов, начиная с 7-й недели развития. На этом сроке они имеют цилиндрическую форму и расположены в поверхностном слое эпителия задней половины крыши первичной ротовой полости (рис. 1a). Плотность расположения реснитчатых клеток увеличивается в каудальном направлении и достигает максимального значения (2–3 реснитчатых клетки на 10 клеток

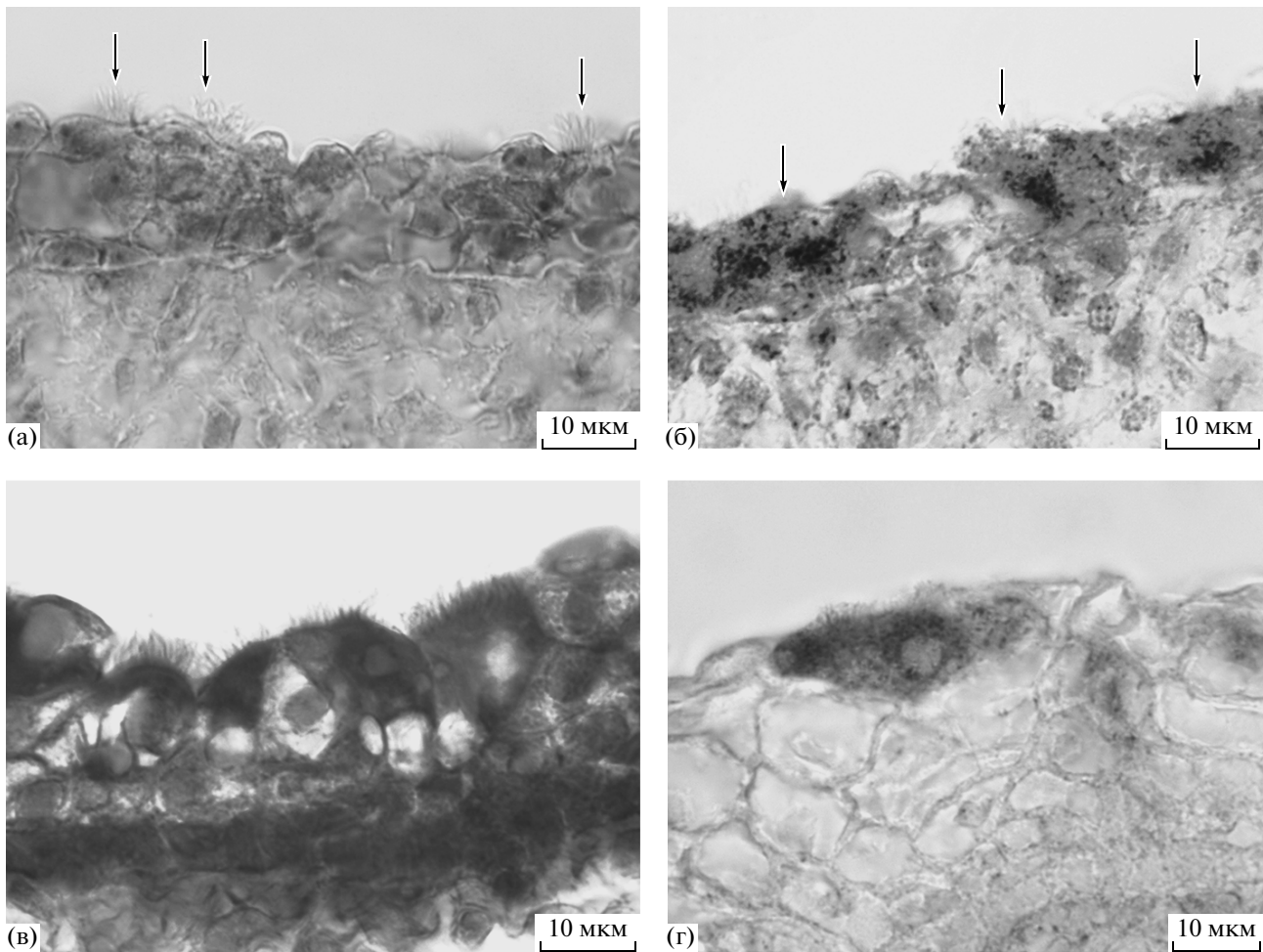


Рис. 1. Реснитчатые клетки в эпителии крыши первичной ротовой полости на 7-й неделе пренатального развития (отмечены стрелками) (а, б) и в эпителии языка на 10-й неделе развития (в, г): а, в — окраска по Маллори; б, г — реакция с антителами к NSE.

поверхностного слоя эпителия) в задней части свода первичной ротовой полости. Нервных окончаний, подходящих к реснитчатым клеткам, выявлено не было, но наблюдалась иммунопозитивная реакция к NSE в цитоплазме реснитчатых клеток (рис. 1б). В эпителии языка эмбрионов данного возраста реснитчатые клетки не обнаружены. Нервных окончаний в эпителии языка нет, за исключением тех, что подходят к появляющимся на этой стадии вкусовым примордиям, представленных группами удлинённых клеток базального слоя эпителия.

На 8-й неделе пренатального развития реснитчатые клетки присутствуют в эпителии задней части свода первичной ротовой полости (в среднем 2–3 реснитчатых клетки на 10 клеток поверхностного слоя эпителия); также единичные клетки обнаружены на вентральной стороне небных отростков, внутренней поверхности щёк и дорсальной поверхности задней трети языка. На 9-й неделе редкие единичные реснитчатые клетки встреча-

ются в эпителии языка и задней части неба, образовавшегося при срастании небных отростков. Тела реснитчатых клеток сохраняют иммунореактивность к NSE, хотя в клетках, расположенных на языке, реакция выражена слабее. Нервных волокон, ассоциированных с реснитчатыми клетками, выявлено не было.

На 10–11-й неделе количество реснитчатых клеток в эпителии задней части неба и внутренней поверхности щёк остается прежним, а в поверхностном слое эпителия языка резко возрастает (в среднем по 3–4 клетки на 10 клеток поверхностного слоя эпителия). Пространственное распределение реснитчатых клеток в эпителии дорсальной поверхности языка представлялось случайным, и не было связано с появляющимися на этой стадии вкусовыми сосочками; реснитчатые клетки были обнаружены как на поверхности сосочков, так и в углублениях между ними. На медиальной части языка реснитчатые клетки могут образовывать группы по 2–3 клетки, но чаще

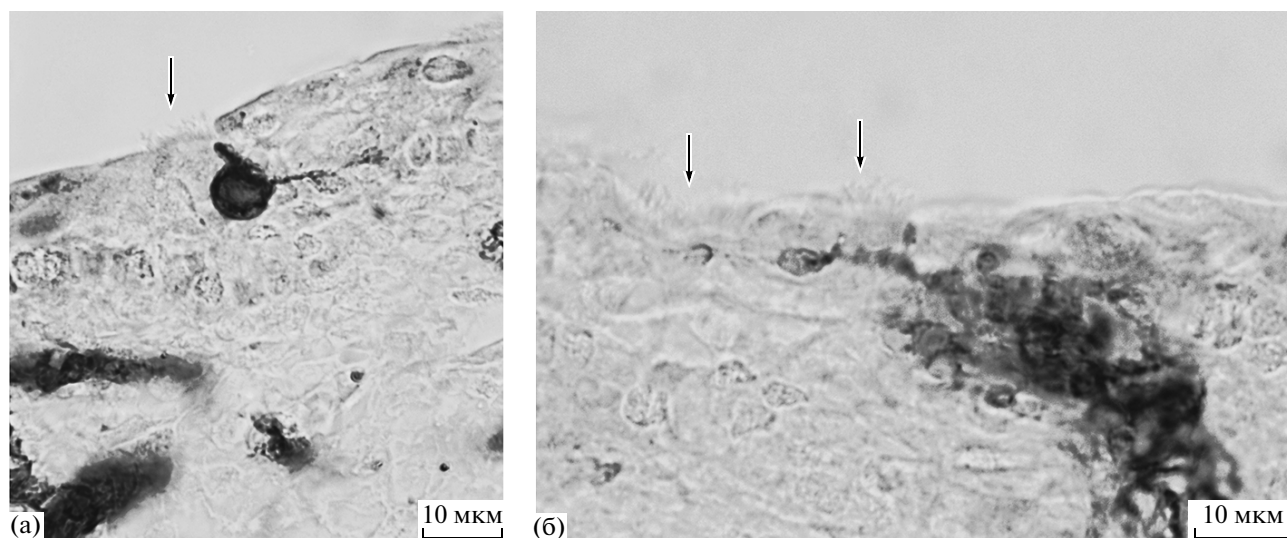


Рис. 2. Нервные окончания, иннервирующие реснитчатые клетки языка на 11-й неделе пренатального развития, реакция с антителами к нейрон-специфическому β_3 -тубулину (реснитчатые клетки отмечены стрелками): а — вздутие нервного окончания рядом с реснитчатой клеткой; б — перигеммальное нервное окончание вкусовой луковицы, иннервирующее несколько реснитчатых клеток.

встречаются одиночные клетки. На латеральных частях дорсальной поверхности они расположены большими группами, образуя реснитчатые поля (рис. 1в). Несколько крупных клеток с ресничками расположены у основания языка, где эпителий языка переходит в эпителий дна ротовой полости. На гистологических препаратах, окрашенных по Маллори, реснитчатые клетки часто отличаются по окраске от окружающего их эпителия, причем их цитоплазма может быть как базофильной, так и ацидофильной. Цитоплазма реснитчатых клеток на данной стадии сохраняет иммунореактивность к NSE (рис. 1г). К некоторым реснитчатым клеткам подходят ответвления внутриэпителиальных нервов, образующие рядом с ними вздутия (рис. 2а). Иногда одиночные реснитчатые клетки расположены рядом с вкусовыми луковицами, и в таком случае они иннервируются нервными окончаниями из перигеммального сплетения вкусовой луковицы (рис. 2б).

При исследовании эпителия языка плода в возрасте 11–12 недель с помощью ТЭМ, было показано, что в поверхностном слое эпителия присутствуют клетки с ресничками (рис. 3). Они имеют вытянутую цилиндрическую форму, а апикальная поверхность варьирует от плоской до булабовидной. В ротовую полость направлены многочисленные реснички, покрывающие всю площадь апикальной поверхности клетки (рис. 3а). Аксонема ресничек состоит из 9 периферических дублетов микротрубочек и двух центральных микротрубочек-синглетов. Базальные тельца ресничек образованы 9 периферическими триплетами микротрубочек. Диаметр ресничек составляет 0.3 мкм. От апикальной поверхности этих клеток

отходят длинные тонкие микровилли, диаметром 0.08–0.1 мкм, которые располагаются между ресничками (рис. 3б). Под базальными тельцами ресничек расположены многочисленные митохондрии.

К 12-й неделе развития число реснитчатых клеток в задней части неба резко сокращается (в среднем 1 реснитчатая клетка на 10 клеток поверхностного слоя эпителия), а к 14-й неделе остаются только единичные клетки, ассоциированные с протоками небных желез. В эпителии передней части языка, начиная с 13-й недели развития, количество реснитчатых клеток уменьшается. На этой стадии они реже располагаются на вершинах сосочков, и чаще занимают углубления между ними. К 14–15-й неделе количество реснитчатых клеток начинает сокращаться и в задней части языка. На данной стадии развития появляется выраженный желоб вокруг желобоватых сосочков и открываются крипты листовидных сосочков. В эпителии образованных крипт желобоватых и листовидных сосочков обнаружены единичные реснитчатые клетки. Вместе с уменьшением количества реснитчатых клеток слабеет позитивная реакция к NSE в их цитоплазме, иммунореактивность пропадает к 14-й неделе пренатального развития. К 17-й неделе развития реснитчатые клетки остаются только рядом с протоками желез в желобоватых и листовидных сосочках.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что реснитчатые клетки в эпителии ро-

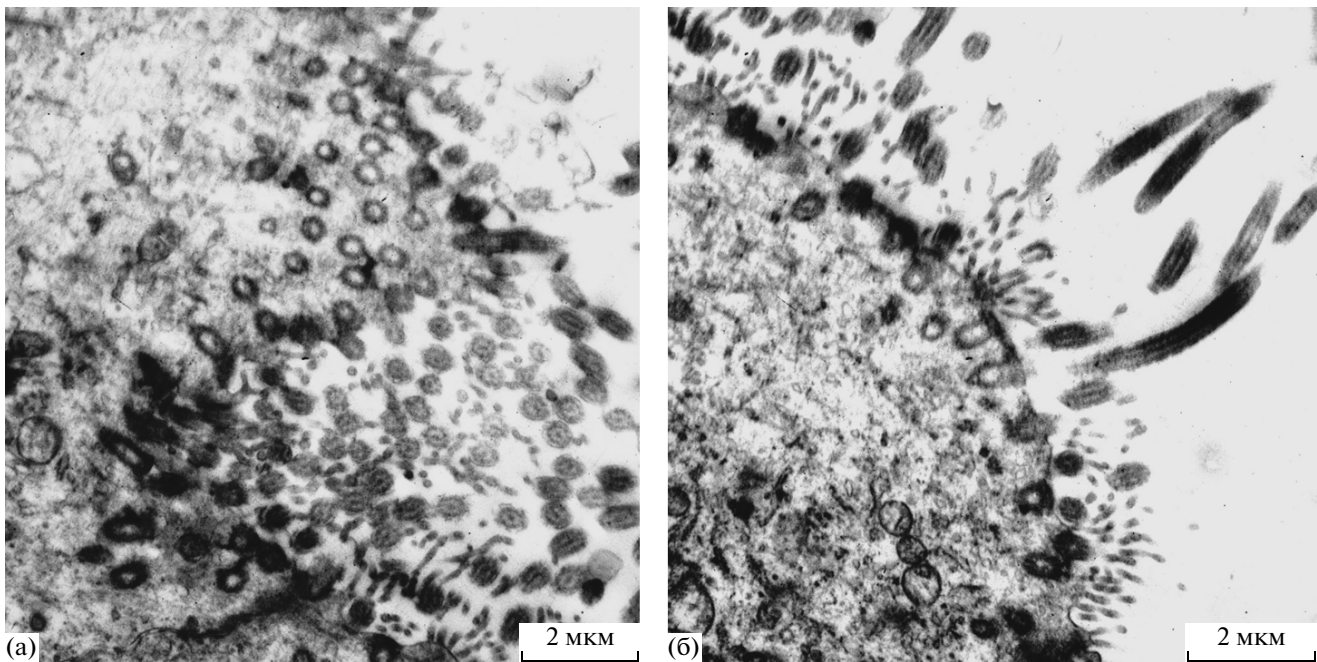


Рис. 3. Электронные микрофотографии апикальной поверхности реснитчатых клеток эпителия языка на 11–12-й неделе пренатального развития: а — многочисленные реснички, направленные в ротовую полость; б — пучки тонких микровиллей, отходящие от поверхности клетки.

товой полости человека появляются на 7-й неделе внутриутробного развития и достигают своего максимального количества в период с 10-й по 12-ю неделю развития. Их ультраструктура соответствует строению клеток с вторичными ресничками, описанными на сосочках языка исследованных позвоночных и человека (Mattern et al., 1970; Toyoshima et al., 1979; Iwasaki, Wanichanon, 1993). У исследованных взрослых животных реснитчатые клетки на языке редки и ассоциированы с железистыми клетками или крупными железами (Mattern et al., 1970; Toyoshima et al., 1979; Iwasaki, Wanichanon, 1993). На основании такого расположения этих клеток в эпителии языка, исследователи выделяют три основных функции реснитчатых клеток: очищение вкусовых органов, поддержание циркуляции вкусовых стимулов и увлажнение вкусовой поры (Toyoshima et al., 1979). В результате нашего исследования было установлено, что в эпителии ротовой полости плодов человека реснитчатые клетки имеют более широкую зону распространения и к 10–11-й неделе внутриутробного развития они покрывают дорсальную поверхность языка и заднюю часть неба. Также морфогенез вкусовых сосочков на ранних этапах пренатального онтогенеза человека (с 9-й по 12-ю неделю) не отражается на локализации реснитчатых клеток, которые на данных сроках равномерно распределены в эпителии языка и мягкого неба. Начиная с 13-й недели развития, количество реснитчатых клеток в ротовой полости человека на-

чинает сокращаться, а к 17-й неделе они остаются только рядом с протоками желез в желобоватых и листовидных сосочках. Вкусовые луковицы у человека готовы к функционированию к 15-й неделе внутриутробного развития, когда появляется слюзь во вкусовой ямке, без которой невозможна рецепция, несмотря на развитые микровилли вкусовых клеток (Witt, Reutter, 1996). Исходя из этого, реснитчатые клетки в эпителии языка плодов человека могут участвовать в очищении вкусовой поры только после 15-й недели внутриутробного развития. Роль реснитчатых клеток в ротовой полости человека до 15-й недели развития остается неясной.

При иммуногистохимическом исследовании наблюдалась позитивная реакция с антителами к NSE в телах реснитчатых клеток, особенно интенсивная с 8-й по 12-ю неделю развития. Нейрон-специфическая енолаза, NSE, — это изоформа фермента гликолиза енолазы, которая обеспечивает высокую скорость гликолиза. Эта изоформа характерна для нейронов, но также встречается в других клетках, когда при возрастании функциональной нагрузки необходимо ускорить метаболизм клетки. Например, повышение синтеза NSE часто наблюдается при мелкоклеточном раке легкого и является диагностическим признаком (Bonner et al., 2000). Реакция на NSE в телах реснитчатых клеток ротовой полости плодов человека с 8-й по 13-ю неделю развития мо-

жет свидетельствовать о повышении их функциональной активности на данном сроке.

Согласно данным литературы, реснитчатые клетки обнаружены также в других дериватах первичной ротовой полости — аденогипофизе и щитовидной железе. Так, клетки с подвижными вторичными ресничками встречаются у крысы и человека в промежуточной доле аденогипофиза (Rasmussen, 1929; Kurosumi et al., 1961). В эпителии фолликулов щитовидной железы человека обнаружены клетки с одиночными первичными ресничками, среди которых попадают вторичные реснички, находящиеся на разных стадиях деградации (Martin, 1988). Вторичные реснички находили в течение короткого периода в процессе внутриутробного развития щитовидной железы собаки (Nunez, Gershon 1976). Учитывая вышесказанное, можно предположить, что клетки с подвижными ресничками — это необходимая стадия дифференцировки эпителия первичной ротовой полости.

В последнее время интерес к роли реснитчатых структур в эмбриональном развитии позвоночных усилился, что обусловлено открытием участия клеток с первичными ресничками в формировании закладок билатерально асимметричных органов (Tanaka et al., 2005; Hirokawa et al., 2006). Также есть мнение, что первичные реснички могут быть антеннами для многих сигнальных путей, определяющих миграцию и дифференцировку клеток (Huangfu, Anderson, 2005; D'Angelo, Franco, 2009; Satir et al., 2010). Таким образом, наличие большого количества клеток с подвижными ресничками в эпителии слизистой оболочки ротовой полости плодов человека в течение первого триместра беременности представляет интерес для дальнейшего изучения их роли в процессах детерминации и дифференцировки клеток эпителия первичной ротовой полости и ее производных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пэттен Б.М. Эмбриология человека: пер. с англ. М.: Медгиз, 1959. 768 с.
- Савельев С.В. Стадии эмбрионального развития мозга человека. М.: ВЕДИ, 2002. 112 с.
- Bonner J., Sloan J., Rowland K. et al. Significance of neuron-specific enolase levels before and during therapy for small cell lung cancer // Clin. Cancer Res. 2000. № 6. P. 597–601.
- Crole M.R., Soley J.T. Surface morphology of the emu (*Dromaius novaehollandiae*) tongue // Anat. Histol. Embryol. 2010. V. 39. № 4. P. 355–365.
- D'Angelo A., Franco B. The dynamic cilium in human diseases // Pathogenetics. 2009. V. 2. P. 1–15.
- Doublet P.M., Benson C.B., Nadel A.S. Improved birth weight table for neonates developed from gestations dated by early ultrasonography // Journal of Ultrasound Medicine. 1997. V. 16. № 4. P. 241–249.
- Düring M., Anders K.H. The ultrastructure of taste and touch receptors of the frog's taste organ // Cell Tiss. Res. 1976. V. 165. № 2. P. 185–198.
- Hadlock F.P., Shan Y.P., Kanon D.J. et al. Fetal crown rump length: Reevaluation of relation to menstrual age with high resolution real-time // US Radiology. 1992. V. 182. P. 501–505.
- Hirokawa N., Tanaka Y., Okada Y. et al. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry // Cell. 2006. V. 125. № 7. P. 33–45.
- Huangfu D., Anderson K.V. 2005. Cilia and hedgehog responsiveness in the mouse // PNAS. 2005. V. 102. № 32. P. 11325–11330.
- Iwasaki S., Wanichanon C. An ultrastructural study of the dorsal lingual epithelium of the crab-eating frog, *Rana cancrivora* // Journal of Morphology. 1993. V. 215. № 1. P. 89–100.
- Kobayashi K., Kumakura M., Yoshimura K. et al. Comparative morphological study of the lingual papillae and their connective tissue cores of the koala // Anat. Embryol. 2003. V. 206. P. 247–254.
- Kurosumi K., Matsuzawa T., Shibasaki S. Electron microscope studies on the fine structures of the pars nervosa and pars intermedia, and their morphological interrelation in the normal rat hypophysis // General and comparative endocrinology. 1961. № 1. P. 433–452.
- Louvi A., Grove E. Cilia in the CNS: the quiet organelle claims center stage // Neuron. 2011. V. 69. № 24. P. 1046–1060.
- Martin A., Hedinger C., Haberland-Jakob M. et al. Structure and motility of primary cilia in the follicular epithelium of the human thyroid // Virchows Archiv B Cell Pathol. 1988. V. 55. № 1. P. 159–166.
- Mattern C., Daniel W., Henkin R. The ultrastructure of the human circumvallate papilla I. Cilia of the papillary crypt // Anat. Rec. 1970. V. 167. № 2. P. 175–182.
- Moller M. The ultrastructure of the human fetal pineal gland // Cell Tiss. Res. 1974. V. 152. № 1. P. 13–30.
- Nunez E.A., Gershon M.D. Appearance and disappearance of multiply ciliated follicular cells during development of the dog's thyroid gland // Anat. Rec. 1976. V. 184. № 2. P. 133–146.
- Rasmussen A.T. Ciliated epithelium and mucous-secreting cells in the human hypophysis // Anat. Rec. 1929. V. 41. № 3. P. 273–283.
- Santos T., Fukuda K., Guimaraes J. et al. Light and scanning electron microscopy study of the tongue in *Rhea americana* // Zoological Science. 2011. V. 28. № 1. P. 41–46.
- Satir P., Christensen S. Overview of structure and function of mammalian cilia // Annu. Rev. Physiol. 2007. V. 69. P. 377–400.
- Satir P., Pedersen L.B., Christensen S.T. The primary cilium at a glance // J. Cell Sci. 2010. V. 123. № 4. P. 499–503.
- Tanaka Y., Okada Y., Hirokawa N. FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left–right determination // Nature. 2005. V. 435. № 12. P. 172–177.

Toyoshima K., Shimamura A. The occurrence of ciliated and mucous cells in the peripapillary trench of the rat tongue // *Anat. Rec.* 1979. V. 195. № 2. P. 301–310.

Witt M., Reutter K. Embryonic and early fetal development of human taste buds: a transmission electron micro-

scopical study // *Anat. Rec.* 1996. V. 246. № 4. P. 507–523.

Witt M., Reutter K. Scanning electron microscopical studies of developing gustatory papillae in humans // *Chem. Senses.* 1997. V. 22. № 6. P. 601–612.

Early Morphogenesis of Ciliated Cells in Human Oral Cavity

A. I. Kurtova, V. P. Chernikov, and S. V. Saveliev

*Federal State Budgetary Institution “Scientific Research Institute of Human Morphology”
under the Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Tsyurupy 3, Moscow, 117418 Russia*

e-mail: reptofly@gmail.com

Received March 21, 2013; in final form, June 13, 2013

Abstract—Ciliated cells were found in the epithelium of the oral cavity of human embryos and fetuses starting from the seventh week of prenatal development. At the early stages of prenatal development (until the 13th week), cells with cilia cover most of the dorsal surface of the tongue and the soft palate, whereas they are found only near the gland ducts in the circumvallate and foliate lingual papillae after 17 weeks of development. The ultrastructure of the axoneme of cilia corresponds to the structure of motile cilia and is represented by nine microtubule doublets that surround the central pair of microtubule singlets. An immunohistochemical study performed on weeks 10–12 of development identified nerve endings associated with the ciliated cells. Until the 14th week of development, the cytoplasm of ciliated cells is immunopositive for NSE. The spatial distribution of ciliated cells in the tongue epithelium until the 13th week of development is not related to the morphogenesis of lingual papillae, and their role in the human oral cavity during the first trimester of pregnancy is unclear and requires further study.

Keywords: ciliated cells, oral cavity, human fetuses, immunohistochemistry

УДК 612.17

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АДРЕНО- И ПУРИНОРЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИМОСТИ МИОКАРДА КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2013 г. Т. А. Аникина, А. А. Зверев, Ф. Г. Ситдилов, И. Н. Анисимова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18

E-mail: Aleksei5@rambler.ru

Поступила в редакцию 26.04.12 г.

Окончательный вариант получен 28.12.12 г.

Агонист бета адренорецепторов изопротеренол и агонист пуринорецепторов 2-метилтио-АТФ оказывают положительное влияние на силу сокращения миокарда и проявляют разную эффективность в зависимости от возраста животных. Максимальный инотропный эффект агонистов на сократимость миокарда желудочков наблюдается у 21-суточных крысят. При изучении совместного влияния изопротеренола и 2-метилтио-АТФ выявлено, что у животных 21-суточного возраста при повышении симпатических регуляторных влияний на сердце, на фоне высокой функциональной активности β -адренорецепторов и P2X-рецепторов сердца совместное влияние агонистов приводит к развитию дополняющего друг друга эффекта в увеличении сократимости миокарда.

Ключевые слова: P2-пуринорецепторы, адренорецепторы, миокард, сократимость, онтогенез, АТФ.

DOI: 10.7868/S0475145013060025

Недавно установленные функции внеклеточной АТФ как трансмиттера и котрансмиттера, регулирующего разнообразные функции организма, в настоящее время находят все новые подтверждения и общее признание. Сегодня трудно найти клетку, в которой нет рецепторов для внеклеточной АТФ. В начале 70-х годов было установлено, что АТФ выделяется из нервных окончаний и взаимодействуют с пуриновыми рецепторами, обнаруженными во многих органах и тканях, в том числе сердечной мышце. Свое влияние АТФ реализуют через инотропные P2X и метаботропные P2Y-рецепторы. Разнообразие пуринорецепторов так велико, что оно превышает все подтипы рецепторов для классических гормонов и нейромедиаторов. Влияние АТФ может быть реализовано как ее прямым влиянием на кардиомиоциты, так и изменением активности регуляторных каналов сердца. Известно, что АТФ находится в везикулах вместе с классическими медиаторами: ацетилхолином или норадреналином и участвует в передаче нервных импульсов, выполняя функции контрансмиттера (Ralevik, Burnstock, 1991; A. Pelleg et al., 1997; G. Burnstock et al., 2006, 2009).

В сердечно-сосудистой системе P2-пуринорецепторы присутствуют на поверхности кардиомиоцитов предсердий, желудочков, проводящей

системы сердца, в эндотелии и гладкомышечных клетках стенок сосудов. Методами иммуногистохимии и полимеразно-цепной реакции с обратной транскрипцией показано присутствие P2X₂, P2X₅ подтипов инотропных P2-рецепторов на сарколемме кардиомиоцитов, P2X₁ и P2X₃ подтипов вблизи синаптических контактов нейронов с кардиомиоцитами (M. Hansen et al., 1999), P2X₁, P2X₂, P2X₄ — пуринорецепторов в предсердиях и желудочках (G. Vassort, 2001). А также P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 13, 14} подтипов рецепторов в целом сердце, на кардиомиоцитах (Webb et al., 1996; G. Vassort, 2001; Burnstock, 2009), сердечных миофибробластах (G. Vassort, 2001; Burnstock, 2009; Talasila et al., 2009); эндотелии и гладкомышечных стенках сосудов (Wang et al., 2002). Экспрессия P2Y-рецепторов в миокарде меняется в онтогенезе и усиливается для P2Y_{1, 2, 6}-подтипа рецепторов (Webb et al., 1996).

Положительные хронотропные и инотропные влияния экзогенной АТФ реализуются при участии P2X-рецепторов через кальций-зависимый механизм. Возбуждение P2X-рецепторов приводит к активации неселективных катионных каналов с преобладанием проницаемости для ионов кальция. Вызванная деполяризация клеточной мембраны приводит к дополнительному току Ca²⁺ внутрь клетки через потенциал-зависимые

кальциевые каналы L-типа и дополнительному поступлению кальция из саркоплазматического ретикулула. Свободный кальций саркоплазмы соединяется с регуляторным белком тропонином, увеличивая образование актомиозиновых комплексов, запуская сократительный ответ. В ряде работ показана значительная роль внеклеточной АТФ в появлении кальциевых токов и развитии потенциала действия в клетках синусно-предсердного узла (F. Scamps, G. Vassort, 1990; A. Christie, 1992; Y. Qi and Y. Kwan, 1996). Большая часть P2Y-рецепторов (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11}) связаны с Gq₁₁-белком, который активизирует фосфолипазу C с образованием инозитолфосфата, увеличением Ca²⁺ в клетке и последующим увеличением силы сокращения миокарда (Abbracchio et al., 2006; Talasila et al., 2009).

Исследования подтверждают наличие совместной секреции норадреналина, ацетилхолина и АТФ из симпатических и парасимпатических нервов и способность АТФ модулировать нервную передачу в сердце, увеличивая или ослабляя эффекты, производимые классическими медиаторами (S. Ennion 2000; C. Sesti et al., 2002; S. Boehm et al., 2002; Burnstock, 2006). Онтогенетический аспект пуринергической регуляции сердца практически не изучен и рассматривался только на взрослых организмах и в период их неонатального развития (Webb et al., 1996; Bogdanov et al., 1998; Hansen et al., 1999; Cheung et al., 2003). Можно предположить, что на ранних этапах постнатального онтогенеза, в условиях незрелости симпатических и парасимпатических регуляторных влияний на сердце, его рецепторного аппарата, возможны разные механизмы влияния АТФ на эффекты основных медиаторов.

Становление парасимпатических и симпатических влияний на сердце в постнатальном онтогенезе происходит постепенно: раньше обнаруживаются холинергические и позже, например, к концу 3-й недели у крыс, адренергические регуляторные влияния (Ф.Г. Ситдилов, Т.Л. Зефирова, 2006). По другим данным становление симпатической регуляции сердца у крыс продолжается с 3 по 6 неделю (S. Rockson et al., 1981; R. Xiao et al., 1995). Однако сердце имеет возможность адекватного реагирования и при незрелости этих механизмов регуляции. В связи с этим необходимы механизмы, которые могли бы компенсировать недостаточность симпатической регуляции сердца.

В жизненном цикле крыс от рождения до 100-суточного возраста осуществляются значительные структурно-функциональные и регуляторные изменения сердечно-сосудистой системы, происходит созревание рецепторного аппарата сердца, перестраиваются симпатико-адреналовая и эндокринная системы. В своих экспериментах мы придерживались общепринятой в настоящее время классификации постнатального развития бе-

лых лабораторных крыс (И.П. Западнюк и др., 1983). Крысы в возрасте 14-, 21-, 100-суток соответствуют среднему, молочному и половозрелому периодам развития и имеют разную степень зрелости и активности регуляторных влияний на сердце. У 14-суточных крысят симпатическая иннервация сердца еще не сформирована. Для этого возраста характерно ее минимальное присутствие в сердце. 21-суточные крысят характеризуются повышением активности симпатической нервной системы. У 21- и 28-суточных животных зафиксированы максимальные значения ЧСС (Т.А. Аникина, Г.А. Билалова 2004; Т.Л. Зефирова, Ф.Г. Ситдилов, 2006). С 21 по 30 день постнатального развития крыс установлены максимальные среднесуточные приросты массы сердца (Р.Р. Нигматуллина, 1991). При таком подходе, на наш взгляд, удастся охватить основные периоды развития крыс и проследить формирование регуляции сердечной деятельности в разные этапы постнатального онтогенеза.

Целью исследования является изучение совместного влияния агонистов адрено- и пуринорецепторов на сократимость миокарда крыс 14-, 21- и 100-суточного возраста.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на 238 белых лабораторных крысах 14-, 21- и 100-дневного возраста в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Наркотизировали животных 25%-ным раствором уретана из расчета 1.2 г/кг массы тела. Регистрировали амплитуду изометрического сокращения полосок миокарда на установке «PowerLab» с программным обеспечением «Chart 5.0» препарат фиксировали вертикально одним концом к датчику силы MLT 050/D, другим — к точке опоры, затем каждый препарат погружали в отдельный резервуар объемом 10 мл, в который подавался рабочий раствор Кребса следующего состава: (в mM) NaCl — 133, KCl — 4.7, MgCl₂ — 0.6, NaH₂PO₄ — 1.35, CaCl₂ — 2.5, глюкоза — 7,8 и карбоген (95% O₂ и 5% CO₂). Для поддержания pH в пределах 7.35–7.40 в раствор добавляли основную и кислотную буферы Trizma («Sigma»). Препараты стимулировали через платиновые электроды. В качестве агонистов P2X и P2Y₁-рецепторов использовали 2-метилтио-АТФ (2-м-АТФ), а β_{1,2}-адренорецепторов изопротеренол. Регистрировали амплитуду сокращения полосок миокарда предсердий и желудочков и рассчитывали реакцию силы сокращения в ответ на действие агонистов в абсолютных значениях и в процентах от исходного. За 100%, принимали исходные сокращения полосок миокарда, относительно них рассчитывали влияние используемых фармакологических агентов.

Сократимость миокарда 14–100-сут крыс при действии изопротеренола разных концентраций

Возраст (<i>n</i>)	Концентрация	Сила сокращения (в % от исх.)	
		предсердия	желудочки
14 суток (<i>n</i> = 4)	Изопротеренол 10^{-4} М	$103.6 \pm 3.9^*$	$102.1 \pm 3.7^*$
(<i>n</i> = 10)	Изопротеренол 10^{-3} М	$222.5 \pm 9.4^*$	$196.9 \pm 25.5^*$
(<i>n</i> = 4)	Изопротеренол 10^{-2} М	$162.1 \pm 10.2^*$	$156.6 \pm 23.1^*$
21 сутки (<i>n</i> = 10)	Изопротеренол 10^{-13} М	$106.3 \pm 5.8^*$	$107.1 \pm 7.2^*$
(<i>n</i> = 10)	Изопротеренол 10^{-12} М	$143.9 \pm 4.7^*$	$129.3 \pm 1.9^*$
(<i>n</i> = 10)	Изопротеренол 10^{-11} М	$156.2 \pm 5.9^*$	$136.6 \pm 3.7^*$
56 суток (<i>n</i> = 10)	Изопротеренол 10^{-12} М	103.4 ± 5.4	104.7 ± 6.8
(<i>n</i> = 10)	Изопротеренол 10^{-11} М	$140.8 \pm 14.6^*$	151.4 ± 9.0
(<i>n</i> = 10)	Изопротеренол 10^{-10} М	$158.0 \pm 10.2^*$	163.0 ± 13.1
100 суток (<i>n</i> = 10)	Изопротеренол 10^{-7} М	101.3 ± 3.7	102.6 ± 4.2
(<i>n</i> = 10)	Изопротеренол 10^{-6} М	$123.1 \pm 3.2^*$	$154.6 \pm 6.7^*$
(<i>n</i> = 10)	Изопротеренол 10^{-5} М	$122.6 \pm 4.1^*$	$154.2 \pm 6.7^*$

Примечание. * — достоверность по сравнению с исходным значением: $p < 0.05$, ** — достоверность по сравнению с исходным значением: $p < 0.01$.

Для определения модулирующего влияния 2-м-АТФ на эффект изопротеренола записывали контрольное действие изопротеренола в течение 20 мин. Затем полоски отмывали и записывали исходную сократимость миокарда в течение 10 мин, вновь добавляли изопротеренол и на 10 мин добавляли 2-м-АТФ. Также проводили эксперимент с обратной последовательностью подачи веществ, когда изопротеренол на 10 мин добавляется на фоне положительного эффекта агониста Р2-пуринорецепторов. Используемые реактивы производства “Sigma”.

Достоверность различий рассчитывали по парному и непарному *t* критерию Стьюдента ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для определения возрастных особенностей чувствительности $\beta_{1,2}$ -адренорецепторов миокарда изучали влияние стойкого агониста этих рецепторов — изопротеренола в диапазоне концентраций 10^{-13} – 10^{-2} М. Чувствительность адрено-, и пуринорецепторов миокарда определяли величиной пороговой дозы вводимых агонистов. Повышение чувствительности органа к вводимому веществу может быть вызвано повышением эндогенного количества этого вещества и достаточно небольших экзогенных доз для того, чтобы вызвать пороговую реакцию. Известно, что изменение чувствительности сердца к норадреналину зависит от состояния мембранных рецепторов кардиомиоцитов, их плотности на поверхности мембраны и степени сопряжения рецепторов с аденилатциклазой. Плотность β -адренорецепторов в клеточной мембране кардиомиоцитов зависит от различных факторов. Например, она нахо-

дится в обратно-пропорциональной зависимости от количества катехоламинов. При усилении активности симпатического отдела вегетативной нервной системы, т.е. увеличении концентрации НА в сердце количество и чувствительность β -адренорецепторов снижается с возрастом (Ф.Г. Ситников, Т.Л. Зефилов, 2006; Е. Lakatta, 1993).

В наших экспериментах на изолированных полосках миокарда предсердий и желудочков изопротеренол оказывает дозозависимое влияние и проявляет разную эффективность в зависимости от возраста животных. Пороговая концентрация изопротеренола, вызывающая достоверное увеличение силы сокращения миокарда предсердий и желудочков у 14-суточных составила 10^{-3} М. Сократимость желудочков возрастает на $122.5 \pm \pm 9.40\%$, предсердий на $96.96 \pm 25.5\%$. Агонист в концентрации 10^{-2} М увеличивает сократимость предсердий на $62.1 \pm 10.2\%$, желудочков на $56 \pm \pm 23.1\%$. В концентрации 10^{-4} М сократимость миокарда достоверно не изменялась. У 21-суточных животных пороговая концентрация изопротеренола составила 10^{-12} М. Сократимость предсердий увеличивается на $43.9 \pm 4.7\%$, желудочков на $29.31 \pm 1.85\%$. У животных этого возраста изопротеренол оказывал эффективное влияние на сократимость миокарда также в концентрациях 10^{-11} – 10^{-5} М. У 100 сут крыс концентрация изопротеренола 10^{-6} М является пороговой величиной. Сократимость предсердий увеличивается на $23.10 \pm 3.20\%$, желудочков на $54.60 \pm 6.70\%$. Концентрация 10^{-7} М была не эффективной, а изопротеренол в концентрации 10^{-5} М увеличивал сократимость миокарда предсердий и желудочков на 22.6 ± 4.1 и 54.2 ± 6.7 соответственно (таблица).

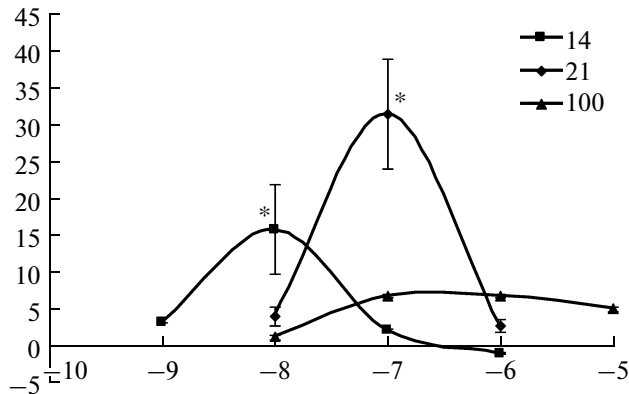


Рис. 1. Дозозависимый эффект 2-метилтио-АТФ на сократимость миокарда предсердий растущих крыс. Примечание: * — достоверность по сравнению с исходным значением: $p < 0.05$.

Реакция силы сокращения миокарда предсердий в ответ на пороговые концентрации изопротеренола снижается от 21- к 100-суточному возрасту ($p < 0.05$), а сила сокращения миокарда желудочков, наоборот, от 21- к 100-суточному возрасту повышается ($p < 0.05$).

Ранее нами проведены исследования по определению дозозависимого эффекта агониста пуринорецепторов, стойкого аналога АТФ — 2-м-АТФ на силу сокращения миокарда (Аникина и др. 2008). Пороговая концентрация 2-м-АТФ, вызывающая положительный инотропный эффект миокарда предсердий и желудочков у 14-суточных составила 10^{-8} М, у 21-суточных животных

10^{-7} М, у 100-суточных — 10^{-6} М. Концентрация агониста пуринорецепторов, вызывающая положительный инотропный эффект от 14- к 100-суточному возрасту повышается, что указывает на более высокую чувствительность пуринорецепторов миокарда на ранних этапах онтогенеза. У 14-суточных крысят агонист пуринорецепторов увеличивает силу сокращения миокарда предсердий на $15.4 \pm 2.06\%$ и миокарда желудочков на $25.8 \pm 6.1\%$ ($p < 0.01$; $n = 10$). У 21-дневных агонист в концентрации 10^{-7} М увеличивает силу сокращения миокарда предсердий и желудочков приблизительно на $31.3 \pm 5.8\%$ ($p < 0.01$; $n = 10$). У 100-суточных крыс агонист в концентрации 10^{-6} М увеличивает силу сокращения на $6.5 \pm 0.2\%$ ($n = 10$). Максимальная реакция силы сокращения миокарда предсердий и желудочков при действии пороговой концентрации 2-м-АТФ наблюдается у 21- и 14-сут крысят (рис. 1).

У крыс развитие миокарда происходит в ранние сроки постнатального онтогенеза (Швалев и др., 2007). С 3-х недельного возраста совершенствуется сократительный аппарат миокарда крыс. Деление кардиомиоцитов полностью прекращается к 21- суткам жизни, и в период с 21 по 30 день идет их усиленный рост. В этом возрасте в кардиомиоцитах преобладает Ca^{2+} -индуцированное освобождение Ca^{2+} из СПР, необходимого для активации сокращения (Escobar et al., 2004) и в желудочках крыс Ca^{2+} каналы Т-типа заменяются на Ca^{2+} -каналы L-типа (Ferreon et al., 2002). Таким образом, функциональные системы кардиомиоцитов начинают выходить на определенный ста-

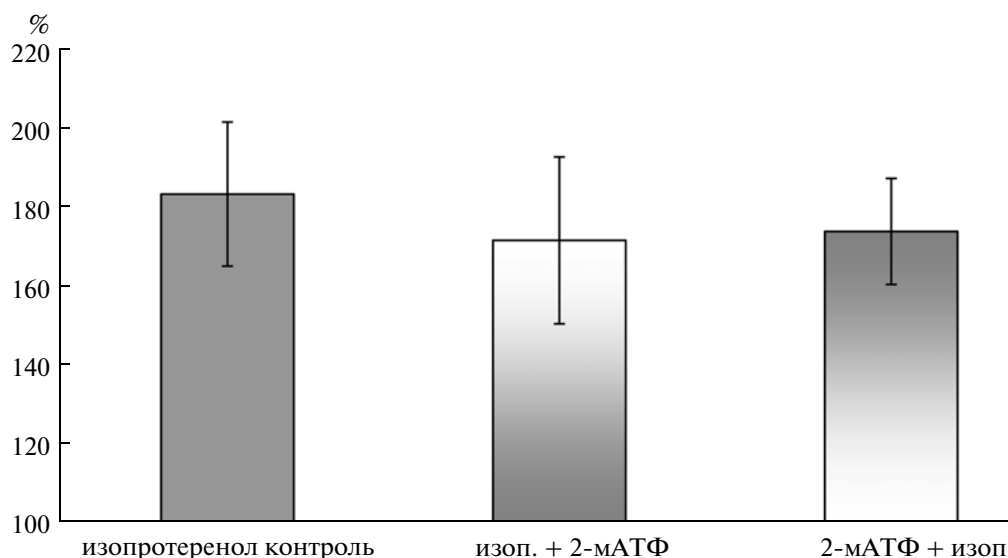


Рис. 2. Совместное влияние изопротеренола и 2-метилтио-АТФ на силу сокращения миокарда желудочков у 14-суточных крыс.

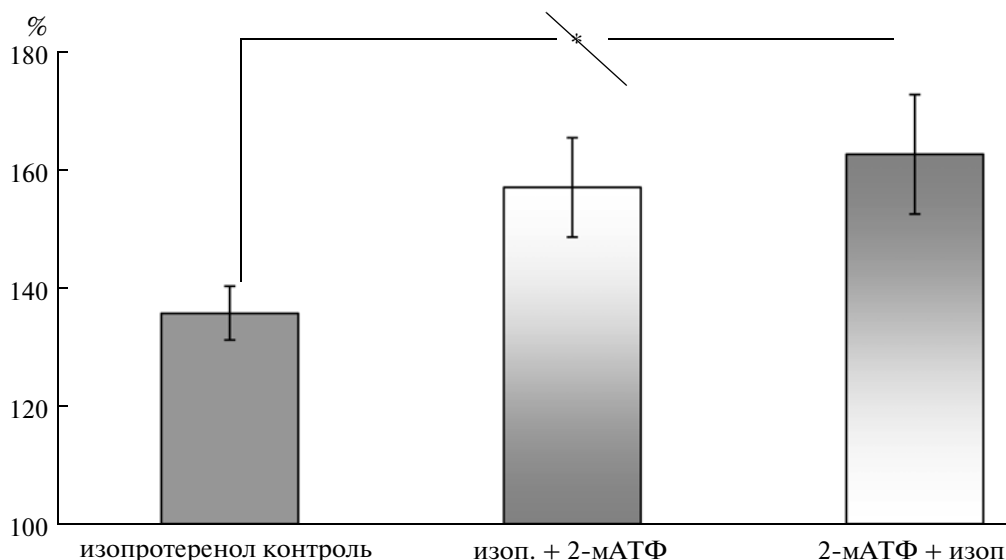


Рис. 3. Совместное влияние изопроterenола и 2-метилтио-АТФ на силу сокращения миокарда предсердий у 21-суточных крыс.

бильный уровень, характерный для взрослого организма. Возможно, поэтому максимальный инотропный эффект миокарда желудочков на действие изопроterenола и 2-м-АТФ проявляется у 21-суточных крысят.

Изучение взаимодействия адренорецепторов и пуринорецепторов сердца является необходимым, так как исследуемые системы функционируют одновременно и имеют ярко выраженные возрастные особенности на ранних этапах постнатального онтогенеза.

Совместное влияние изопроterenола и 2-м-АТФ изучали при последовательном добавлении стойкого аналога P2X- и P2U₁-рецепторов — 2-м-АТФ на фоне действия изопроterenола. Также проводились эксперименты с обратной последовательностью подачи веществ, когда изопроterenол добавляется на фоне эффекта агониста P2-пуринорецепторов. В эксперименте использовали пороговые концентрации агонистов для каждого возраста.

У 14-суточных животных в миокарде желудочков добавление 2-м-АТФ в концентрации 10^{-8} М уменьшает положительный инотропный эффект изопроterenола (10^{-3} М) на 6.3%. Сократимость желудочков к 30 мин снижается и эффект обоих агонистов составляет $171.31 \pm 21.11\%$, что меньше положительного эффекта одного изопроterenола в контроле ($181.03 \pm 18.02\%$). Усиливающие влияние 2-м-АТФ на сократимость миокарда желудочков, которое в контроле составляло 25.8% не сохраняется. При обратной последовательности подачи веществ общее увеличение сократимости миокарда составило $173.56 \pm 13.46\%$. У 14-суточных крысят в предсердиях при добавлении 2-м-АТФ на фоне развивающегося положительного действия изопроterenола, общий эффект обоих агонистов

при совместном влиянии составляет сумму влияний изопроterenола и 2-м-АТФ при независимой активации рецепторов.

У 21-суточных животных в контроле изопроterenол в концентрации 10^{-12} М увеличивает силу сокращения миокарда предсердий до $137.6 \pm 4.5\%$. При добавлении 2-м-АТФ (10^{-7} М) на фоне изопроterenола сила сокращения увеличивается до $156.8 \pm 8.4\%$, что превышает действие одного изопроterenола в контроле ($p < 0.05$), но не достигает суммарного ответа агонистов при независимой активации рецепторов, который составляет 168.7% (рис. 3). Добавление 2-м-АТФ на фоне изопроterenола увеличивает сократимость желудочков до 139.3%, что превышает эффект одного изопроterenола в контроле (124.8 ± 1.7 ; $p < 0.05$). При обратной последовательности подачи веществ общий эффект влияния обоих агонистов не изменяется и составляет $141.6 \pm 4.0\%$.

У 100-суточных животных добавление 2-м-АТФ в присутствии изопроterenола в предсердиях и желудочках мало изменяет его действие в контроле. в контроле изопроterenол в концентрации 10^{-6} М увеличивает силу сокращения миокарда предсердий до $124.7 \pm 4.8\%$. При добавлении 2-м-АТФ (10^{-6} М) на фоне изопроterenола сила сокращения увеличивается до $134.9 \pm 4.3\%$. При обратной последовательности подачи веществ общий эффект влияния обоих агонистов не изменяется и составляет $135.3 \pm 3\%$. Добавление 2-м-АТФ на фоне изопроterenола увеличивает сократимость желудочков до $144.6 \pm 6.7\%$, что соответствует эффекту одного изопроterenола в контроле ($141.9 \pm 5.6\%$). При обратной последовательности подачи веществ общий эффект влияния обоих агонистов не изменяется и составляет $145.0 \pm 6.9\%$. У 100-суточных

животных в предсердиях добавление 2-МАТФ мало изменяет эффект изопротеренола в контроле, а в желудочках усиливающее влияние изопротеренола при добавлении 2-м-АТФ не наблюдается.

Таким образом, у 21-суточных животных положительный инотропный эффект совместного влияния агонистов P2-пуринорецепторов 2-м-АТФ и β -адренорецепторов изопротеренола является дополняющим т.е. аддитивным. При повышении уровня симпатической активности, на фоне высокой функциональной активности β -адренорецепторов и P2X-рецепторов сердца крыс 21-суточного возраста совместное действие агонистов приводит к развитию дополняющего друг друга эффекта в увеличении сократимости миокарда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аникина Т.А., Билалова Г.А., Ситдилов Ф.Г. Влияние блокады бета адренорецепторов на сердечную деятельность крыс в постнатальном онтогенезе // Бюлл. exper. биол. мед. 2004. Т. 136. № 9. С. 265–268.
- Аникина Т.А., Ситдилов Ф.Г. Пуринорецепторы сердца в онтогенезе. Казань, 2011. 166 с.
- Аникина Т.А., Ситдилов Ф.Г., Зверев А.А., Билалова Г.А., Хамзина Е.Ю. Пуринергическая регуляция деятельности сердца крысы в онтогенезе // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 5. С. 333–339.
- Западнюк И.П., Западнюк И.В., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Развитие содержания, использование в эксперименте. Учебное пособие для студентов биол. вузов. Киев, 1983. 383 с.
- Нигматуллина Р.Р. Регуляция сердечного выброса крыс, развивающихся в условиях различных двигательных режимов. Автореф дис. ... канд. биол. наук. Казань: КГПИ, 1991. 40 с.
- Ситдилов Ф.Г., Зефиоров Т.Л. Лекции по возрастной физиологии сердца. Казань, 2006. 102 с.
- Швалев В.Н. Возрастные изменения регуляторных механизмов сердечно-сосудистой системы и значение синтетазы оксида азота в норме и при патологии // Кардиология. 2007. Т. 47. № 5. С. 67–72.
- Abbracchio M.P. Update and subclassification of the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy // Rev. Pharmacol. 2006. 58. P. 281–341.
- Boehm S., Kubista H. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors // Pharmacol. Rev. 2002. V. 54. № 1. P. 43–99.
- Bogdanov Y., Rubino A., Burnstock G. Characterization of subtypes of the P2X and P2Y families of ATP receptors in the foetal human heart // Life Sci. 62. 1998. P. 697–703.
- Burnstock G. Purinergic signaling // Brit. J. Pharmacol. 2006. V. 147. P. 172–187.
- Burnstock G. Purines and Purinoceptors: Molecular Biology Overview. Encyclopedia of Neuroscience // Oxford: Academic Press. 2009. V. 7. P. 1253–1262.
- Christie A., Sharma V.K., Sheu S.S. Mechanism of extracellular ATP-induced increase of cytosolic Ca^{2+} concentration in isolated rat ventricular myocytes // J. Physiol. (Lond.). 1992. V. 445. P. 369–438.
- Cheung K.K., Ryten M., Burnstock G. Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2y receptors in mammalian development // Developmental dynamics. 2003. V. 228. P. 254–266.
- Ennion S., Hagan S., Evans R.J. The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 29361–29367.
- Escobar A.L., Ribeiro-Costa R., Villalba-Galea C., Zoghbi M.E., Pérez C.G., Mejía-Alvarez R. Developmental changes of intracellular Ca^{2+} transients in beating rat hearts // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2004. V. 286. P. 971–978.
- Ferron L., Capuano V., Deroubaix E., Coulombe A., Renaud J.F. Functional and molecular characterization of a T-type Ca^{2+} channel during fetal and postnatal rat heart development // J. Mol. Cell Cardiol. 2002. V. 34(5). P. 533–546.
- Hansen M.A., Bennett M.R., Barden J.A. Distribution of purinergic P2X receptors in the rat heart // J. Auton. Nerv. Syst. 1999. V. 78:1. P. 1–9.
- Lakatta E.G. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age // Physiol. Rev. 1993. V. 73. P. 413–467.
- Pelleg A., Katchanov G., Xu J. Autonomic neural control of cardiac function: modulation by adenosine and adenosine 5'-triphosphate // Am. J. Cardiol. 1997. V. 79 (12A). P. 11–14.
- Qi A.D., Kwan Y.W. Modulation by extracellular ATP of L-type calcium channels in guinea pig single sinoatrial nodal cell // Br. J. Pharmacol. 1996. V. 119. P. 1454–1462.
- Ralevic V., Burnstock G. Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system // Circulation. 1991. V. 84. P. 1–14.
- Rockson S., Homsy C., Quinn P., Manders W., Haber E. Cellular mechanisms of impaired adrenergic responsiveness in neonatal dogs // J. Clin. Invest. 1981. V. 67. P. 308–312.
- Scamps F., Vassort G. Mechanism of extracellular ATP-induced depolarization in rat isolated ventricular cardiomyocytes // Pflügers. Arch. 1990. V. 417. P. 309–316.
- Sesti C., Broekman M.J., Drosopoulos J.H., Islam N., Marcus A.J., Levi R. EctoNucleotidase in cardiac sympathetic nerve endings modulates ATP-mediated feedback of norepinephrine release // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002. V. 300 (2). P. 605–611.
- Talasila A., Germack R., Dickenson J.M. Characterization of P2Y receptor subtypes functionally expressed on neonatal rat cardiac myofibroblasts // Br. J. Pharmacol. 2009. 158(1). P. 339–353.
- Vassort G. Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium // Physiol. Rev. 2001. V. 81. № 2. P. 767–806.
- Wang, Z., Wilson, G.F., Griffith, L.C. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates and regulates the Drosophila eag potassium channel // J. Biol. Chem. 2002. P. 24022–24029.
- Webb T.E., Boluyt M.O., Barnard E.A. Molecular biology of P2Y purinoceptors: expression in heart // J. Auton. Pharmacol. 1996. V. 16. P. 303–307.
- Xiao R.P., Ji X., Lakatta E.G. Functional coupling of the b2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes // Mol. Pharmacol. 1995. 47. P. 322–329.

Interaction of Adrenergic and Purinergic Receptors in the Regulation of Rat Myocardial Contractility in Postnatal Ontogeny

T. A. Anikina, A. A. Zverev, F. G. Sitdikov, and I. N. Anisimova

Kazan (Volga) Federal University, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, 420008 Tatarstan, Russia

e-mail: Aleksei5@rambler.ru

Received April 26, 2012; in final form, December 28, 2012

Abstract— β -Adrenergic receptor agonist isoproterenol and purinergic receptor agonist 2-methylthio-ATP have a positive effect on the myocardial contractile force and show different efficiencies depending on the age of animals. The maximum inotropic effect of agonists on the ventricular myocardial contractility was observed in 21-day-old rat pups. The study of a combined effect of isoproterenol and 2-methylthio-ATP showed that an increase in the sympathetic regulatory effects on the heart of 21-day-old animals, against the background of a high functional activity of β -adrenergic receptors and P2X receptors of the heart, a combined administration of the agonists led to a mutually complementing effect of an increase in the myocardial contractility.

Keywords: P2 purinergic receptors, adrenergic receptors, myocardium, contractility, ontogeny, ATP

УДК 591.39:535

ПОЛУЧЕНИЕ ХИМЕРНЫХ БЛАСТОЦИСТ МЫШИ МЕТОДАМИ ЛАЗЕРНОЙ НАНОХИРУРГИИ

© 2013 г. А. К. Шахбазян^{1, 2}, В. З. Тарантул³, А. Д. Залесский¹, А. В. Рябова⁴, В. Б. Лощенов⁴,
С. А. Антонов³, И. А. Гривенников³, А. С. Кривохарченко⁵,
А. В. Карменян⁶, В. А. Надточенко¹

¹Институт химической физики РАН
119991 Москва, ул. Косыгина, 4

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3

³Институт молекулярной генетики РАН
123182 Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2

⁴Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН
119991, Москва, ул. Вавилова, 38

⁵Max-Delbrück Center for Molecular Medicine Robert-Rossle-Str. 10, Berlin, 13092 Germany

⁶Biophotonics and Molecular Imaging Research Center (BMIRC) National Yang-Ming University,
Taipei, R.O.C., 11221 Taiwan

E-mail : avetik@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.06.13 г.

Окончательный вариант получен 24.06.13 г.

Описано получение химерных бластоцист мыши методами лазерной нанохирургии без использования какой-либо другой дополнительной техники. Для проведения экспериментов был разработан и сконструирован специальный лазерный микроманипулятор. В экспериментах использовали эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши, трансформированные вектором pEF-GFP, кодирующим флуоресцирующий зеленый белок. ЭСК с помощью лазерного микроманипулятора вводили в перивителлиновое пространство мышинных эмбрионов на стадии 8-и клеток. Оперированные эмбрионы культивировали *in vitro* до стадии вылупления из *zona pellucida*. Наличие флуоресценции и ее точную локализацию регистрировали на конфокальном микроскопе. Впервые было продемонстрировано, что включения введенных лазерным микроманипулятором ЭСК, обнаруживаются как во внутренней клеточной массе (ВКМ), так и в трофэктодерме химерной бластоцисты. Технология проведения нанохирургических операций на ранних доимплантационных эмбрионах млекопитающих с помощью лазерной техники открывает большие возможности не только для решения фундаментальных задач экспериментальной эмбриологии млекопитающих, но эта технология также может быть использована как перспективный метод получения химерных и трансгенных животных с заданным экспериментаторами генотипом.

Ключевые слова: лазерная нанохирургия, доимплантационные эмбрионы млекопитающих, эмбриональные стволовые клетки, зеленый флуоресцирующий белок, химерные бластоцисты.

DOI: 10.7868/S0475145013060104

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все работы связанные с получением генетически модифицированных млекопитающих путем введения эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) в доимплантационные эмбрионы (в основном на стадии бластоцисты), осуществляются главным образом с применением традиционных подходов (агрегация клеток, микроинъекции) (Nagy et al., 2003), а в последние годы с использова-

нием пьезомикроманипуляторов (Hu et al., 2013). Одновременно с этим активно развиваются новые технологии, связанные с использованием лазеров для манипуляций различными биологическими объектами, в том числе с клетками и ранними доимплантационными эмбрионами млекопитающих (Karmenyan et al., 2009; Krivokharchenko et al., 2012). В данной работе впервые продемонстрирована возможность получения химерных бластоцист мыши с

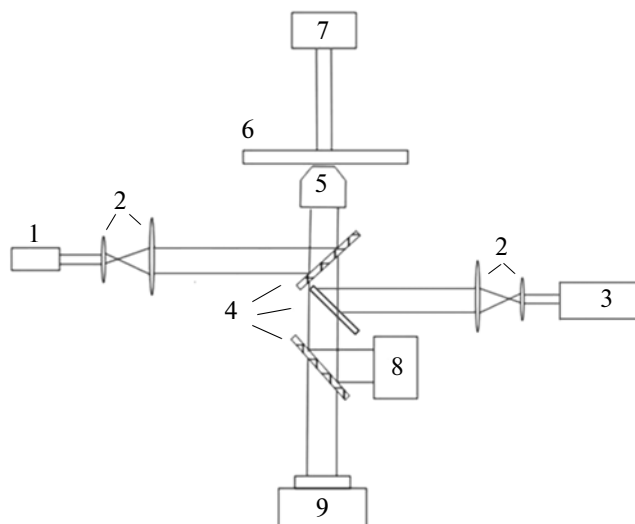


Рис. 1. Принципиальная оптическая схема, использованная в эксперименте: 1 — титан-сапфировый лазер непрерывного излучения в диапазоне 750–850 нм фирмы Avesta; 2 — телескоп — расширитель лазерного пучка; 3 — диодный лазер; 4 — три дикихрических зеркала; 5 — объектив микроскопа; 6 — предметный столик; 7 — источник освещения; 8 — флуориметр/счетчик фотонов; 9 — видеокамера.

применением усовершенствованной лазерной нанохирургии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали как оригинальные, специально разработанные для данных экспериментов методы и подходы, так и стандартные, применяемые в клеточной биологии и клеточной инженерии.

Получение эмбрионов

Для экспериментов эмбрионы получали от суперовулированных самок мышей линии C57BL/6, спаренных с самцами линии СВА. Суперовуляцию проводили по стандартной схеме с использованием гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (PMSG, Intervet) и человеческого хорионического гонадотропина (hCG, Intervet). Животных умерщвляли путем дислокации шейных позвонков. Эмбрионы получали путем промывания яйцеводов. Все манипуляции с эмбрионами проводили в среде M2 (Sigma), для длительного культивирования использовали среду M16 (Sigma), CO₂ инкубатор (Sanyo) и 4-лучные пластиковые чашки “Nunclon” (Nunc).

Лазерный микроманипулятор

Микрохирургические операции были выполнены на установке мультиплексного лазерного манипулятора разработанного в ИХФ РАН. Принципи-

альная схема оптического блока использованного в эксперименте представлена на рис. 1.

В данной работе в мультиплексном лазерном манипуляторе использовали инвертированный оптический микроскоп (Olympus IX71). В поле микроскопа через объектив с высокой числовой апертурой заводили лазерное излучение от двух лазеров. Использовали объективы ЛОМО М-ФЛЮАР 100×/1.3 или Olympus LCAch N 40x/0.55 Ph2. Сфокусированное излучение титан-сапфирового непрерывного лазера 790 нм в предметной плоскости, где находится исследуемый образец, выполняло роль “оптического пинцета”. Пространственные манипуляции над клетками проводили путем их перемещения относительно фокального пятна при движении предметного столика. Перемещение предметного столика осуществляли либо “вручную” либо с помощью позиционных пьезо-двигателей, причем, в последнем случае, обеспечивается точность перемещений близкая к десяти нанометрам. Непрерывный диодный лазер с контролируемой экспозицией, длина волны 1.48 мкм, мощность в поле микроскопа 80 мВт использовали для проведения микрохирургических операций с блестящей оболочкой эмбриона и получения отверстия с размером около 10 мкм. Визуальный контроль осуществлялся с помощью видеокамеры (Sony ExwaveHAD). Установка также была оснащена спектрометром с фотоприемниками для регистрации спектров флуоресценции объекта исследования.

Культура эмбриональных стволовых клеток

ЭСК мыши линии R1 культивировались в среде α -MEM (Gibco, США), с 15% фетальной бычьей сывороткой, 2 мМ L-глутамина, и добавками 20 мкМ смеси витаминов, 100 мкМ заменимых аминокислот, 100 мкМ пирувата натрия, 80 мкМ меркаптоэтанол (ICN, США) и 20 мкг/мл гентамицина. ЭСК культивировались в чашках Петри, которые обрабатывались 0.1% желатином, или на чашках с фидерным слоем эмбриональных фибробластов мыши. При культивировании ЭСК на чашках покрытых желатином, в культуральную среду также добавлялся рекомбинантный LIF в концентрации 10 нг/мл. Эмбриональные фибробласты мыши выделялись из 13–14 дневных эмбрионов мыши 129 линии по стандартной методике. Фибробласты культивировались на чашках Петри диаметром 35 мм в среде DMEM (Gibco, США) с 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина (ICN, США) и 80 мкг/мл гентамицина. Для получение фидерного слоя фибробласты обрабатывались митомцином C (1.5 часа, 3 мкг/мл) в ростовой среде и после этого три раза отмывались раствором Хенкса. На следующий день фидерные слои использовались для посева ЭСК. Все клеточные культуры поддерживались в CO₂ инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ и при температуре 37°C.

Конструирование вектора

Вектор pEF-GFP был получен на основе коммерчески доступного вектора pсEGFP-C1 (Invitrogen, США), несущего ген устойчивости к селективному антибиотику неомицину. Последовательность промотора фактора элонгации Р EF1A была получена из вектора pBudCE4.1 с помощью рестрикции по сайтам NheI/XhoI и клонирования по липким концам в промежуточный вектор pSPT18. Конечный вектор рестрицирован BglII/HindIII, при этом вырезался фрагмент промотора Р CMV. Далее pSPT18 была рестрицирована по BamHI/HindIII, и фрагмент Р EF1A клонирован в вектор pсEGFP-C1 по сайтам BglII/HindIII.

Характеристика клеток линии R1-EF-GFP

Трансфекцию ЭСК проводили липосомальным методом с помощью метафектена (BioTex, Германия). Для трансфекции использовали 1 мкг плазмидной ДНК на 600 000 клеток и 3 мкл метафектена на 1 мл среды. Клетки инкубировали 2 ч при 37°C в CO₂ инкубаторе. Затем к клеткам добавляли еще 2 мл среды и продолжали инкубацию в течение 2-х суток в тех же условиях. Потом к клеткам добавляли неомицин в концентрации 20 мкг/мл для

селекции трансфицированных клеток. Селекцию проводили в течение 10–14 дней со сменой среды с антибиотиком каждые три дня. Клетки, экспрессирующие GFP, наращивали, а затем подвергали криоконсервации. Из трансфицированных клеток выделялась тотальная РНК и анализировалась экспрессия транскрипционных факторов Nanog, SOX2, OCT4 с помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. По экспрессии факторов плюрипотентности между клетками исходной линии R1 и трансгенными клетками R1-EF-GFP различий не обнаруживалось. Также проводилось карiotипирование клеток и анализ экспрессии поверхностных маркеров, таких как щелочная фосфатаза (AP) и SSEA-1 (CD15/Lewis-X).

Конфокальная микроскопия

Локализацию флуоресценции на вытупляющихся бластоцистах фиксировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-710 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany). Образцы из чашек для *in vitro* культивирования переносились на стерильные чашки Петри с тонким стеклянным дном толщиной 0.16 мм в среде для манипуляций M2. Для получения изображений использовали объектив Plan-Apochromat с увеличением 20 $\times$ (апертура 0.8). Возбуждение флуоресцентного белка производили лазером с длиной волны 458 нм и максимальной плотностью мощности 25 мВт, регистрировали флуоресценцию в диапазоне 460–600 нм при конфокальной диафрагме диаметром 151 μ м, размер изображений – 1024 $\times$ 1024 пикселей (159 нм/пиксель), скорость сканирования 1.27 μ с/пиксель (1.56 с/изображение). Для получения 3D реконструкции проводили сканирование по оси Z с шагом 1 μ м. В результате получали наложение 3D реконструкций флуоресцентного изображения и изображения, полученного в режиме проходящего света.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для проведения экспериментов эмбрионы выделяли из яйцеводов суперовулированных самок на стадии 2-х бластомеров, которые культивировали *in vitro* до стадии 8 клеток (морула). Эксперимент состоял из двух этапов. Сначала, используя диодный лазер, проводили перфорацию блестящей оболочки (*zona pellucida*) с таким расчетом, чтобы возможно было в образовавшееся отверстие ввести стволовые клетки диаметром порядка 10 мкм. Параметры лазерного пучка в поле микроскопа были оценены в рамках теории распространения гауссовского пучка: перетяжка $2w_0 = 1.22 \lambda / NA$, где NA числовая апертура; $z_0 = (\pi w_0)^2 / \lambda$ (Silfvast et al.,



Рис. 2. Морула с перфорированной блестящей оболочкой. Стрелкой указано место перфорации.

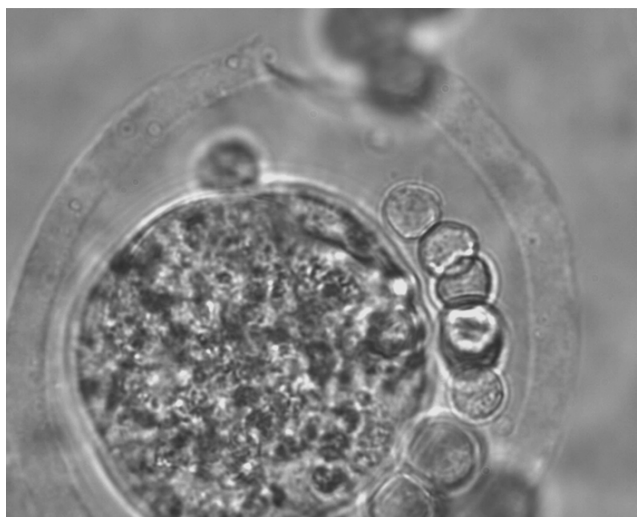


Рис. 3. Эмбриональные стволовые клетки, введенные в перивителлиновое пространство эмбриона.

2004). Для апертуры $NA = 1.3$ параметры пучка составляют $w_0 = 0.69$ мкм, $z_0 = 1.02$ мкм, при $NA = 0.55$ — $w_0 = 1.64$ мкм, $z_0 = 5.7$ мкм. Коэффициент поглощения воды для длины волны 1.48 мкм составляет 0.003 см^{-1} (Hale et al., 1973). Оценка температуры разогрева в области перетяжки дает величину близкую к 75°C . Экспериментально показано, что при этих параметрах воздействия эффективно происходит перфорация блестящей оболочки эмбриона и существенно отрицательного воздействия на эмбрион операция перфорации не оказывает (рис. 2).

На втором этапе при помощи непрерывного титан-сапфирового лазера 790 нм выполнялся оптический захват модифицированных эмбриональных

стволовых клеток и их перемещение под блестящую оболочку эмбриона через полученное ранее отверстие (рис. 3). Параметры гауссовского пучка в поле микроскопа при $NA = 1.3$ $w_0 = 0.37$ мкм, $z_0 = 0.55$ мкм и при $NA = 0.55$ $w_0 = 0.88$ мкм, $z_0 = 3.1$ мкм. Коэффициент поглощения воды для этой длины волны пренебрежимо мал и составляет порядка 10^{-9} см^{-1} .

Далее эти эмбрионы культивировали в CO_2 инкубаторе в среде M16 до стадии вылупляющейся бластоцисты.

Как видно на рис. 4 (см. цветную вклейку), флуоресценция наблюдается как в клетках ВКМ, так и трофобластических клетках образующейся химерной бластоцисты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, в данной работе показано, что предложенная методика проведения лазерной операции позволяет получить химерные бластоцисты мыши. Преимуществом данной методики является: 1) высокая скорость проведения операции — в настоящей работе операция занимала не более 2 мин без оптимизации отдельных стадий по времени, время операции может быть существенно сокращено за счет оптимизации; 2) возможность точного контроля воздействия лазерного излучения на каждой стадии операции за счет регулировки мощности лазера и времени экспозиции; 3) сфокусированное излучение 790 нм, соответствующее окну прозрачности биообъекта, позволяет эффективно вводить клетки в перивителлиновое пространство эмбриона без использования механических микроманипуляторов, и без негативного воздействия на клетку.

Считается, что ЭСК мыши, введенные в бластоцисты, при формировании химер плохо или вообще не дифференцируются в трофэктодерму (Nagy et al., 1990; Beddington et al., 1989). Вместе с тем, различные регуляторные факторы и стимулы в условиях *in vitro* могут обеспечивать дифференцировку ЭСК мыши в клетки трофэктодермы (Niwa et al., 2000; Schenke-Layland et al., 2007), что указывает на существование у них такого потенциала. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что перенос ЭСК мыши в 8-ми клеточный эмбрион с помощью лазерной технологии приводит к тому, что эти клетки при дифференцировке эффективно включаются как в ВКМ, так и в трофэктодерму. Ранее сходные результаты были получены при создании химер с использованием гибридов ЭСК с соматическими клетками (Do et al., 2011; Kruglova et al., 2008).

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе было использовано также оборудование Центра коллективного пользования ФГБУН Института молекулярной генетики РАН “Центр клеточных и генных технологий”. Исследование было поддержано грантами программы Президиума РАН на 2013–2017 гг. “Молекулярная и клеточная биология” и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 11-04-01337 и № 13-04-00598). А также Проектом РФФИ № “11-03-00705-а” “Физико-химические процессы образования и наноструктурирования полимерных объектов иницируемые многофотонным поглощением под действием фемтосекундных лазерных импульсов” и Программой Президиума РАН

“Поддержка инноваций и разработок” на 2013 год, проект “Новая технология получения чистых линий генетически модифицированных лабораторных мышей методами фемтосекундной лазерной микрохирургии”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Beddington R.S., Robertson E.J.* An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo // *Development* 1989. V. 105. P. 733–737.
- Do J.T., Choi H.W., Choi Y. et al.* Pluripotent hybrid cells contribute to extraembryonic as well as embryonic tissues // *Stem Cells and Development*. 2011. V. 20. P. 1063–1069.
- Hale G.M., Querry M.R.* Optical Constants of Water in the 200-nm to 200-microm Wavelength Region // *Appl. Opt.* 1973. V. 12. P. 555–563.
- Hu M., Wei H., Zhang J. et al.* Efficient production of chimeric mice from embryonic stem cells injected into 4- to 8-cell and blastocyst embryos // *J. Animal Sci. and Biotechnology*. 2013. V. 4. № 1. P. 12.
- Karmenyan A.V., Shakhbazyan A.K., Sviridova-Chailakhyan T.A. et al.* Use of picosecond infrared laser for micromanipulation of early mammalian embryos // *Molecular Reproduction & Development*. 2009. V. 76. P. 975–983.
- Krivokharchenko A.S., Karmenyan A.V., Sarkisov O.M. et al.* Laser fusion of mouse embryonic cells and intra-embryonic fusion of blastomeres without affecting the embryo integrity // *PLOS ONE*. 2012. V. 7. Issue12. P. e50029.
- Kruglova A.A., Kizilova A.E., Zhelezova A.I. et al.* Embryonic stem cell/fibroblast hybrid cells with near-tetraploid karyotype provide high yield of chimeras // *Cell Tissue Res.* 2008. V. 334. P. 371–380.
- Nagy A., Gocza E., Diaz E.M. et al.* Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse // *Development*. 1990. V. 110. 815–821.
- Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K. et al.* Production of chimeras. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 2003.
- Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G.* Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells // *Nat. Genet.* 2000. V. 24. P. 372–376.
- Schenke-Layland K., Angelis E., Rhodes K. et al.* Collagen IV induces trophoblast differentiation of mouse embryonic stem cells // *Stem. Cells*. 2007. V. 25. P. 1529–1538.
- Silfvast W.T.* Laser Fundamentals. Cambridge. New York, NY. 2004.

Obtainment of Chimeric Blastocysts of Mice by Methods of Laser Nanosurgery

A. K. Shakhbazyan^{a, b}, V. Z. Tarantul^c, A. D. Zalessky^a, A. V. Ryabova^d, V. B. Loshchenov^d,
S. A. Antonov^c, I. A. Grivennikov^c, A. S. Krivokharchenko^e,
A. V. Karmenyan^f, and V. A. Nadtochenko^a

^a Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

^b Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, 142290 Moscow oblast, Russia

^c Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Akademika Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

^d Prokhorov Institute of General Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, ul. Vavilova 38, 119991 Russia

^e Max-Delbruck Center for Molecular Medicine, Robert-Rossle-Str. 10, Berlin, 13092 Germany

^f Biophotonics and Molecular Imaging Research Center (BMIRC),
National Yang-Ming University, Taipei, R. O. C., 11221 Taiwan

e-mail: avetik@rambler.ru

Received June 13, 2013; in final form, June 24, 2013

Abstract—The procedure of obtainment of chimeric blastocysts of mice by laser nanosurgery methods without using any other techniques is described. To perform the experiments, a special laser micromanipulator was invented. The murine embryonic stem cells (ESC), which were transformed with *pEF-GFP* vector, encoding the green fluorescent protein, were used in the experiments. ESC were introduced into the perivitelline space of murine embryos at the stage of 8 cells using the laser micromanipulator. The operated embryos were cultured in vitro until the stage of emergence from *zona pellucida*. The fluorescence and its precise localization were registered using a confocal microscope. It was shown for the first time that the inclusions of ESC introduced with the laser micromanipulator were found not only in the inner cell mass (ICM) but also in the trophectoderm of the chimeric blastocyst. The technology of nanosurgical operations at early stage preimplanted mammalian embryos using laser techniques opens great opportunities not only for solution of fundamental tasks of experimental embryology of mammals but also for obtainment of chimeric and transgenic animals with predetermined genotype.

Keywords: laser nanosurgery, preimplanted mammalian embryos, embryonic stem cells, green fluorescent protein, chimeric blastocysts

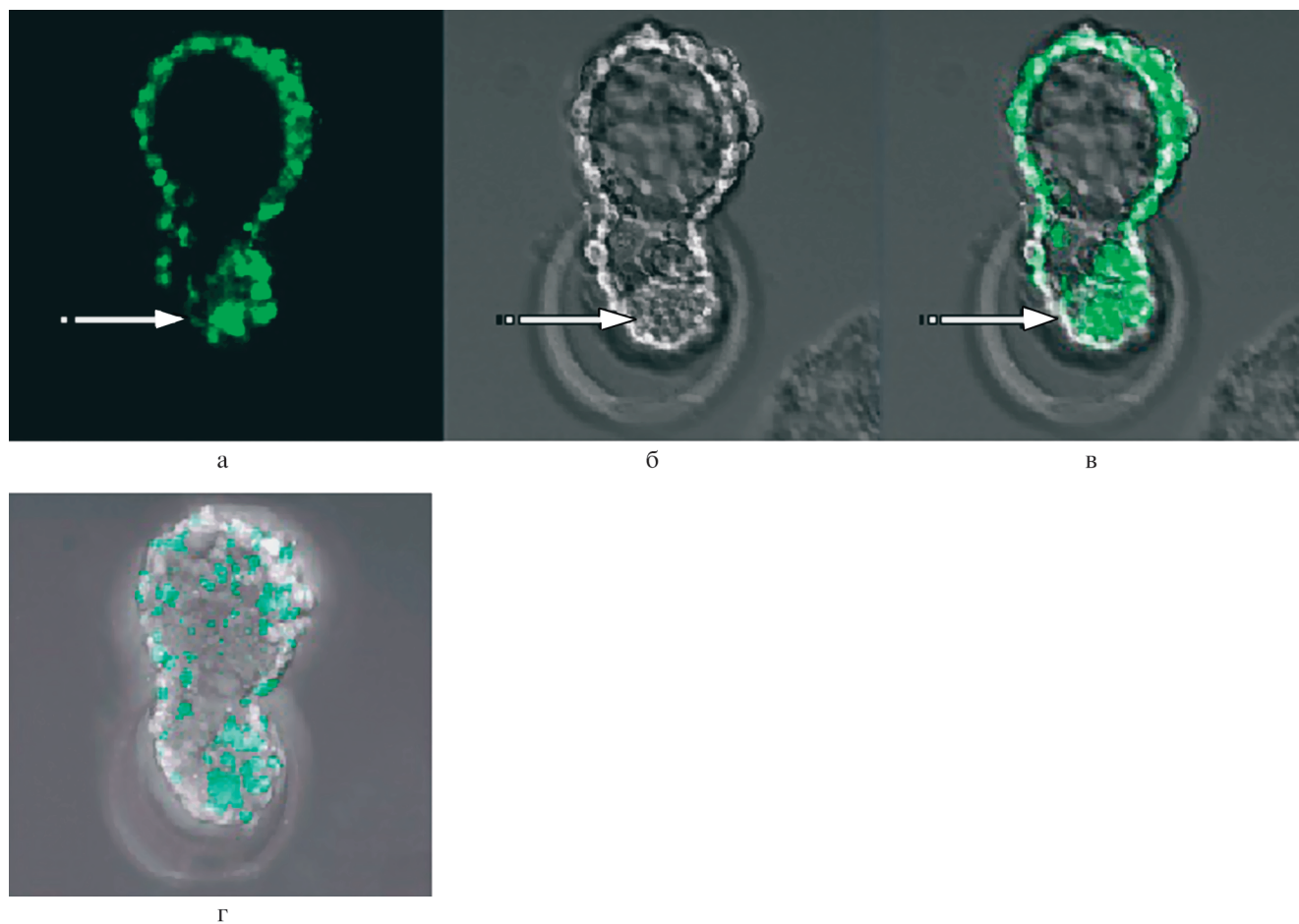


Рис.4

а – Флуоресцирующие ЭСК, включившиеся в трофэктодерму и ВКМ вылупляющейся бластоцисты;

б – та же бластоциста в проходящем свете;

в – наложение фотографий а и б (стрелкой указано место локализации ВКМ);

г – проекция 3D реконструкции бластоцисты на горизонтальную плоскость. Серый цвет – изображение в проходящем свете. Зеленый – флуоресценция GFP.

УДК 575.164

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНА *ERECTA2* НА РАЗВИТИЕ ПОБЕГА *ARABIDOPSIS THALIANA*

© 2013 г. А. Д. Солтабаева*, У. Н. Кавай-оол**, Е. В. Куприянова*, Т. А. Ежова*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119992 Москва, ул. Ленинские Горы, ГСП-1

**Тувинский государственный университет

667000 Кызыл, ул. Ленина, 36

E-mail: ekupriyanova@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.13 г.

Окончательный вариант получен 24.06.13 г.

С помощью анализа мутанта *erecta2 (er2) Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. исследована роль гена *ER2* в развитии растений. Показано, что мутация *er2* оказывает плеiotропный эффект на развитие всех органов побега — вызывает укорочение и утолщение стебля, листа, всех органов цветка, но не изменяет чувствительности к гиббереллину. Изменения морфологии органов побега связано с изменениями полярности клеток — они становятся шире и/или короче, чем у дикого типа. Установлено, что ген *ER2* локализован в нижнем плече хромосомы 1 и комплементарно взаимодействует с геном *ER*, играющим важную роль в контроле межклеточных взаимодействий.

Ключевые слова: развитие побега, мутанты, *Arabidopsis thaliana*, генные взаимодействия.

DOI: 10.7868/S0475145013060116

ВВЕДЕНИЕ

Образование тканей и органов растения — результат действия многих генов, контролирующих пространственно-временные особенности пролиферации и дифференцировки клеток. Центральную роль в контроле деления и растяжения клеток междоузлий играют гены, регулирующие синтез гиббереллина (ГБ) и передачу ГБ-сигнала. Нарушение работы этих генов приводит к снижению роста побега (Sun, 2008). Важную роль в контроле развития побега играют гены семейства *ERECTA*, к которому относятся гены — паралоги *ERECTA (ER)*, *ERL1 (ERECTA-LIKE 1)* и *ERL2*, кодирующие рецепторные серин-треониновые протеинкиназы. Наиболее высокий уровень экспрессии всех паралогов наблюдается в апикальной меристеме побега и активно делящихся клетках развивающихся латеральных органов (Yokoyama et al., 1998; Shpak et al., 2004). Мутации потери функции в гене *ER* вызывают развитие прямоствольного полу-карликового побега с укороченными междоузлиями и латеральными органами и утолщенным стеблем (Torii et al., 1996; Ежова и др., 1997; Douglas et al., 2002; Shpak et al., 2003; Torii et al., 2003).

Мутации паралогов не имеют фенотипического выражения, однако их объединение с мутацией *er* (у двойных и тройных мутантов) приводит к су-

щественному нарушению роста побега (Shpak et al., 2004; Shpak et al., 2003), что свидетельствует о совместном участии паралогов в контроле развития побега. Предполагается, что гены семейства *ER* контролируют межклеточные взаимодействия, в том числе и взаимодействия между клетками из разных тканей, что позволяет координировать процессы пролиферации и роста клеток, определяет их полярность (соотношение осей) в развивающемся растении (Shpak et al., 2003; Uchida et al., 2012). Функция генов семейства *ER* необходима для нормального развития покровной ткани (Tisné et al., 2011), в том числе и устьичного аппарата (Shpak et al., 2005; Masle et al., 2005), проводящей ткани (Ragni et al., 2011; Etchells et al., 2013), тканей тычинок (Hord et al., 2008).

Недавно установлено, что ген *ER* играет важную роль и в поддержании гомеостаза ствольных клеток побега путем ограничения уровня цитокининового сигнала. У растений, которые содержат одновременно мутации по гену *ER* и двум другим генам семейства *ER (ERL1, ERL2)*, частично дублирующим функцию *ER*, наблюдается усиление цитокининового сигнала и увеличение пула ствольных клеток (Uchida et al., 2013). Показано также, что ген *ER* вовлечен в модулирование других сигнальных путей, включая ауксиновый, брасси-

Таблица 1. Особенности морфологии побега мутанта *er2* и растений дикого типа

Измеряемый параметр	Генотип	
	дикий тип	<i>er2</i>
Высота цветоноса, см	31.1 ± 4.6	25.6 ± 4.2*
Количество розеточных листьев	6.8 ± 1.2	5.6 ± 0.5*
Длина вегетативной части, см	14.8 ± 1.8	7.8 ± 1.2***
Длина генеративной части, см	16.3 ± 5.8	17.8 ± 3.4
Количество вегетативных узлов	2.7 ± 0.5	2 ± 0.7**
Количество генеративных узлов	25.4 ± 7.9	44.8 ± 7.3***
Длина междоузлий вегетативной части побега, см	5.6 ± 1.1	2.65 ± 0.5**
Длина междоузлий генеративной части побега, мм	6.1 ± 0.9	3.9 ± 0.7***

Примечание. В табл. 1 и 2 представлены средние величины и их стандартные отклонения; *, **, *** — средние величины мутанта *er2* достоверно отличаются от показателей растений дикого типа при уровнях значимости $P \geq 0.95$, $P \geq 0.99$, $P \geq 0.999$, соответственно.

ностероидный и гиббереллиновый (van Zanten et al., 2009).

В коллекции *A. thaliana* кафедры генетики МГУ есть мутант *erecta2* (*er2*), который характеризуется прямостоячим (эректоидным) стеблем, как и ранее описанные неаллельные мутанты по гену *ER*. Мутация получена с помощью химического мутагенеза (этилметансульфонат) из расы Dijon-M и характеризуется рецессивным моногенным характером наследования, однако детальные исследования ее фенотипического проявления пока не проводились. Основной задачей работы было изучение особенностей развития мутанта *er2* для выяснения роли гена *ER2* в контроле развития побега. Исследовались также локализация гена *ER2* и его взаимодействие с геном *ER*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы мутанты *A. thaliana er2* (линия М-21-2) и *er1* (линия К-158), полученные из расы Dijon-M (линия К-1) из коллекции кафедры генетики МГУ. Растения выращивали в условиях теплицы. Для картирования мутант *er2* скрещивали с мутантом *clv1* (линия К-205), маркерной линией К-310 и другими маркерными линиями. Морфометрические измерения проводили на 10–20 растениях дикого типа, одиночных и двойных мутантов. Подготовку материала для сканирующей электронной микроскопии проводили как описано ранее (Ондар и др., 2008).

Для оценки чувствительности к экзогенному гиббереллину растения, начиная со стадии 4-х листной розетки, опрыскивали раствором гибберелловой кислоты GA_3 в дозе 50 мкМ или водой каждый день в течение месяца.

Картирование осуществляли с использованием морфологических и ДНК-маркеров. Для выявления ДНК-полиморфизма в F_2 от скрещивания *er2* с линией К-310 использовали CAPS-маркеры, выявляющие рестрикционный полиморфизм амплифицированных фрагментов ДНК. Последовательности праймеров подбирали при помощи программы “Web Primer”: CAPS-ADH (F 5'-CGGACAGATTATTCGATGCAA-3', R 5'-CATGTGTGATGATGCAACGAA-3'; рестрикцию амплифицированных фрагментов осуществляли с использованием эндонуклеазы XbaI) и CAPS-G17311 (F 5'-TGCGTAGATCCACTGACTTGT-3', R 5'-AGCGGCAGACTCAGCATTTGA-3', использовали эндонуклеазу HpaII). Выделение ДНК, электрофорез в агарозном геле и рестрикцию проводили как описано в работе Ежовой с соавт. (2003). В работе были использованы праймеры и реактивы для ПЦР фирмы “Евроген” (Россия). Использовали эндонуклеазы рестрикции фирмы “СибЭнзим” (Россия). Программа для проведения ПЦР для CAPS-маркеров: 92°C — 2 мин 30 с; 92°C — 50 с; 52–55°C — 30 с; 72°C — 120 с (30 циклов); 72°C — 5 мин. Расстояние от гена *ER2* до ДНК-маркера оценивали по методу Koornneef, Stam (1987).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические особенности мутанта *erecta2*

Мутант *er2* имеет ряд морфологических изменений, которые выявляются уже на стадии раннего проростка. Характерной особенностью проростков на стадии семядолей является утолщение и укорочение гипокотили и главного корня по сравнению с диким типом (раса Dijon-M), что отличает мутант *er2* и от мутанта *er*. Листья розетки

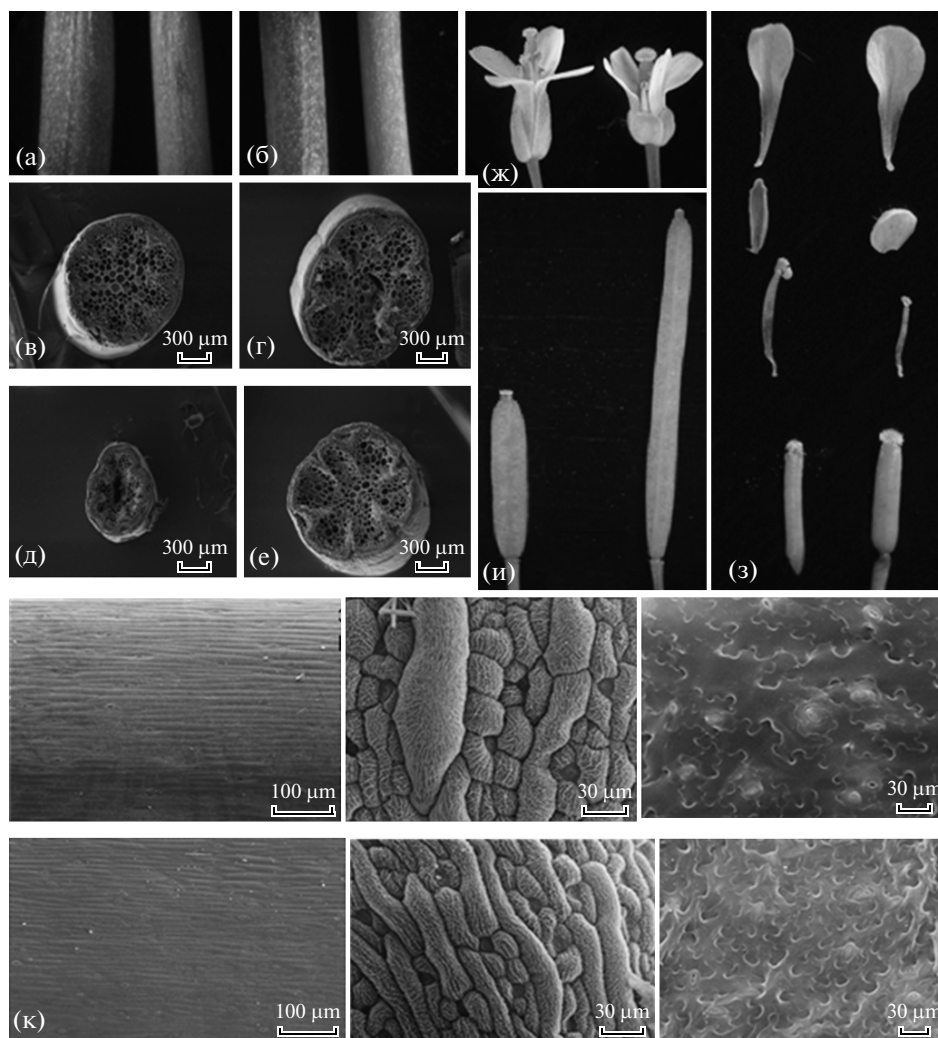


Рис. 1. Особенности морфологии мутанта *er2*. а, б — отрезки вегетативного (а) и генеративного (б) междоузлия мутанта *er2* (слева) и дикого типа (справа); в—е — поперечные срезы вегетативных междоузлий (г — дикий тип, в — *er2*) и генеративных междоузлий (е — дикий тип, д — *er2*); ж—и — зрелые цветки (ж), органы цветка (з) и стручки (и) мутанта *er2* (слева) и дикого типа (справа); к — эпидермальные клетки цветоноса (слева), чашелистика (в центре) и нижней стороны розеточного листа (справа) мутанта *er2* (верхний ряд) и растений дикого типа (нижний ряд).

у мутанта *er2* отличаются от розеточных листьев растений дикого типа более округлой формой и существенным уменьшением площади листовой пластинки за счет ее укорочения. У мутанта обнаружено также незначительное снижение числа листьев в розетке (табл. 1). Как правило, число листьев в розетке негативно коррелирует с временем зацветания. В случае мутанта *er2* такой корреляции мы не выявили — по времени зацветания он отставал от дикого типа на 5–7 дней.

Цветонос у мутанта эректоидного типа (прямостоячий), что отражено в названии мутанта. Высота цветоноса у мутанта ниже, чем у дикого типа (табл. 1), что связано с уменьшением длины вегетативных и генеративных междоузлий. В то же время, число генеративных узлов на цветоносе мутанта достоверно выше, чем у дикого типа

(табл. 1). Это объясняет причину того, что при ~2-х кратном уменьшении длины междоузлий общая высота стебля мутанта уменьшена лишь на 20% по сравнению с диким типом.

Эректоидность стебля мутанта связана не только с укорочением междоузлий, но и с их утолщением, что характерно как для вегетативных, так и для генеративных междоузлий (рис. 1а–1е).

У мутанта *er2* наблюдается изменение морфологии цветка (рис. 1ж). Эти изменения видны уже на молодых бутонах, которые всегда открыты, в отличие от закрытых бутонов дикого типа. Эта особенность связана с существенным укорочением и расширением чашелистиков у мутанта. Укорачиваются и утолщаются и все остальные органы цветка (рис. 1з), хотя тип органов цветка мутанта не изменяется. Стручки мутанта также в 1.5 раза

Таблица 2. Размер (мкм) эпидермальных клеток мутанта *er2* и растений дикого типа

Измеряемый параметр	Генотип	
	дикий тип	<i>er2</i>
Длина эпидермальных клеток стебля	195.9 ± 50.7	130.2 ± 32.1***
Ширина эпидермальных клеток стебля	13.2 ± 3.0	11.9 ± 2.7
Длина эпидермальных больших клеток чашелистика	147.5 ± 69.2	139.6 ± 61.0
Ширина эпидермальных больших клеток чашелистика	16.2 ± 4.9	53.5 ± 82.2*
Длина эпидермальных малых клеток чашелистика	34.8 ± 9.8	33.9 ± 10
Ширина эпидермальных малых клеток чашелистика	13.1 ± 3.6	22.6 ± 5.1***

короче, чем у дикого типа (рис. 1и), причем у мутанта, наряду с обычными пестиками из 2-х плодolistиков, встречались пестики из 3-х плодolistиков. В результате среднее число плодolistиков в цветке у мутанта чуть выше (2.5 ± 0.7), чем у дикого типа (2 ± 0), хотя различия средних не достоверны.

Поскольку для всех органов мутанта характерно укорочение и утолщение, с помощью сканирующей электронной микроскопии был проведен анализ морфологии эпидермальных клеток. Обнаружено, что стеблевые эпидермальные клетки мутанта короче, чем у дикого типа, а их ширина не отличается достоверно от контроля (рис. 1к, слева, табл. 2). Для эпидермальных клеток чашелистиков *er2* проведен отдельный анализ двух типов клеток — крупных и мелких. Показано, что для обоих типов клеток мутанта характерно достоверное увеличение ширины (рис. 1к, в центре), а укорочения клеток не наблюдалось или было не достоверным (табл. 2). Провести количественный анализ эпидермальных клеток листа оказалось сложным из-за их волнистых антиклинальных стенок. Тем не менее, даже качественный анализ показывает, что у мутанта наблюдалось увеличение ширины клеток (рис. 1к, справа).

Выявленные изменения параметров клеток позволяют предположить, что ген *ER2* контролирует рост и растяжение клеток в растениях дикого типа. Утрата его функции у мутанта вызывает нарушение закономерностей роста клеток. Большинство особенностей морфологии мутанта (утолщение стебля, укорочение листьев, междоузлий, органов цветка), могут быть следствием этих изменений на уровне клеток.

Поскольку нарушение растяжения клеток может быть результатом снижения уровня гиббереллина, провели изучение чувствительности мутанта *er2* к экзогенному гиббереллину. Обработка гибберелловой кислотой (GA_3) ускоряла появле-

ние цветоноса и рост стебля растений дикого типа и мутанта *er2* (рис. 2а, 2б). У обоих генотипов окраска под влиянием GA_3 становилась светлее. GA_3 приводила к незначительному увеличению размера и частичной нормализации формы листовой пластинки у мутантов *er2*. На конечном этапе развития растений длина главного стебля у мутанта *er2* не превысила под влиянием обработки GA_3 высоту растений дикого типа, не подвергавшихся обработке гормоном, т.е. гормон не смог нормализовать рост цветоноса мутанта.

Отсутствие полного восстановления фенотипа мутанта *er2* при обработке активной формой гиббереллина (у мутанта по-прежнему наблюдали более округлый, чем у дикого типа лист, утолщенный стебель, сближенные междоузлия) свидетельствует о том, что причиной морфологических изменений не является дефицит гиббереллина. Кроме того, поскольку мутант *er2* реагирует на экзогенный GA_3 так же, как растения дикого типа, можно утверждать, что изменения морфологии, в основе которых лежит нарушение роста клеток, у *er2* не связано с нарушением чувствительности к гиббереллину.

Анализ взаимодействия гена *ER2* с геном *ER*

Для изучения взаимодействия генов выявляли двойных мутантов в F_2 и F_3 поколениях от скрещивания мутанта *er2* с мутантом *er* и сравнивали их морфологические особенности с таковыми родительских форм. Для мутанта *er* из коллекции кафедры генетики МГУ, как и для *er2*, характерна эректоидная форма стебля и его укорочение за счет уменьшения длины междоузлий. У двойного мутанта наблюдалось существенное усиление проявления всех фенотипических особенностей, свойственных обоим мутантам (рис. 3а, 3б). Цветоносы двойного мутанта *er2 er* укорочены по сравнению с *er* в 4 раз и в 6 раз по сравнению с *er2*,

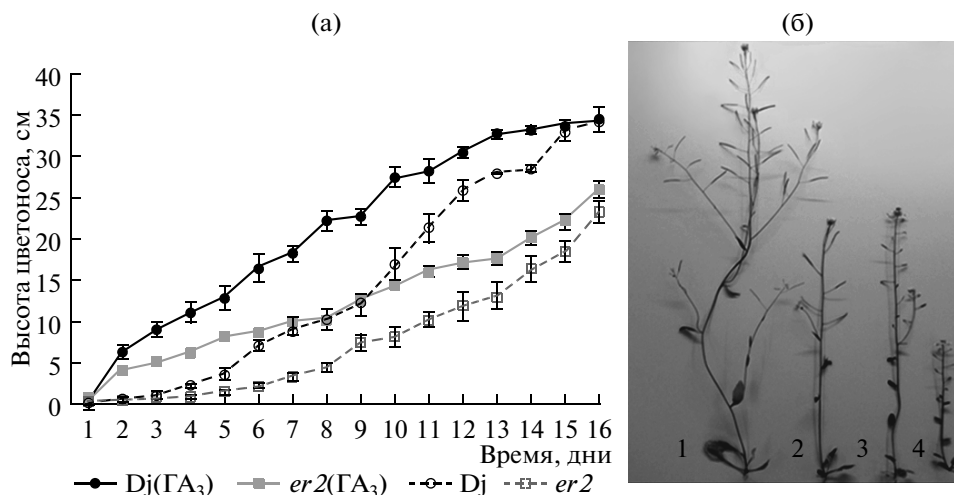


Рис. 2. Реакция растений на обработку GA_3 . а — динамика роста цветоноса растений дикого типа (Dijon-M, черные линии) и *er2* (серые линии) при обработке GA_3 (сплошные линии) и водой (прерывистые линии); б — общий вид растений одного возраста дикого типа (1, 2) и мутанта (3, 4) после обработки GA_3 (1, 3) и водой (2, 4).

также наблюдается уменьшение длины вегетативных и генеративных междоузлий (рис. 3а) и листьев. Укорочена длина и увеличена ширина органов цветка, существенно укорочены стручки (рис. 3в, 3г).

Ранее показано, что мутация *er*, как и *er2*, также изменяет размер клеток, причем влияние *er* на размер клеток зависит от типа органов — кортикальные клетки в цветоножках мутанта крупнее и их меньше (Shpak et al., 2003), а в листьях много мелких клеток (Tisné et al., 2008). Предполагается, что ген *ER* участвует в контроле растяжения клеток и продолжительности их пролиферации, координируя их поведение с онтогенетическими сигналами (Tisné et al., 2011). Поскольку по нашим данным у двойного мутанта *er er2* наблюдалось значительно более существенное укорочение линейных размеров всех органов по сравнению с родительскими формами, можно сделать вывод, что оба гена — *ER2* и *ER* комплементарно (синергистически) взаимодействуют в контроле размера всех органов побега. Такого рода генные взаимодействия чаще всего наблюдаются при взаимодействии функционально связанных генов, в том числе — паралогичных (Pérez-Pérez et al., 2009). Ранее похожий фенотип (существенное усиление карликовости, длины стручков и пр.) выявлен у мутантов, которые наряду с мутацией *er* содержали мутации в генах — паралогах *ERL1*, *ERL2*, особенно у тройных мутантов *er erl1 erl2* (Shpak et al. 2004). В связи с этим можно было предположить, что *er2* затрагивает один из этих генов, но отличается от ранее описанных мутаций *erl1* и *erl2* высокой экспрессивностью.

Генетическое картирование гена *ER2*

Известно, что оба гена *ERL* локализованы в 5-ой хромосоме. Для определения локализации в геноме гена *ER2* исследовали его сцепление с маркерами всех хромосом *A. thaliana*. Анализ поколения F_2 от скрещивания мутанта *er2* с несколькими маркерными линиями показал сцепление гена *ER2* только с маркерами нижнего плеча 1-ой хромосомы — *API* (сила сцепления составила ~29 сМ) и *CLV1* (сила сцепления ~8 сМ). Ген *API* расположен на генетической карте 1-ой хромосомы в положении 99 сМ, а положение *CLV1* на генетической карте 1-ой хромосомы — 110 сМ, значит ген *ER2* находится справа от *CLV1* в положении около 128 сМ (рис. 4). Для более точного картирования использовали CAPS-маркеры *ADH* (положение на генетической карте — 117.52 сМ, а на физической карте — 28975141–28976432 п.н.) и *G17311* (положение на физической карте составляет 30281750–30283867 п.н.). В общей сложности проведена амплификация фрагментов ДНК для 25 индивидуальных растений *er2* из F_2 поколения от скрещивания *er2* с растениями линии К-310. Из 25 мутантов 4 растения оказались рекомбинантными гетерозиготами по маркеру *ADH*. По маркеру *G17311* 2 растения оказались рекомбинантными гетерозиготами. Следовательно, расстояние *ER2* до маркера *ADH* составляет 8.7 сМ, а до *G17311* — 4.2 сМ (рис. 4). Поскольку *ER2* расположен справа от *CLV1* на расстоянии ~18 сМ, и известно расстояние между *CLV1* и *ADH* (оно составляет 7.5 сМ), исследуемый ген находится справа от маркера *ADH* в положении ~126 сМ, что находится в соответствии с данными по сцеплению с генами *API* и *CLV1*.

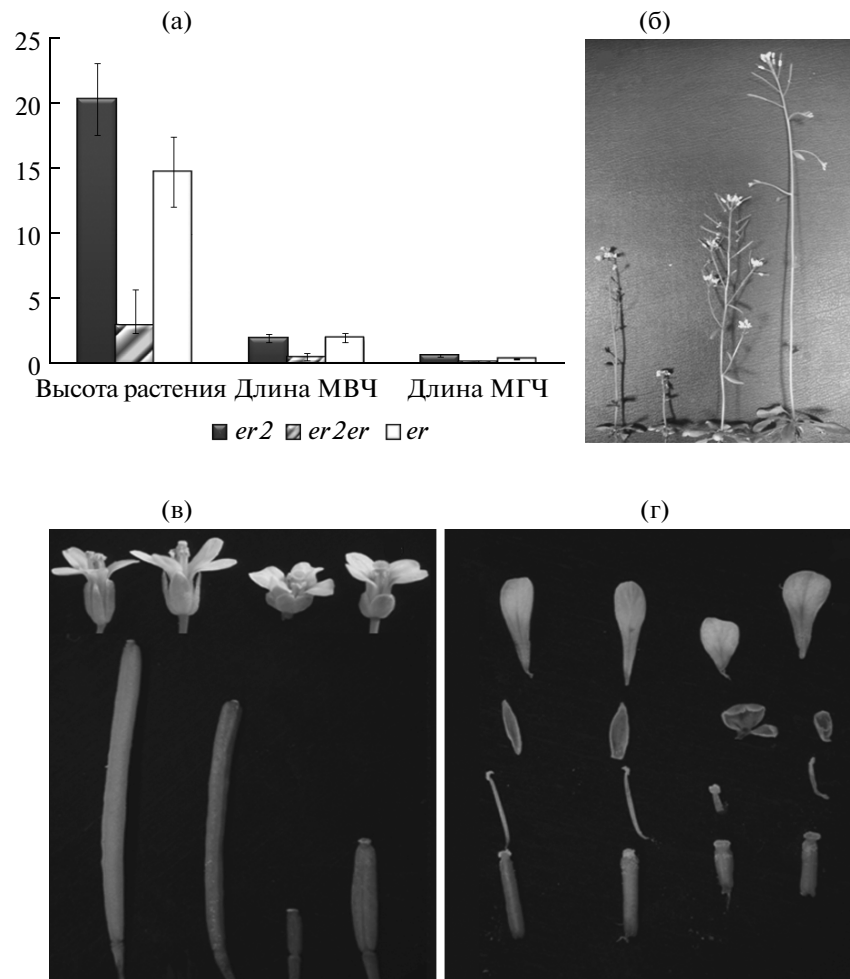


Рис. 3. Особенности развития двойного мутанта *er2 er* и родительских форм: а — сравнительный анализ общей высоты цветоноса, длины междоузлий вегетативной и генеративной частей побега (МВЧ и МГЧ, соответственно) одиночных и двойного мутантов (см); представлены среднее значения и их стандартное отклонение. Все исследованные показатели двойного мутанта достоверно ($P \geq 0.999$) отличаются от показателей мутанта *er* и *er2*; б — общий вид растений (слева—направо — *er2*, *er2 er*, *er*, дикий тип), в — цветки и стручки (слева—направо — дикий тип, *er1*, *er2 er1*, *er2*); г — типичные органы цветка (слева—направо — дикий тип, *er*, *er2 er*, *er2*).

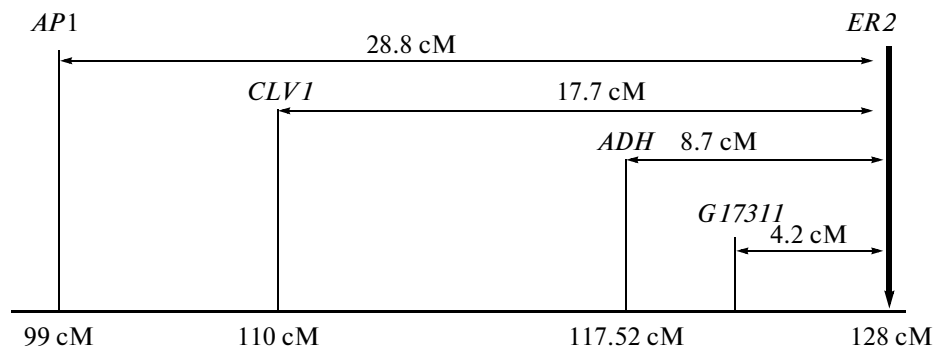


Рис. 4. Генетическая карта нижнего плеча хромосомы 1 *A. thaliana*. Снизу указано положение генов на генетической карте, сверху — экспериментально найденные расстояния до гена *ER2*.

Таким образом, ген *ER2* и гены *ERL1* и *ERL2* локализованы в разных хромосомах. Следовательно, *ER2* является еще одним новым компонентом, взаимодействующим с геном *ER*, который играет ключевую роль в межклеточном сигналинге, необходимом для координации процессов пролиферации и растяжения клеток в разных тканях развивающегося побега.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 13-04-00122-а) и федеральной целевой программой “Ведущие научные школы” (проект № НШ-376.2012.4). Электронномикроскопические исследования выполнены на оборудовании ЦКП МГУ при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ежова Т.А., Лебедева О.В., Огаркова О.А. и др. *Arabidopsis thaliana* — модельный объект генетики растений. М.: Макс-Пресс, 2003. 218 с.
- Ежова Т.А., Ондар У.Н., Солдатова О.П., Маманова Л.Б. Генетическое и физиологическое изучение карликовых мутантов *Arabidopsis thaliana* // Онтогенез. 1997. Т. 28. № 5. С. 344–351.
- Ондар У.Н., Ву Х.Ч., Ежова Т.А. Новый делеционный мутант *apetala 1-20 Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 6. С. 430–436.
- Douglas S.J., Chuck G., Dengler R.E. et al. *KNAT1* and *ERECTA* regulate inflorescence architecture in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2002. V. 14. № 3. P. 547–558.
- Etchells J.P., Provost C.M., Mishra L., Turner S.R. *WOX4* and *WOX14* act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organization // Development. 2013. V. 140. P. 2224–2234.
- Hord C.L., Sun Y.J., Pillitteri L.J. et al. Regulation of *Arabidopsis* early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the *ERECTA* and related receptor-like kinases // Molecular Plant. 2008. 1. № 4. P. 645–658.
- Koornneef M., Stam P. Procedure for mapping by using F2 and F3 population // *Arabidopsis* Inf. Serv. 1987. V. 25. P. 35–40.
- Masle J., Gilmore S.R., Farquhar G.D. The *ERECTA* gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis* // Nature. 2005. V. 436. № 7052. P. 866–870.
- Pérez-Pérez J.M., Candela H., Micol J.L. Understanding synergy in genetic interactions // Trends in Genetics. 2009. V. 25. № 8. P. 368–376.
- Ragni L., Nieminen K., Pacheco-Villalobos D. et al. Mobile gibberellin directly stimulates *Arabidopsis* hypocotyl xylem expansion // Plant Cell. 2011. V. 23. P. 1322–1336.
- Shpak E.D., Berthiaume C.T., Hill E.J., Torii K.U. Synergistic interaction of three *ERECTA*-family receptor-like kinases controls *Arabidopsis* organ growth and flower development by promoting cell proliferation // Development. 2004. V. 131. № 7. P. 1491–1501.
- Shpak E.D., Lakeman M.B., Torii K.U. Dominant-negative receptor uncovers redundancy in the *Arabidopsis* *ERECTA* leucine-rich repeat receptor-like kinase signaling pathway that regulates organ shape // Plant Cell. 2003. V. 15. № 5. P. 1095–1110.
- Shpak E.D., McAbee J.M., Pillitteri L.J., Torii K.U. Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases // Science. 2005. V. 309. № 5732. P. 290–293.
- Sun T.-P. Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in *Arabidopsis* // The Arabidopsis Book. 2008. V. 6. № 1. P. 1–28.
- Tisné S., Reymond M., Vile D. et al. Combined genetic and modeling approaches reveal that epidermal cell area and number in leaves are controlled by leaf and plant developmental processes in *Arabidopsis* // Plant Physiology. 2008. V. 148. P. 1117–1127.
- Tisné S., Barbier F., Granier C. The *ERECTA* gene controls spatial and temporal patterns of epidermal cell number and size in successive developing leaves of *Arabidopsis thaliana* // Ann. Bot. 2011. V. 108. № 1. P. 159–168.
- Torii K.U., Mitsukawa N., Oosumi T. et al. The *Arabidopsis* *ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats // Plant Cell. 1996. V. 8. № 4. P. 735–746.
- Torii K.U., Hanson L.A., Josefsson C.A.B., Shpak E.D. Regulation of inflorescence architecture and organ shape by the *ERECTA* gene // in *Arabidopsis*. In *Morphogenesis and Patterning in Biological Systems* (ed. T. Sekimura). Tokyo, Japan: Springer-Verlag, 2003. P. 153–164.
- Uchida N., Shimada M., Tasaka M. *ERECTA*-family receptor kinases regulate stem cell homeostasis via buffering its cytokinin responsiveness in the shoot apical meristem // Plant Cell Physiol. 2013. V. 54. № 3. P. 343–351.
- Uchida N., Lee J.S., Horst R.J. et al. Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 16. P. 6337–6342.
- van Zanten M., Snoek L.B., Proveniers M.C.G., Peeters A.J.M. The many functions of *ERECTA* // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. № 4. P. 214–218.
- Yokoyama R., Takahashi T., Kato A. et al. The *Arabidopsis* *ERECTA* gene is expressed in the shoot apical meristem and organ primordial // Plant J. 1998. V. 15. № 3. P. 301–310.

Study of the Effect of the Gene *ERECTA2* on the Development of *Arabidopsis thaliana* Shoot

A. D. Soltabaeva^a, U. N. Kawai-ool^b, E. V. Kupriyanov^a, and T. A. Ezhova^a

^a Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

^b Tuva State University, ul. Lenina 36, Kyzyl, 667000 Russia
e-mail: ekupriyanova@gmail.com

Received May 30, 2013; in final form, June 24, 2013

Abstract—The role of the gene *ER2* in plant development has been studied by the analysis of the *erecta2* (*er2*) mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. It was shown that the mutation *er2* provides pleiotropic effect on the development of all aboveground organs. It induces shortening and thickening of the stem, leaves and all flower organs, though it does not change the sensitivity to gibberellin. Changes in the morphology of the shoot organs are due to the changes in cell polarity. The cells get wider and shorter compared to the wild type. It was found that the gene *ER2* is located in the lower arm of the chromosome 1. It complementarily interacts with the gene *ER* that plays an important role in the control of intercellular interactions.

Keywords: shoot development, mutants, *Arabidopsis thaliana*, gene interactions

УДК 575:591.4:599.742.4

ОДОНТОЛОГИЧЕСКАЯ АНОМАЛИЯ У АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ *NEOVISON VISON* (CARNIVORA, MUSTELIDAE) И ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ЕЕ ПОЯВЛЕНИЯ

© 2013 г. П. Н. Кораблев*, М. П. Кораблев**, Н. П. Кораблев***, И. Л. Туманов****

*Центрально-Лесной государственный природный биосферный заповедник

172513 Тверская обл., Нелидовский район, пос. Заповедный

**Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

119991 Москва, Ленинский просп., 33.

***Великолукская государственная сельскохозяйственная академия

182112 Псковская обл., Великие Луки, просп. Ленина, д. 2

****Западный филиал ВНИИОЗ им. проф. Б.М. Житкова

199034 Санкт-Петербург, В.О. 1-я линия, д. 38

E-mail: cranlab@mail.ru

Поступила в редакцию 24.12.12 г.

Окончательный вариант получен 06.06.13 г.

Описывается феномен замещения у американской норки *Neovison vison* Schreber редуцированного M_2 зубом сложного строения. Аномалия отмечена на трех черепах из 574 осмотренных (0.52%) и характеризуется четкой локализацией, одинаковым строением и симметричным проявлением. Непатичные моляры имеют два корня, одинаково хорошо развитые параконид, эоконид, гипоконид и менее выраженный метаконид. Рассматриваются возможные гипотезы возникновения аномалии, в том числе: нарушение развития зубного зародыша, мутация, фенотипическое проявление генов, характерных для плезиоморфных видов куньих. Обосновывается точка зрения, что причиной обсуждаемого явления может быть “пробуждение дремлющих генов” в результате дестабилизирующего отбора и гибридного дисгенеза в зоне контакта клеточных и диких американских норок.

Ключевые слова: одонтологическая аномалия, дестабилизирующий отбор, гибридный дисгенез, *Neovison vison*.

DOI: 10.7868/S0475145013060050

Настоящая работа посвящена описанию яркой одонтологической аномалии у американской норки *Neovison vison* Schreber, частота встречаемости которой составляет менее 1%. Подобные аномалии, выходящие за рамки фенетической изменчивости и статистического анализа и граничащие с тератогенным эффектом, редко становятся предметом для специального обсуждения именно в силу низкой частоты своего проявления. Вместе с тем, встречаясь в единичном экземпляре в одних местах сбора материала, они могут проявляться с определенной частотой в других частях ареала, где ранее не отмечались, что может стать точкой отсчета для появления нового признака. Изменчивость одонтологических признаков имеет особое значение. В морфология зубов давно утвердилась четкая классификация признаков, являющаяся важным таксономическим критерием. К тому же антропологами получены строго аргументированные доказательства наличия высокого уровня

генного контроля одонтологических признаков (Зубов, Халдеева, 1989). Обнаружение в полевых условиях фрагмента челюсти с крупной зубной аномалией может поставить исследователя в тупик и привести к появлению несуществующей систематической сенсации. Актуальность хотя бы краткого описания таких аномалий, отмеченных в единичном числе при работе с сериями черепов очевидна.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Одонтологические аномалии на черепах американской норки были обнаружены в рамках сравнительного изучения фенофона популяций хищных млекопитающих (Кораблев, Кораблев и др., 2011). Тщательному осмотру подвергнуты черепа некоторых представителей семейства *Mustelidae* и *Canidae* из фондов Центрально-Лесного заповедника. Всего изучено 2579 черепов семи

видов, в том числе: европейская норка *Mustela lutreola* L. — 110 экз., американская норка *Neovison vison* — 574, лесной хорь *Mustela putorius* L. — 365, лесная куница *Martes martes* L. — 441, енотовидная собака *Nyctereutes procyonoides* Gray — 498, лисица *Vulpes vulpes* L. — 311, волк *Canis lupus* L. — 280. Материал собран преимущественно в Тверской области и частично на территориях Смоленской, Псковской, Новгородской и Ярославской областей, примыкающих к Тверской области. При регистрации неметрических вариаций краниологических признаков, в том числе отмечалась изменчивость строения зубов. Для относительной оценки степени влияния естественного отбора или направленной селекции на вариабельность пластических признаков у американской норки были рассчитаны коэффициенты вариации (Яблоков, 1966) для тринадцати размерных характеристик. Измерено 204 черепа американской норки в возрасте более 1 года, из них 52 черепа принадлежат клеточным животным из зверохозяйства “Знаменское”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для настоящей работы представляет большой интерес короткое сообщение американских исследователей, описавших редкую одонтологическую аномалию у американской норки из графства Нокс штата Теннесси (Parmalee, Bogan, 1977). Оно примечательно тем, что обнаруженные нами зубные аномалии на черепах двух американских норок из Тверской области (Кораблев и др., 2010а) были аналогичны описанной цитируемыми авторами. Дальнейший сбор и изучение материала позволили обнаружить такую же аномалию еще на одном черепе. Таким образом, из осмотренных нами 574 черепов американской норки аномальное строение M_2 отмечено на трех, что составляет 0.52%. Животные добыты в 2002–2005 годах в разных районах, расстояние между которыми около 200 км. При этом с 1985 по 2001 год включительно, то есть до обнаружения первого черепа с аномалией, в юго-западной части Тверской области нами было собрано 209 черепов с нормальным строением зубов на нижней челюсти. Кроме относительно узкого временного периода регистрации, аномалии примечательны четкой локализацией, схожестью строения и симметричным проявлением на челюстях. Все это делает актуальным не только описание данного феномена, но и обсуждение возможных причин его возникновения.

Как известно, последние моляры у американской норки сильно редуцированы, имеют по одному корню, простое строение коронки и своими размерами не превышают дистальную треть M_1 . Редукция крайних зубов на нижней челюсти является общей эволюционной тенденцией для хищных млекопитающих. Нередки случаи олиго-

донтии — врожденного отсутствия первых премоляров и последних моляров. На черепе американской норки № 3.210.1 (взрослый самец, добыт в охотничий сезон 2002–2003 гг. в Удомельском районе Тверской области) при нормальной зубной формуле последние нижние моляры замещены на зубы сложного строения, имеющие по два корня, одинаково хорошо развитые параконид, эоконид, гипоконид и менее выраженный метаконид (рис. 1, 2). Терминология приводится по номенклатуре Г. Вандербрёка и Ф. Херскоффа (Vanderbroek, 1961; Hershovitz, 1979 из Зубов, Халдеева, 1989). Это важно отметить, поскольку в статье американских исследователей (Parmalee, Bogan, 1977) названия элементов коронки приводится по старой терминологии Осборна (Зубов, Халдеева, 1989), где эоконид назван протоконидом. Нетипичный зуб своими размерами лишь незначительно уступает M_1 и, поскольку сформировался на нижней челюсти нормального размера не помещается на поверхности ее тела и своим дистальным корнем располагается на челюстной ветви таким образом, что его окклюзивная (жевательная) поверхность расположена под углом примерно 45° по отношению к другим зубам. При этом мезиальный корень смещен лингвально и полностью заходит за дистальный корень M_1 .

На черепе № 3.341.1 (молодой самец, добыт в охотничий сезон 2005–2006 гг. в Оленинском районе Тверской области) аномальные зубы имели аналогичное строение с чуть менее выраженным метаконидом, чем на черепе № 3.210.1.

В целом сходная аномалия, но с еще меньше выраженным метаконидом, отмечена и на черепе № 3.1.7 (взрослая самка, добыта в ноябре 2004 года в Холмском районе Новгородской области). В данном случае при симметричных коронках зубов проявилось асимметричное строение корней (рис. 1а, 1б). Правый M_1 имеет два самостоятельных корня, в то время как у левого M_1 корни с вестибулярной стороны соединены костной перегородкой, а с лингвальной стороны имеется дополнительный корешок. Подобные вариации одонтологических признаков встречаются у хищных млекопитающих с разной частотой и использовались нами для характеристики степени и структуры фенетического разнообразия их популяций.

В зарубежной литературе нам удалось найти три сообщения о замещении нормального M_2 на увеличенные зубы сложного строения у видов рода *Mustela*, близких к американской норке. Подобная аномалия описана для ласки *Mustela nivalis* L. из Норвегии (Mazak, 1974) и Польши (Wolsan, 1983), а также лесного хоря из Нидерландов (Hoekstra, 1975). Вместе с тем, в работе, посвященной изучению изменчивости зубов у хоря из Польши, при осмотре большой выборки черепов

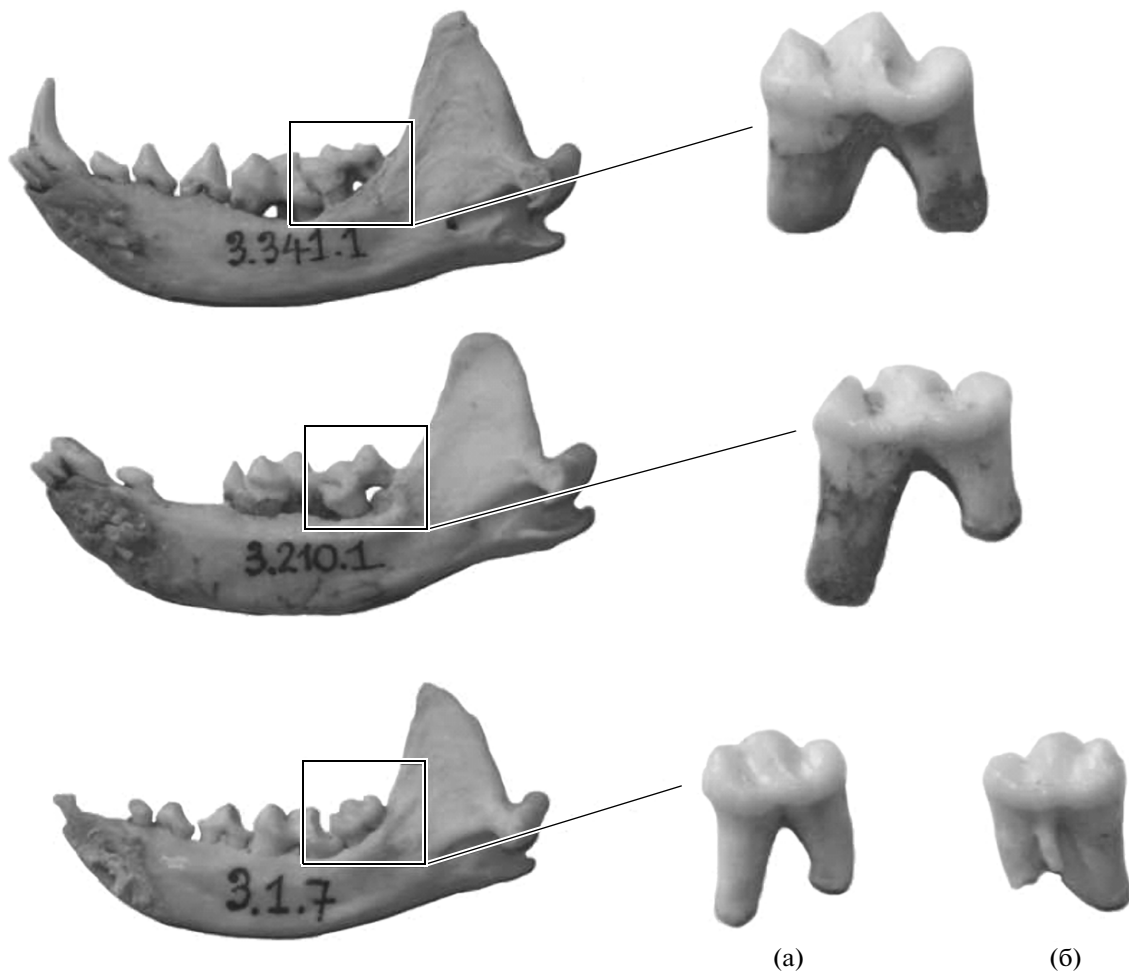


Рис. 1. Нижние челюсти и аномальные M_2 американских норок. Лингвальный вид.
а — правый M_2 , б — левый M_2 .

($n = 801$) не обнаружено аномального M_2 (Ruprecht, 1978), что подчеркивает редкость таких событий. Таким образом, осмотренные нами черепа хищных млекопитающих и литературные данные свидетельствуют, что обсуждаемая аномалия характерна исключительно для представителей семейства куньих *Mustelidae*.

Обсуждение цитируемыми авторами причин проявления аномалии позволяет констатировать, что существует разные точки зрения на природу ее возникновения. Большинство авторов придерживаются гипотезы, что сложное строение коронки и два корня у M_2 являются результатом фенотипического выражения генов, характерных для предков современных представителей семейства куньих, и лишь изредка проявляющихся у живущих разновидностей рода *Mustela* (Mazak, 1974; Wolsan, 1983). Американские исследователи (Parmalee, Bogan, 1977), не высказывая собственную позицию, приводят все точки зрения и, в том числе, ссылаются на мнение Г.Симпсона (по Mazak, 1974), который изучал череп ласки из

Норвегии и выразил мнение, что это мутация или аномалия, связанная с развитием, при которой область роста зубов в зубном ряду простиралась назад больше, чем характерно в нормальном состоянии.

В распоряжение Г. Симпсона был один череп с одонтологической аномалией и взгляд на ее природу как на онтогенетическое нарушение был столь же правомочен, как и остальные гипотезы. Однако нам известны четыре случая одинаковых аномалий на черепках американской норки, а также аналогичные аномалии на черепках ласки и хорь, которые характеризуются схожим строением, отличием от других зубов, симметричным проявлением и географической разобщенностью. Для этого нужны гораздо более серьезные предпосылки, чем просто наследственная предрасположенность к нарушению развития зубного зародыша. Подобные нарушения в виде появления дополнительных зубов в результате частичного или полного расщепления зубного зародыша (Wolsan, 1984) мы многократно наблюдали на черепках хищ-

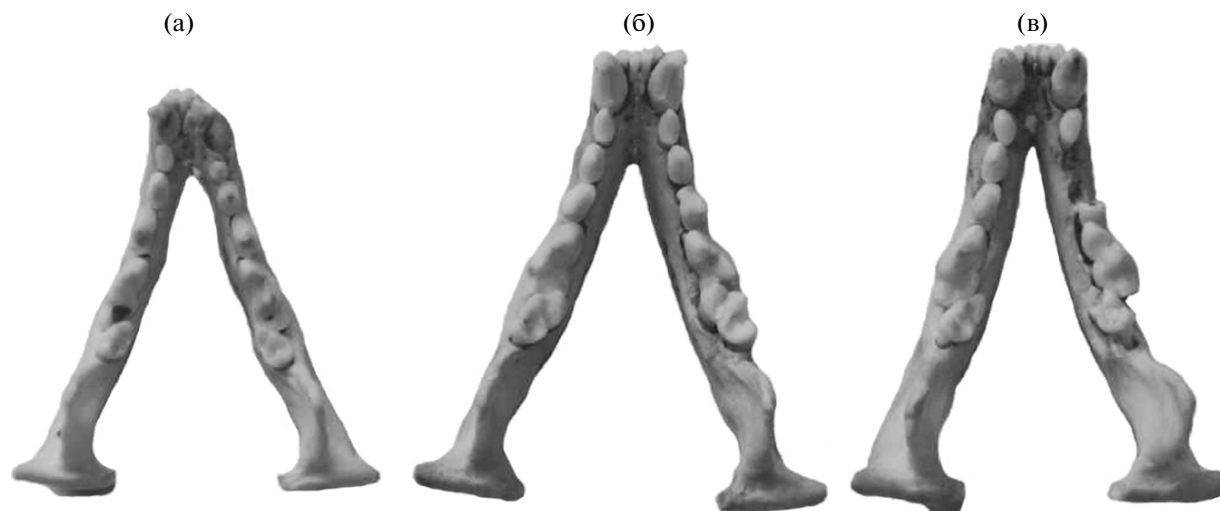


Рис. 2. Нижние челюсти американских норок с аномальными M_2 . Акклюзивный вид.
а — череп № 3.1.7, б — череп № 3.341.1, в — череп № 3.210.1.

ных млекопитающих и особенно волка. Такие зубы могут появляться в любой зубной аркаде, хотя чаще отмечаются рядом с первыми премолярами на обеих челюстях или позади последних моляров на нижней челюсти. По строению они являются копиями соседних зубов и могут возникать даже вне зубного ряда или между коренными зубами перпендикулярно направлению зубного ряда. По нашим данным частота полиодонтии у волка в разных популяциях может колебаться от 1.8% до 18.8% (Кораблев, Кораблев и др., 2010б), то есть проявляется с частотой гораздо большей, чем замещение редуцированных моляров зубами сложного строения. Кроме того, асимметричное проявление полиодонтии встречается гораздо чаще, чем симметричное. Все это делает гипотезу возникновения одонтологических аномалий у американской норки, как следствие нарушения развития зубного зародыша наименее состоятельной.

Современные представления о хромосомных мутациях допускают возможность возникновения в разных частях ареала гомологичных aberrаций в популяциях млекопитающих (Воронцов, 1988). Вирусные заболевания могут способствовать резкому возрастанию частоты хромосомных мутаций (Воронцов, 1975) и здесь важно отметить, что среди клеточных и диких американских норок широко распространена хроническая вирусная инфекция алеутской болезни, в том числе в районе сбора материала (Маньяс, Сенья и др., 2002). Однако вирусная гипотеза, допуская возможность возникновения одонтологической аномалии в данной части ареала, вряд ли удовлетворительно объясняет появление сходной аномалии у разных видов и у американской норки на разных континентах.

Для понимания причин возникновения аномалии у американской норки важное значение имеют работы Д. Беляева (1972, 1977, 1979) по селекции серебристо-черных лисиц на доместикационный тип поведения. Оказалось, что связанный с селекцией стресс в короткие сроки резко повышал наследственную изменчивость и дестабилизировал системы онтогенеза. Селекцию на стрессоустойчивость Д. Беляев назвал дестабилизирующим отбором, в результате которого может происходить активация “дремлющих генов” и инактивация генов, до сих пор активно функционирующих. А. Зубов и Н. Халдеева (1989) высказали мнение, что “... это, возможно, позволило бы объяснить некоторые явления в области морфологии зубной системы человека, как бы выпадающие из общей картины редукиции, но в то же время, несомненно, с ней связанные” (стр. 46). Как известно, американская норка на протяжении многих поколений (около 100 лет) подвергается искусственному разведению и селекции по величине, плодовитости и поведению. Сравнительный анализ результатов измерения черепов условно диких и клеточных норок (рис. 3) показал, что диапазон изменчивости краниометрических показателей у них различается, коэффициент вариации доместичированных норок несколько выше. В абсолютном выражении эти различия невелики, но тенденция проявляется вполне отчетливо, особенно у самок. Повышенный уровень изменчивости клеточных норок свидетельствует об определенной дестабилизации их генома. При этом надо иметь в виду, что среди так называемых диких норок присутствуют беглые норки из зверохозяйств (Бобров и др., 2008; Данилов, 2009), которые, гибридизируясь с вольно живущими, способствуют увеличению диапазона

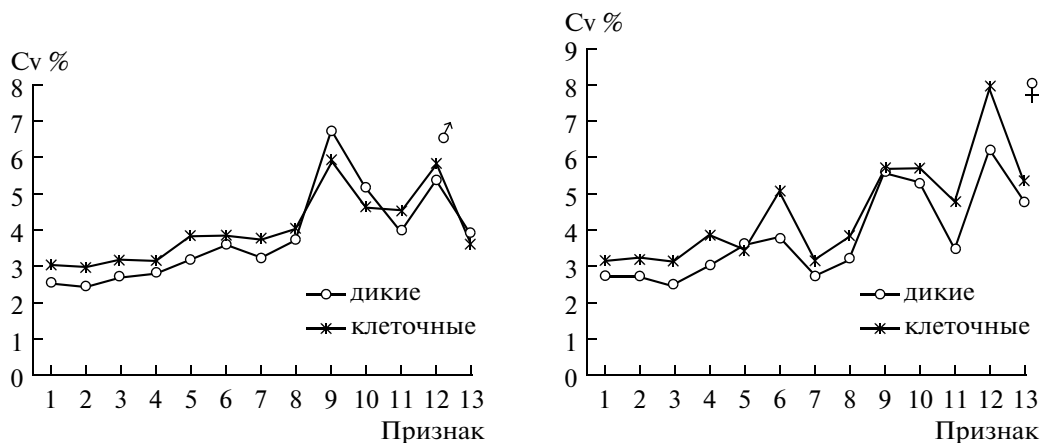


Рис. 3. Изменчивость коэффициента вариации краниологических признаков диких и клеточных норок.

изменчивости признаков последних, что ведет к нивелировке различий. Уверены, что если бы была возможность сравнить данные показатели клеточных норок с истинно дикими, то различия были бы еще убедительнее.

Версия, связывающая появление одонтологической аномалии с дестабилизирующим отбором и мобилизацией “дремлющих” генов, нам представляется наиболее логичной. Вместе с тем, на черепах осмотренных нами клеточных норок не было обнаружено никаких аномалий, что, с одной стороны, может объясняться незначительным объемом выборки и, с другой стороны, свидетельствовать о редкости таких событий и при доместикации. Необходимо иметь в виду и то, что именно зоны гибридизации отличаются повышенной морфо-генетической изменчивостью (Майр, 1974). Гибридизация доместичированных норок, подвергавшихся направленной селекции на протяжении многих поколений, с дикими, в какой-то степени, аналогична скрещиванию лабораторной и природной линий *Drosophila melanogaster*, в результате чего было открыто явление гибридного дисгенеза (Kidwell, 1977 по Кайданов, 1996). Несовместимость геномов, объединяемых в гибридном потомстве, может приводить к масштабным изменениям, сопоставимым с системными мутациями (Алтухов, Рычков, 1972; Назаров, 2007). Сравнительный анализ фенофона разных выборок черепов американской норки показал, что в районе сбора материала происходит контакт двух морфологически различающихся форм зверей: более крупных потомков беглецов из зверосовхозов и относительно мелких вольно живущих норок, выпущенных в природу в 30-х годах прошлого века (М. Кораблев и др., 2012). Полагаем, что это является наиболее аргументированным объяснением того, что именно у американской норки одонтологическая анома-

лия проявляется не в единичном экземпляре, а с определенной частотой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Есть основания считать, что у морфологически близких представителей семейства куньих сохраняется потенциальная возможность проявления плезиоморфных признаков, характерных для предковых форм. Единичные случаи замещения редуцированного M_2 зубами сложного строения у ласки и лесного хоря свидетельствуют о крайней редкости этих событий в природных популяциях. Увеличение частоты проявления одонтологической аномалии у американской норки можно объяснить нарушением генетической коадаптации в результате дестабилизирующего отбора и гибридного дисгенеза. Обнаружение сходной аномалии у самцов и самки американской норки в пределах изучаемой территории позволяет допустить возможность получения потомства от ее носителей с трудно прогнозируемыми последствиями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алтухов Ю.П., Рычков Ю.Г. Генетический мономорфизм видов и его возможное биологическое значение // Ж. общ. биол. 1972. Т. 33. № 3. С. 281–30.
- Беляев Д.К. Генетические аспекты доместикации животных // Проблемы доместикации животных и растений. Ред. Б.С. Матвеев. М.: Наука. 1972. С. 39–45.
- Беляев Д.К. К проблеме дестабилизирующего отбора // Фундаментальные исследования. Биологические науки. Ред. А.Б. Жуков. Новосибирск: Наука. 1977. С. 117–120.
- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор как фактор изменчивости при доместикации животных // Природа. 1979. № 1. С. 36–45.
- Воронцов Н.Н. Роль вирусов в видообразовании животных // Природа. 1975. № 4. С. 107.

- Воронцов Н.Н. Постепенное или внезапное видообразование: “или—или” или “и—и”? // Дарвинизм: история и современность. Л.: Наука. 1988. С. 87–103.
- Данилов П.И., Туманов И.Л. Куньи Северо-Запада СССР. Л.: Наука. 1976. 356 с.
- Данилов П.И. Новые виды млекопитающих на Европейском Севере России. Петрозаводск: КАРНц РАН. 2009. 308 с.
- Зубов А.А., Халдеева Н.И. Одонтология в современной антропологии. М.: Наука. 1989. 231 с.
- Кайданов Л.З. Генетика популяций. М.: Высшая школа. 1996. 320 с.
- Кораблев М.П., Кораблев П.Н., Рожнов В.В. Редкая одонтологическая аномалия у американской норки *Neovison vison* // Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследовании молодых ученых. Мат. Конф. молодых сотрудников и аспирантов Ин-та проблем экологии и эволюции им. Северцова РАН. М.: Тов. научных изд. КМК. 2010а. С. 169–172.
- Кораблев Н.П., Кораблев М.П., Кораблев П.Н. Эколого-географические предпосылки формирования морфологического своеобразия млекопитающих в Дарвинском заповеднике // Сборник материалов I Всероссийской научно-практической заочной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. Чебоксары. 2010б. С. 64–65.
- Кораблев П.Н., Кораблев М.П., Кораблев Н.П. Оценка состояния популяций хищных млекопитающих в зоне влияния Калининской АЭС на основе анализа их фенофона // Экология. 2011. № 4. С. 272–279.
- Кораблев М.П., Кораблев Н.П., Кораблев П.Н. Морфо-фенетический анализ популяций американской норки (*Neovison vison*) Каспийско-Балтийского водораздела // Российский журнал биологических инвазий. 2012. № 4. С. 36–56.
- Майр Э. Популяции, виды и эволюция. М.: Изд-во “Мир”. 1974. 460 с.
- Маньяс С., Сенья Х.К., Палазан С. и др. Идентификация парвовирусных инфекций алеутской болезни норки среди диких европейских околотовных куньих // Второе рабочее совещание по европейской норке (*Mustela lutreola* L.). Нелидово. 2002. С. 61–62.
- Назаров В.И. Эволюция не по Дарвину. Смена эволюционной модели. 2007. М. Изд-во ЛКИ. 519 с.
- Яблоков А.В. Изменчивость млекопитающих. М.: Наука. 1966. 263 с.
- Mazak V. Anomalies of the second lower molars in *Mustela nivalis nivalis* Linnaeus, 1766 (Mammalia; Mustelidae) // Nytt Mag. Zool., Univ. Oslo Mus. Contribution. 74. P. 24–29.
- Parmalee P. W., Bogan A.E. An unusual dental anomaly in a mink // J. Tenn. Acad. Sci. 1977. 52. № 53. P. 115–116.
- Ruprecht F.L. Dentiti Variations in the Common Polecat in Poland // Acta Theriologica. 1978. V. 23. № 12. P. 239–245.
- Wolsan M. Ancestral characters in the weasel *Mustela nivalis* L. (Carnivara, Mustelidae) // Ann. Zool. Fennici. 1983. 20. 47–51. P. 47–51.
- Wolsan M. The origin of Extra Teeth in Mammals // Acta Theriologica. 1984. V. 29. 10. P. 128–133.

Odontologic Anomaly in the American Mink *Neovison vison* (Carnivora, Mustelidae) and Possible Reasons for Its Appearance

P. N. Korablev^a, M. P. Korablev^b, N. P. Korablev^c, and I. L. Tumanov^d

^a Central Forest State Nature Biosphere Reserve, Zapovednyi village, Tver oblast, 172513 Russia

^b Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 33, Moscow, 119991 Russia

^c Velikie Luki State Agriculture Academy, Lenina prosp. 2, Velikie Luki, 182112 Russia

^d Western Branch, Zhitkov All-Russia Scientific Research Institute of Hunting and Animal Breeding, V.O., 1st Line 38, St. Petersburg, 199034 Russia

e-mail: cranlab@mail.ru

Received December 24, 2012; in final form, June 6, 2013

Abstract—The paper describes the phenomenon of substitution of the reduced M₂ with a tooth of a complex structure in the American mink *Neovison vison* Schreber. The anomaly is observed on three skulls out of the 574 examined (0.52%) and is characterized by a clear localization, identical structure, and symmetrical manifestation. Atypical molars have two roots, equally well-developed paraconid, eokonid, hypoconid, and a less pronounced metaconid. Some possible hypotheses for the anomaly that are considered include disruption in the development of the dental germ, mutation, and phenotypic expression of genes that are characteristic of plesiomorphic species of mustelids. The substantiated viewpoint is that the cause of this phenomenon may be the “awakening of dormant genes” as a result of destabilizing selection and hybrid dysgenesis in the area of contact of farm and feral American minks.

Keywords: odontologic anomaly, destabilizing selection, hybrid dysgenesis, *Neovison vison*

УДК 597.553.2:575.858

НАРУШЕНИЕ РАЗВИТИЯ ГОНАД КАРЛИКОВЫХ САМОК И ПОНИЖЕННАЯ ВЫЖИВАЕМОСТЬ ИХ ПОТОМСТВА КАК ПРИЧИНЫ РЕДКОСТИ ЖИЛЫХ ПОПУЛЯЦИЙ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (*SALMO SALAR* L.)

© 2013 г. А. А. Махров, М. В. Пономарева*, О. В. Хаймина**, В. Е. Гилепп***, О. В. Ефимова***, Т. А. Нечаева***, Т. И. Василенкова***

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
119071 г. Москва, Ленинский проспект, д. 33*

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
119991 г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы*

*** Российский государственный гидрометеорологический университет
195196 Санкт-Петербург, Малоохтинский пр., д. 98*

**** Выгский рыболовный завод ФГУ «Карелрыбвод»
186530 Республика Карелия, Беломорский район, пос. Сосновец
E-mail: makhrov12@mail.ru*

Поступила в редакцию 28.04.13 г.
Окончательный вариант получен 13.06.13 г.

Определена плодовитость и масса икринок, а также выживаемость потомства искусственно выращенных мелких (массой менее 406 грамм) самок атлантического лосося. Показано, что абсолютная плодовитость и масса отдельных икринок этих рыб были существенно меньше, чем у проходных производителей. Для мелких самок также характерна задержка нереста; гистологический анализ выявил значительную асинхронность в развитии ооцитов у некоторых особей. Выживаемость потомства мелких самок на ранних стадиях развития существенно ниже, чем у проходных самок. Наши наблюдения полностью согласуются с литературными данными. Предполагается, что из-за пониженной воспроизводительной способности карликовых самок атлантического лосося они не выдерживают внутривидовой и межвидовой конкуренции. Это объясняет редкость природных популяций этого вида, представленных карликовыми (пресноводными) формами.

Ключевые слова: гонады, эксперимент, рыбы, икра, гистологический анализ.

DOI: 10.7868/S0475145013060074

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия изучение экологических форм (жизненных стратегий) дало очень много для понимания процесса эволюции: оказалось, что относительно небольшие различия в темпе роста особей могут привести к значительной дивергенции их экологии и морфологии (монографии: Лебедев, 1967; Алеев, 1986; Мина, 1986; Roff, 1992; Stearns, 1992; Schluter, 2000; Дгебуадзе, 2001; West-Eberhard, 2003; Медников, 2005). Закрепление таких различий на генетическом уровне может привести к возникновению новых таксонов, но проблема стабилизации видовых признаков, хотя и поставлена (Северцов, 2008), еще далека от окончательного решения.

Лососевые рыбы — прекрасный модельный объект для изучения эволюции жизненных стра-

тегий (обзоры: Hendry et al., 2004; Павлов, Савваитова, 2008; Кузишин, 2010; Jonsson, Jonsson, 2011). Кроме того, эти рыбы — ключевые компоненты экосистем, важные объекты промысла, спортивного рыболовства и товарного выращивания. Поэтому изучение закономерностей эволюции экологических форм этих видов крайне важно для сохранения и восстановления структуры природных и искусственно поддерживаемых популяций, а также управления ростом и созревaniem выращиваемых рыб.

Атлантический лосось интересен как пример уменьшения экологической пластичности по сравнению с предковым видом — кумжей, *Salmo trutta* (Zarnecki, 1960; Махров, 2005). Этот вид включает четыре экологических формы: проходную и три пресноводных (landlocked) — озерно-речную, жи-

Находки карликовых самок атлантического лосося в природе (в скобках — средние значения)

Водоем (* — отдельные рыбы)	Возраст	Длина АВ (*АС), мм	Масса, гр	Абсолютная плодовитость	Диаметр икры, мм	Ссылки
Река Namsen, Норвегия	3+...5+	(176)	—	55–190 (95)	(5.0)	Berg, Gausen, 1988
	3+...6+			36–360 (131)	—	Thorstad et al., 2009
Candlestick Pond, Ньюфаундленд	5	(~200*)	118.6	(182.1)		Barbour et al., 1979
Ouananiche Beck, Ньюфаундленд	2+...4+	*84–123 (102)	(17.03)	(33.0)	(4.5)	Gibson et al., 1996
Long Beach River, Ньюфаундленд	3+...4+	(111.7)	(20.56)	(34.7)	(4.7)	Gibson et al., 1996
river Fuglestadåna, Норвегия*	3.	188	—	—	5.8	Hindar, Nordland, 1989
river Otava (бассейн Эльбы)*	3+	245	—	—		Oliva, Johal, 1981
Elorn river, Франция*	3.	225	150	264	5.5–6.1 (5.8)	Prouzet, 1981
river Scorff, Франция*	1+	*211	—	158		Bagliniere, Maisse, 1985
	1+	*150, 164, 170, 175	—	—	—	
	2+	*192	—	163		

люю озерную и жилую речную (монография: Смирнов, 1979). Однако, число популяций, представленных разными формами, очень различно.

Большинство популяций вида включает проходную форму — самцов и самок, проводящих в море одно или несколько лет, и карликовых самцов, созревающих в реке, без миграции (обзор: Fleming, 1996). Следует отметить, что некоторые карликовые самцы после первого нереста могут выжить, мигрировать в море и вернуться на нерест как проходные особи (см. ссылки в работе: Saunders et al., 1994).

Значительно реже встречаются популяции, представленные особями, мигрирующими на нагул не в море, а в большое озеро (озерно-речная форма), а также карликовыми самцами. В Европе известно несколько таких популяций, точно установлено их наличие в озерах Ладожском, Онежском, Сегозере, Выгозере, Нюк, Куйто (Россия), Венерн (Швеция) и Сайма (Финляндия), системах норвежских рек Otra и Nidelva (обзоры: Смирнов, 1979; Berg, 1985). В Северной Америке озерно-речная форма более многочисленна, счет пресноводных популяций идет на сотни (Kendall, 1935; MacCrimmon, Gots, 1979; Verspoor et al., 2007).

Следует отметить, что, видимо, часть упомянутых выше североамериканских популяций представлена особями, рождающимися и проводящими всю жизнь в небольших озерах (озерная жилая форма). Такие популяции достоверно известны в озерах Ньюфаундленда (Couturier et al., 1986;

Cowan, Baggs, 1988; Verspoor, Cole, 2005); в озере нерестится и часть особей лосося системы реки Otra (Dahl, 1927).

И, наконец, крайне редки популяции атлантического лосося, включающие только созревающих в реке карликовых самок и самцов (речная жилая форма). Такие популяции известны выше водопадов в норвежской реке Намсен (Berg, 1953; Berg, Gausen, 1988; Thorstad et al., 2009) и одной из малых рек в системе реки Bristol Cove, Ньюфаундленд (Gibson et al., 1996).

Кроме того, карликовые самки единично встречаются в популяциях, представленных проходной формой (таблица). В некоторых случаях видовая принадлежность карликовых самок подтверждена с помощью генетического анализа (Hindar, Nordland, 1989; Moore, Riley, 1992). Кроме указанных в таблице фактов поимок карликовых самок, упоминание о существовании подобных особей, но без подробного описания, есть в некоторых старых работах (Yarrell, 1836, p. 48; Shaw, 1840).

Причины редкости пресноводных популяций атлантического лосося точно не выяснены. А.Г. Черницкий (1986) указывает две возможные причины редкости карликовых самок атлантического лосося. Одна из них — крупным самкам легче строить гнезда, чем карликовым. Однако, самки близкого вида — кумжи (*Salmo trutta*) также обычно строят гнезда, но карликовые самки кумжи — очень распространенное явление (обзор:

Кузищин, 2010). Мелкие самки обоих видов могут нереститься без строительства гнезд (Couturier et al., 1986; Кузищин, 2010).

В то же время, второе предположение А.Г. Черницкого (1986) — что более мелкие самки дают и более мелкую икру, из которой выходят более мелкие и поэтому менее жизнеспособные личинки — представлялось нам весьма перспективным; оно и было проверено и подтверждено в ходе данного исследования.

Пресноводные популяции атлантического лосося в настоящее время находятся под угрозой исчезновения, они занесены в “Красную книгу Российской Федерации” (2001). Сбор представительных выборок особей из этих популяций невозможен. Поэтому в настоящей работе нами описываются особенности развития гонад и изучается выживаемость потомства экспериментально полученных самок атлантического лосося, по размерам соответствующих самкам карликовых — речной и озерной форм.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Краткая характеристика популяции атлантического лосося реки Кереть. Река Кереть расположена на западном побережье Белого моря (Республика Карелия, Россия). В одном километре от устья реки (в начале Морского порога) функционирует рыбоучетное заграждение (РУЗ). Максимальная учетная численность производителей (1983 год) составляет 4660 экземпляров, минимальная (1997 год) — 180 экземпляров (Щуров, 1998; данные Выгского рыбоводного завода).

С начала 1990-х годов, в связи с инвазией опасного паразита *Gyrodactylus salaris*, отмечено резкое падение численности этой популяции (Иешко и др., 2008). Снижение численности сопровождалось сильным изменением генетической структуры популяции — в основном в результате отбора на устойчивость к паразиту, хотя дрейф генов и гибридизация с кумжей (*Salmo trutta*) также имели место (Артамонова и др., 2011). Таким образом, сохранение генофонда этой популяции весьма актуально.

Искусственное воспроизводство атлантического лосося Керети. С 1967 года популяция реки Кереть частично поддерживается путем искусственного воспроизводства молоди на Выгском и Кемском рыбоводных заводах. Производителей для заводов (как диких, так и заводского происхождения) ежегодно отлавливают на РУЗе (обычно не менее 100 особей). В период, когда рыбоводные работы только начинались, в Кереть иногда выпускали молодь, полученную от производителей других рек, однако уже более трех десятилетий сюда вселяют только потомков производителей керетской популяции (данные Выгского рыбоводного завода; Артамонова, Махров, 2005).

Формирование маточного стада на Выгском рыбобоводном заводе. Впервые маточное стадо атлантического лосося было создано на Выгском рыбобоводном заводе еще в 1970-х годах. Потомство от производителей из этого маточного стада получено в 1980 году (Крамаренко и др., 2002).

Этот эксперимент был повторен в 1998 году, когда на заводе была оставлена группа двухгодовиков атлантического лосося, полученных от производителей из Керети. Производители, в отличие от племенных хозяйств, выращивались в стандартных рыбобоводных бассейнах (2 × 2 м). Рыбы кормились гранулированными кормами для производителей, в соответствии с навеской.

Самки из этой группы рыб созрели на пятом году жизни, осенью 2000 года (Крамаренко и др., 2002). Потомков этих рыб (второе поколение маточного стада) также выращивали на рыбобоводном заводе. Только 1/3 часть молоди была оставлена на заводе после первого года, это были самые крупные рыбы. В настоящей работе изучено созревание самок второго и третьего поколений, выращенных на Выгском рыбобоводном заводе, и выживаемость на ранних стадиях развития рыб четвертого поколения.

Сбор материала. Нами фиксировалась дата созревания самок маточного стада, у 31 особи определена рабочая плодовитость. В период нереста мы забивали часть рыб, определяли их длину (АС) и массу (изучено 57 особей). У самок также подсчитывали абсолютную плодовитость, оценивали среднюю массу икринки у каждой самки, были взяты пробы гонад для гистологического анализа (фиксированы в жидкости Буэна). Мы вынуждены были ограничить объем изучаемых выборок из-за небольшого числа производителей в маточном стаде.

С момента оплодотворения икры до перехода на внешнее питание ежедневно собирали и подсчитывали погибшие икринки и личинок. Для контроля использовали аналогичные показатели потомства диких производителей из реки Кереть.

Гистологический анализ. Изучено 10 самок. Обработка проводилась по стандартным методикам: гонады фиксировали в жидкости Буэна, заливали в парафин и срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали железным гематоксилином по Генденгайну (Роскин, 1951; Микодина и др., 2009). Стадии зрелости оценивали по шкале, предложенной И.Г. Мурзой и О.Л. Христофоровым (1991).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Особенности созревания экспериментальных самок. Среди нескольких рыб из второго поколения маточного стада, погибших весной 2005 года, была обнаружена одна созревшая самка, длиной 25.0 см и массой 176.7 г. Таким образом, эта рыба созрела на четвертом году жизни.



Рис. 1. Особь из маточного стада, созревшая в 2010 году.

Однако в массе самки второго поколения маточного стада созрели на пятом году жизни. Нерест проходил с 31 октября по 2 ноября 2005 года. Производители атлантического лосося из реки Кереть нерестились в этом году с 13 по 21 октября.

На анализ было взято 27 самцов и 22 самки из маточного стада. Длина тела самцов составила 22.0–36.4 см, в среднем 29.7 см, масса 122–412 г, в среднем 285.9 г. Длина тела самок составила 27.5–34.1 см, в среднем 30.5 см, масса тела 228–406 г, в среднем 315.5 г. Абсолютная плодовитость самок маточного стада составила 354–1025 шт., в среднем – 629.8 шт. икринок. Средняя масса икринок была 75–129 (в среднем 102.4) мг.

В ноябре 2009 г., на четвертом году жизни, созрели некоторые самки третьего поколения маточного стада. Значительно раньше, 6–19 октября, была получена в этот год икра от анадромных производителей атлантического лосося из реки Кереть.

Основная часть самок созрела, как и их матери и бабушки, на пятом году жизни, оплодотворение икры было проведено 9 и 22 ноября 2010 года (у

анадромных производителей на Керети икру брали 11 и 14 ноября этого года). Средняя рабочая плодовитость 31 самки, нерестившихся 22 ноября, составила от 116 до 563, в среднем 276.5 икринок. Это значительно ниже абсолютной плодовитости, свойственной диким особям (более 2000 шт.). Некоторые самки дали икру перезревшую или с кровью (эту икру не оплодотворяли и не просчитывали). Длина восьми созревших самок составляла 26.3–34.2, в среднем 30.2 см. Масса этих рыб была 172–326, в среднем 25.8 г (рис. 1).

Некоторые самки 22 ноября были еще незрелыми. Гистологический анализ показал, что у многих особей есть значительная асинхронность в развитии ооцитов (рис. 2). Гонады некоторых рыб в момент сбора проб (23 ноября 2010 года) находились только на 3 ранней стадии (рис. 3).

Жизнеспособность рыб четвертого поколения маточного стада. Икра самок-четырёхлеток была существенно меньше, чем икра проходных производителей (средняя масса одной икринки составляла 70 мг и 110 мг, соответственно). Отход за период инкубации икры четырёхлеток был значи-

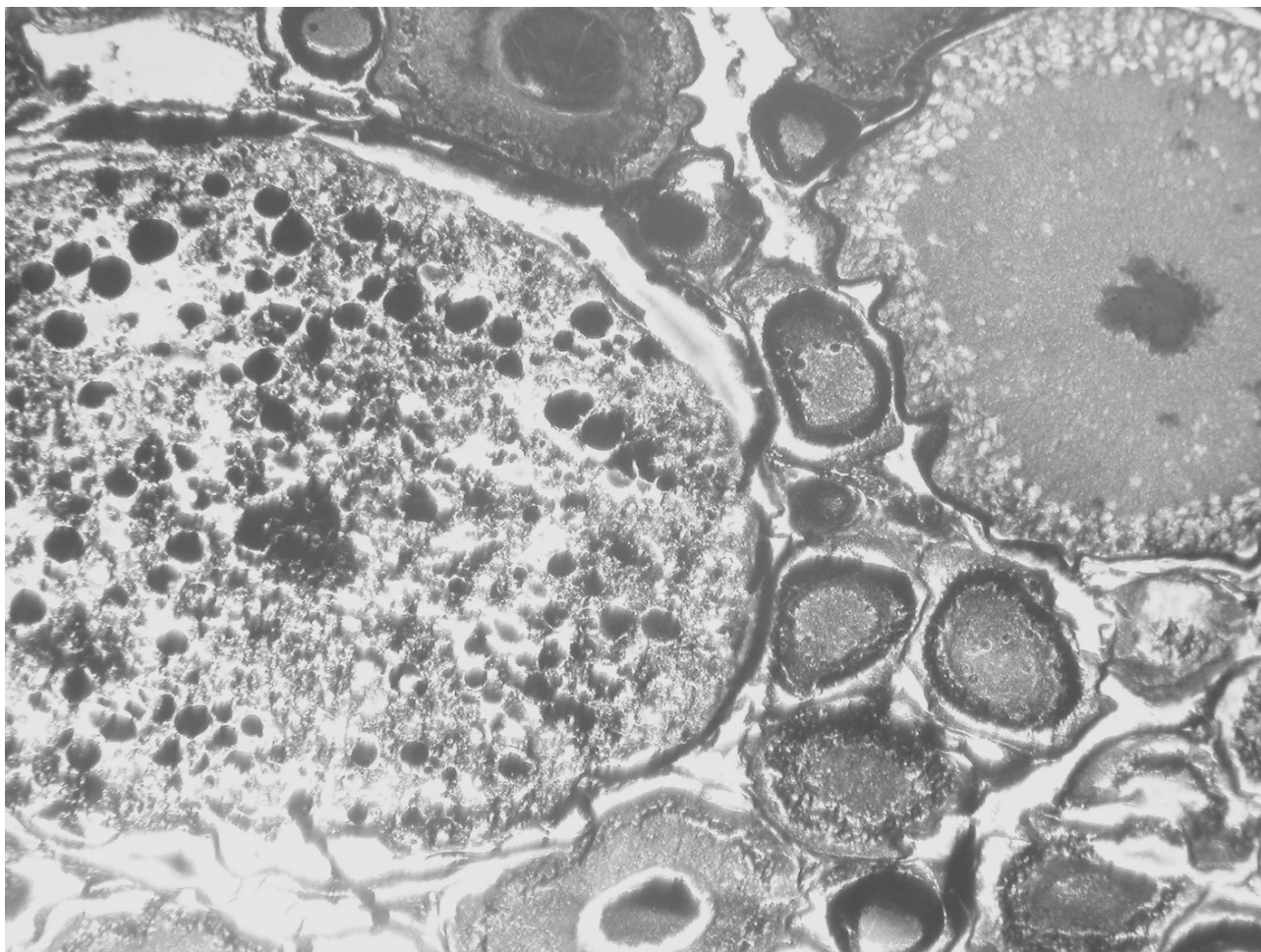


Рис. 2. Срез гонад самки на III–IV стадия зрелости. Асинхронность в развитии. Виден ооцит начала периода вителлогенеза (слева) и фазы формирования кортикальных вакуолей.

тельным — до 50%, при отходе 10.5–11.9% у икры, полученной от “диких” производителей.

Средняя масса икринок у самок-пятилеток изменялась от 50 до 117 мг, в среднем составила 83.8 мг. Отход за инкубацию этой икры был также высок — 71.5%. В период выдерживания гибель личинок составила 4.5% (от количества заложенной на инкубацию икры). На дальнейших этапах развития смертность особей была незначительна.

ОБСУЖДЕНИЕ

Неконтролируемый отбор на увеличение скорости роста и созревания в искусственных условиях среды. Карликовые популяции атлантического лосося, судя по всему, имеют определенные генетические отличия от “проходных” популяций. Даже при выращивании в идентичных условиях потомки производителей из карликовых популяций начинают созревать в более раннем возрасте, чем потомки проходных особей (Sutterlin, MacLean, 1984). Молодь озерно-речного лосося

реки Шуя на рыбоводных заводах всегда растет быстрее, чем молодь проходного лосося реки Кереть (наблюдения авторов).

Видимо, тенденция к отбору в этом направлении есть и в маточном стаде Выгского рыбоводного завода, поскольку среди производителей третьего поколения появились особи, созревающие в возрасте 3+. В первом поколении таких особей не отмечено (Крамаренко и др., 2002), во втором поколении обнаружена только одна такая особь.

Ускорение роста и созревания отмечено у атлантического лосося из маточного стада Выгского рыбоводного завода и из маточных стад, созданных за рубежом (см. ссылки в работе: Artyamonova et al., 2010). Это явление, обусловлено, видимо, “неконтролируемым” отбором в пользу более крупных рыб, идущим в искусственных условиях. Это предположение подтверждается и генетическими исследованиями — в маточном стаде Выгского рыбоводного завода отмечено снижение ча-

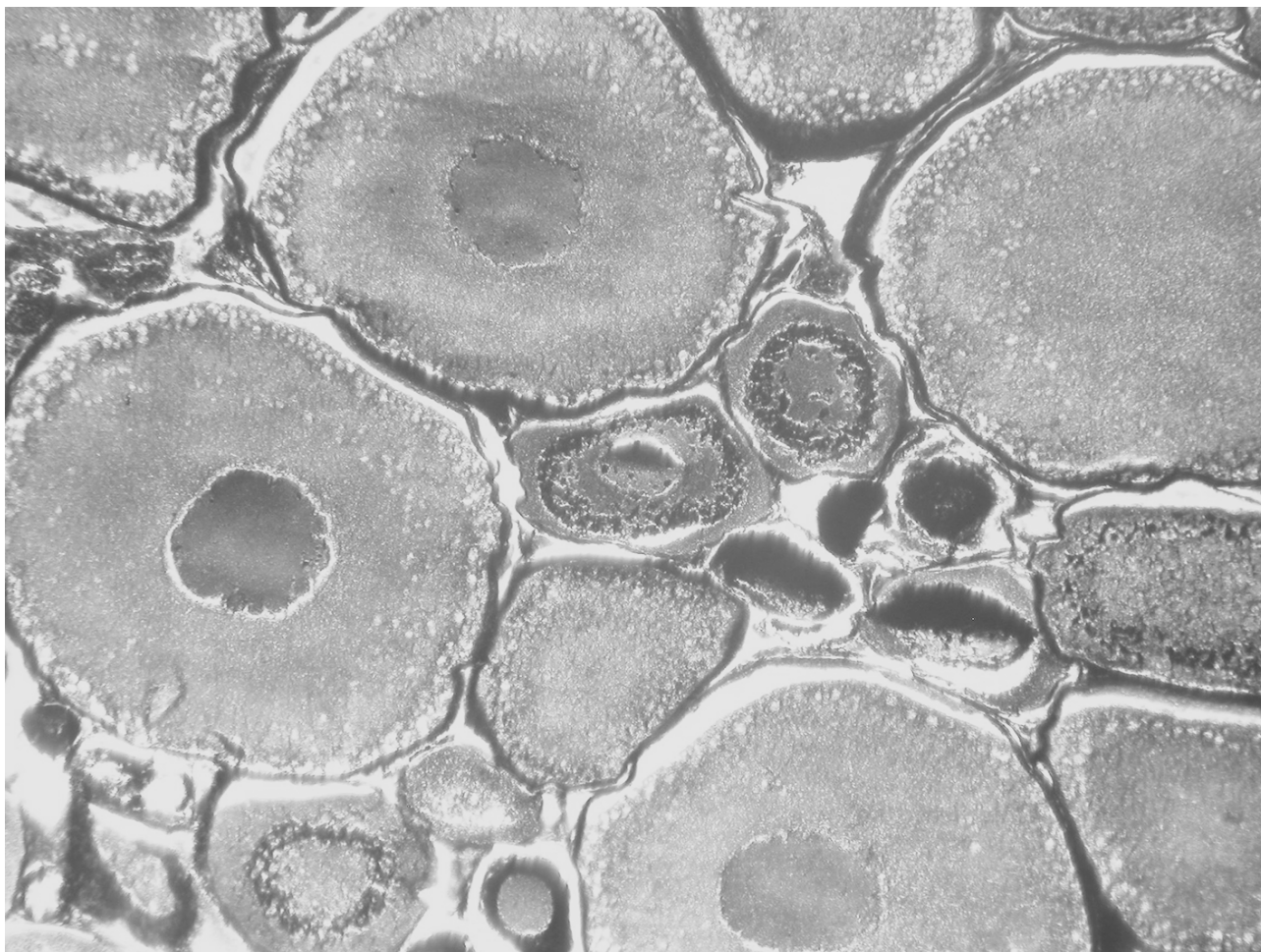


Рис. 3. Срез гонад самки на III ранней стадии зрелости, формирование кортикальных вакуолей.

стоты одного из аллелей локуса, кодирующего фермент малик-энзим (Artamonova et al., 2010).

В литературе описано снижение размера икринок в результате ускорения роста атлантического лосося в искусственных условиях среды (Fleming et al., 2000). Возможно, ускоренный рост изученных нами особей этого вида также отчасти способствовал снижению размера икринок. Однако, нарушение развития гонад и снижение выживаемости потомства неконтролируемым отбором нельзя объяснить, поскольку, как показывают многочисленные публикации, такой отбор ведет к улучшению воспроизводства в искусственных условиях (обзор: Артамонова, Махров, 2006).

Особенности развития гонад карликовых самок.

Судя по нашим данным, для карликовых самок атлантического лосося характерна асинхронность в развитии ооцитов, которая, видимо, и ведет к значительной задержке созревания многих особей. Тенденция задержки нереста у мелких рыб хорошо известна рыбоводам. Она проявилась, в частности у особей из маточного стада атлантического лосося, созданного на Лужском рыбовод-

ном заводе; у этих рыб отмечено и асинхронное созревание самок (Мурза, Христофоров, 2010).

Тенденция к задержке нереста, отмеченная у карликовых заводских рыб, также проявляется у диких карликовых особей. По наблюдению С.Г. Atkins'a (1884), пресноводный лосось в Северной Америке нерестится на неделю позже проходного. Карликовый лосось озера Bygglandsfiord нерестится в декабре (Barlaup et al., 2009). Три дикие речные карликовые самки с хорошо развитой икрой пойманы в феврале-марте (Yarrell, 1836).

Другая особенность карликовых самок, выявленная нами — мелкая икра. Уменьшение размеров икры отмечалось ранее у самок из маточных стад, созданных на основе популяций атлантического лосося рек Little Salmonier (O'Connell, Gibson, 1989), Шуи (Попова, 2004), Нарвы (Дихнич, 2005) и Луги (Мурза, Христофоров, 2010). В то же время, различия в размерах икринок у самок, питавшихся разным кормом, незначительны (Eske-

Икра дикого пресноводного лосося также меньше, чем икра проходного, это отмечено еще в 19 веке (Malmgren, 1864); результаты некоторых современных работ отражены в таблице. Видимо, в некоторых случаях отклонение от нормального развития гонад у карликовых самок атлантического лосося приводит к появлению ясно выраженных аномалий. Так, есть сообщение о поимке карликового гермафродита (Fontaine, Vibert, 1950). Аткинс (Atkins, 1884) упоминает о болезни яичников у пресноводного лосося, ведущей к сильному уменьшению числа икринок. Погибшие икринки отмечаются и в яичниках пресноводного лосося реки Пяльма, притока Онежского озера (Прозорова, 1966).

Особенности развития мелкой икры атлантического лосося и кумжи. У атлантического лосося проявляется тенденция повышенной смертности мелкой икры — отход за инкубацию мелкой икры больше, чем крупной, в 3 раза (Песлак, 1967). В цитируемой работе рекомендовано отбраковывать икру массой менее 100 мг. Не удивительно поэтому, что оплодотворенная мелкая икра карликовых производителей отличается высоким отходом.

Повышен был отход икры (средняя масса — 90 мг) у самок атлантического лосося Онежского озера (Ермолаев, 1982). Отмечена высокая смертность развивающейся икры, полученной от диких мелких производителей озер Куйто (Отчеты Кемского рыболовного завода), от карликовой самки реки Elorn (Prouzet, 1981), от искусственно выращенных мелких производителей в Howietoun (Day, 1885), на Лужском рыболовном заводе (Мурза, Христофоров, 2010), в настоящей работе, а также в предыдущие годы на Выгском рыболовном заводе (Крамаренко и др., 2002).

Отметим, что у выращенных в искусственных условиях крупных самок отход икры низок (Эскелинен, 1991; Петренко, 2002; Дихнич, 2005), то есть условия рыболовных заводов сами по себе не влияют на смертность развивающейся икры.

Особо ярко доказывает связь смертности потомства, размера икры и размера производителей атлантического лосося опыт создания маточного стада на Лужском рыболовном заводе. Трехлетние самки массой 800 гр давали мелкую икру, выживаемость личинок была очень низка. По мере роста самок размер икры возрастал, и пятилетние самки, средней массой 2.2 кг, дали икру диаметром 5.5 мм, причем выживаемость потомства не отличалась от выживаемости потомства проходных рыб (Петренко, 2002).

Тенденция увеличения выживаемости на ранних стадиях развития потомства выращенного на рыболовном заводе лосося с увеличением возраста и размеров производителей видна и при анализе данных из другой работы (Jaggrams, 1979). В этой работе приведены также данные по выживаемости

потомства выращенной на рыболовном заводе кумжи, и видно, что потомство кумжи лучше выживает на ранних стадиях развития, чем потомство атлантического лосося того же возраста.

В другом эксперименте у кумжи была повышена смертность молоди, появившейся из мелкой икры, по сравнению с молодью, появившейся из крупной икры, но только в полу-естественных условиях выращивания; в искусственных условиях такой тенденции не отмечено. Кроме того, масса икринок в обеих группах кумжи (60.5 и 78.9 мг) была существенно меньше, чем обычных икринок атлантического лосося (Einum, Fleming, 1999).

У искусственно выращенных производителей каспийской кумжи икра была очень мелкой (28—38 мг), однако выживаемость эмбрионов была высокой, 85% (Агибайлов, 2005). Не отмечено снижения выживаемости и у потомства искусственно выращенных самок черноморской кумжи (Махров и др., 2011).

Экологическое значение пониженной воспроизводительной способности карликовых самок атлантического лосося. Таким образом, полученные в настоящей работе и литературные данные позволяют считать, что потомство карликовых самок атлантического лосося отличается высоким отходом на ранних стадиях развития. Это, несомненно, снижает конкурентоспособность карликовых самок (имеется в виду конкуренция за места нереста, поскольку места нагула у карликовых самок отличаются от мест нагула у проходных и озерно-речных особей). Кроме того, мелкие особи, выклюнувшиеся из мелких икринок, в большей степени погибают после выхода из нерестовых бугров (Einum, Fleming, 2000).

Хотя единичные речные карликовые самки встречаются в проходных популяциях атлантического лосося, видимо, эта жизненная стратегия значительно менее эффективна, чем жизненная стратегия проходных самок, и отбор работает против речных карликовых самок, если возможен нагул в море или крупном озере. Популяции, включающие речных карликовых самок, возникают на участках рек выше водопадов, где невозможно существование проходной и озерно-речной формы.

Озерные карликовые самки крупнее речных карликовых самок, и, видимо, выживаемость их потомства выше, и они более конкурентоспособны. Тем не менее, и они, видимо, не выдерживают конкуренции с проходными самками и не входят в одну популяцию с ними — на Ньюфаундленде известны водные системы, где симпатрично существуют популяции, представленные озерной и проходной формой (Verspoor, Cole, 1989). Отметим, что у кумжи известны многочисленные популяции, включающие ручьевую и проходную или ручьевую и озерно-речную формы (обзоры: Кузищин, 2010; Jonsson, Jonsson, 2011).

Интересно, что жилые формы атлантического лосося широко распространены в Северной Америке, где кумжи до вселения человеком не было, а в Европе, в условиях симпатрии с кумжей, жилые формы атлантического лосося крайне редки (Regan, 1920). При этом два вида сосуществуют только в бассейнах крупных озер, в небольших озерных системах, как правило, обитает только кумжа, в озерах средней величины — либо тот, либо другой вид (обзор: Махров, 1999). Более того — имеются данные, что кумжа, вселенная в водоемы Ньюфаундленда, вытесняет мелкую форму атлантического лосося (Cowan, Baggs, 1988). Вполне вероятно, что это связано с лучшими репродуктивными способностями мелких самок кумжи, чем мелких самок атлантического лосося.

Карликовые формы атлантического лосося как реликт. Обсуждаемые в настоящей работе данные имеют значение и для изучения процесса видообразования. Как уже говорилось во “Введении”, атлантический лосось произошел от кумжи, причем видообразование сопровождалось не возникновением новых адаптивных признаков, а сужением спектра экологического и морфологического разнообразия (Махров, 2005). Поэтому есть основания рассматривать пресноводные популяции атлантического лосося как реликт (Кудерский, 1977).

Видимо, повышенная смертность потомства карликовых форм атлантического лосося как раз является причиной такого сужения спектра морфоэкологического разнообразия этого вида. Из-за пониженной репродуктивной способности пресноводных особей большинство популяций этого вида представлены проходными особями (у предкового вида, кумжи, преобладают пресноводные особи). Очевидно, в данном случае такое сужение разнообразия не адаптивно, как при специализации, а инадаптивно — это утрата эволюционной пластичности, иммобилизация, по терминологии И.И. Шмальгаузена (1945).

Возможно, это сужение спектра разнообразия связано с другим событием, сопровождавшим видообразование атлантического лосося — значительным уменьшением числа хромосом, произошедшим, скорее всего, в результате крупной перестройки генома (Зелинский, 1985). Создается впечатление, что в результате этой перестройки были затронуты ген или гены, отвечающие за формирование гонад у карликовых самок.

Авторы признательны В.С. Артамоновой, Ю.Ю. Дгебуадзе, А.В. Дихничу, И.Я. Крамаренко, Н.И. Лапочкиной, К.В. Кузину, Д.Л. Лайусу, М.В. Мине, И.Г. Мурза, Э.К. Поповой, Ю.А. Смирнову, О.Л. Христофорову за обсуждение затронутых в статье проблем. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-04-00697.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агибайлов В.В. Характеристика производителей каспийского лосося *Salmo trutta caspius* Kessler, выращиваемых в заводских условиях // Генетика, селекция и племенное дело в аквакультуре России. М. 2005. С. 397–409.
- Алеев Ю.Г. Экоморфология. Киев: Наукова думка, 1986. 422 с.
- Артамонова В.С., Махров А.А. Популяционная структура семги (*Salmo salar* L.) и ее изменение под влиянием рыбоводства // Ихтиофауна малых рек и озер Восточного Мурмана: биология, экология, ресурсы. Апатиты: Изд-во Кольского НЦ РАН, 2005. С. 144–157.
- Артамонова В.С., Махров А.А. Неконтролируемые генетические процессы в искусственно поддерживаемых популяциях: доказательство ведущей роли отбора в эволюции // Генетика. 2006. Т. 42. № 3. С. 310–324. (Artamonova V.S., Makhrov A.A. Unintentional genetic processes in artificially maintained populations: proving the leading role of selection in evolution // Russian Journal of Genetics. 2006. V. 42. № 3. P. 234–246.)
- Артамонова В.С., Махров А.А., Шульман Б.С. и др. Реакция популяции атлантического лосося (*Salmo salar* L.) реки Кереть на инвазию паразита *Gyrodactylus salaris* Malmberg // Российский журнал биологических инвазий. 2011. № 1. С. 2–14. (Artamonova V.S., Makhrov A.A., Shulman B.S. et al. Response of the Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Population of the Keret River to the Invasion of Parasite *Gyrodactylus salaris* Malmberg // Russian Journal of Biological Invasions. 2011. V. 2. № 2–3. P. 73–80.)
- Дгебуадзе Ю.Ю. Экологические закономерности изменчивости роста рыб. М.: Наука, 2001. 276 с.
- Дихнич А.В. Сравнительная характеристика производителей атлантического лосося *Salmo salar* L. анадромных и заводских маточных стад // Генетика, селекция и племенное дело в аквакультуре России. М. 2005. С. 373–391.
- Ермолаев Г.И. Особенности выдерживания производителей и инкубации икры онежского лосося *Salmo salar* L. morph *sebag* (Girard) // Сборник научн. тр. ГосНИОРХ. 1982. Вып. 183. С. 135–140.
- Зелинский Ю.П. Структура и дифференциация популяций и форм атлантического лосося. Л.: Наука, 1985. 128 с.
- Иешко Е.П., Шульман Б.С., Шуров И.Л., Барская Ю.Ю. Многолетние изменения эпизоотии молоди лосося (*Salmo salar* L.) в реке Кереть (бассейн Белого моря), вызванной вселением *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 // Паразитология. 2008. Т. 42. Вып. 6. С. 486–496.
- Крамаренко И.Я., Лапочкина Н.И., Артамонова В.С., Махров А.А. Опыт создания пресноводного маточного стада семги (*Salmo salar* L.) // Проблемы воспроизводства, кормления и борьбы с болезнями рыб при выращивании в искусств. условиях. Матер. научн. конф. 14–18 октября 2002 г. Петрозаводск. 2002. С. 68–72.
- Красная книга Российской Федерации (животные). М.: Аст, 2001. 862 с.

- Кудерский Л.А. О происхождении озерного лосося // Рыбохозяйственное изучение внутренних водоемов. Сборник № 19. Л. 1977. С. 34–39.
- Кузищин К.В. Формирование и адаптивное значение внутривидового экологического разнообразия лососевых рыб (семейство Salmonidae). Дисс. ... д-ра биол. наук в форме научного доклада. М.: МГУ, 2010. 49 с.
- Лебедев Н.В. Элементарные популяции рыб. М.: Изд-во Пищевая пром-сть, 1967. 212 с.
- Махров А.А. Кумжа *Salmo trutta* L. бассейнов Белого и Баренцева морей // Адаптация и эволюция живого населения полярных морей в условиях океанического перигляциала. Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 1999. С. 110–120.
- Махров А.А. “Диалектическое” видообразование: от кумжи (*Salmo trutta* L.) к атлантическому лососю (*S. salar* L.) // Эволюционные факторы формирования разнообразия животного мира. М.: Т-во научных изданий КМК, 2005. С. 248–256.
- Махров А.А., Артамонова В.С., Сумароков В.С. и др. Изменчивость сроков нереста у черноморской кумжи *Salmo trutta labrax* Pallas в искусственных и естественных условиях // Изв. РАН. Серия биол. 2011. № 2. С. 178–186. (Makhrov A.A., Artamonova V.S., Sumarokov V.S. et al. Variation in the timing of spawning of the Black sea brown trout *Salmo trutta labrax* Pallas under artificial and natural conditions // Biology Bulletin. 2011. V. 38. № 2. P. 138–145.)
- Медников Б.М. Избранные труды. Организм, геном, язык. М.: Т-во научных изданий КМК, 2005. 452 с.
- Микодина Е.В., Седова М.А., Чмилевский Д.А. и др. Гистология для ихтиологов. Опыт и советы. М.: Изд-во ВНИРО, 2009. 112 с.
- Мина М.В. Микроэволюция рыб. Эволюционные аспекты фенетического разнообразия. М.: Наука, 1986. 207 с.
- Мурза И.Г., Христофоров О.Л. Определение степени зрелости гонад и прогнозирование возраста достижения половой зрелости у атлантического лосося и кумжи. Л.: ГосНИОРХ, Физиол. НИИ ЛГУ, 1991. 102 с.
- Мурза И.Г., Христофоров О.Л. Рост и половое созревание самок атлантического лосося *Salmo salar* L. без нагула в природных водоемах // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Т. 1. Петрозаводск, 2010. С. 176–192.
- Павлов Д.С., Савваитова К.А. К проблеме соотношения анадромии и резидентности у лососевых рыб (Salmonidae) // Вопросы ихтиологии. 2008. Т. 48. № 6. С. 810–824.
- Песлак Я.К. Влияние качества производителей на качество выращиваемой на рыбоводных заводах молоди лосося // Обмен веществ и биохимия рыб. М. 1967. С. 73–75.
- Петренко Л.А. Разработка технологии выращивания и создание критериев оценки подбора производителей для формирования донорских популяций атлантического лосося в условиях Лужского рыбноводного завода // Обзорная информация. серия: Воспроизводство и пастбищное выращивание гидробионтов. М. 2002. Вып. 1. С. 14–32.
- Попова Э.К. Эффекты лазерного воздействия на рыб в раннем онтогенезе. Петрозаводск: ГПЗ “Кивач”, 2004. 126 с.
- Прозорова З.В. О биологии озерного лосося реки Пяльмы (Онежское озеро) // Тр. Карельск. отд-ния ГосНИОРХ. 1966. Т. IV. Вып. 1. С. 80–99.
- Роскин Г.И. Микроскопическая техника. М.: Советская наука, 1951. 478 с.
- Северцов А.С. Эволюционный стазис и микроэволюция. М.: Товарищество научных изданий КМК; Авторская Академия, 2008. 176 с.
- Смирнов Ю.А. Пресноводный лосось (экология, воспроизводство, использование). Л.: Наука, 1979. 156 с.
- Черницкий А.Г. Эколого-физиологические причины полиморфизма производителей атлантического лосося *Salmo salar* L. (Salmonidae) // Вопросы ихтиологии. 1986. Т. 26. Вып. 3. С. 524–526.
- Шмальгаузен И.И. Проблема устойчивости органических форм (онтогенезов) в их историческом развитии // Журн. общ. биол. 1945. Т. 6. № 1. С. 3–25.
- Щуров И.Л. Атлантический лосось реки Керети (естественное и искусственное воспроизводство) // Проблемы лососевых на Европейском Севере. Петрозаводск, 1998. С. 51–63.
- Эскелинен У. О деятельности рыболовной исследовательской станции Лаукаа (Финляндия) // Сб. научн. тр. ГосНИОРХ. 1991. Вып. 297. С. 44–51.
- Artamonova V.S., Makhrov A.A., Popova E.K. Unintentional Selection in Captive Broodstocks Intended for Restoring Natural Populations: Description of the Phenomenon and a Novel Method of Controlling It // Stream Restoration: Halting Disturbances, Assisted Recovery and Managed Recovery. G.D. Hayes and T.S. Flores, eds. New York. 2010. P. 149–160.
- Atkins C.G. Notes on land-locked salmon // Forest and Stream. 1884. V. 23. № 2. P. 29–31.
- Bagliniere J.L., Maisse G. Precocious maturation and smoltification in wild Atlantic salmon in the Armorican Massif, France // Aquaculture. 1985. V. 45. P. 249–263.
- Barbour S.E., Rombough P.I., Kerekes J.J. A life history and ecological study of an isolated populations of ouananiche, *Salmo salar*, from Gros Morne Park, Newfoundland // Naturaliste Can. 1979. V. 106. № 2. P. 305–311.
- Barlaup B.T., Sandven O.R., Skoglund H. et al. Bleka i Byglandsfjorden – bestandsstatus og tiltak for økt naturlig rekruttering 1999–2008. Trondheim: Direktoratet for naturforvaltning, 2009. 88 s.
- Berg M. A relict salmon, *Salmo salar* L., called “smablank” from the river Namsen, North-Trondelag // Acta Borealia. A. Scientia. 1953. № 6. P. 17.
- Berg O.K. The formation of non-anadromous populations of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Europe // J. Fish Biology. 1985. V. 27. P. 805–815.
- Berg O.K., Gausen D. Life history of a riverine, resident Atlantic salmon *Salmo salar* L. // Fauna norw. Ser. A. 1988. V. 9. P. 63–68.
- Couturier C.Y., Clarke L., Sutterlin A.M. Identification of spawning areas of two forms of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) inhabiting the same watershed // Fish. Res. 1986. V. 4. P. 131–144.

- Cowan G.I.McT., Baggs E.M. Incidences of lacustrine spawning of the ouananiche, *Salmo salar*, and the brook charr, *Salvelinus fontinalis*, on the Avalon Peninsula, Newfoundland // J. Fish Biology. 1988. V. 32. № 2. P. 311–312.
- Dahl K. The “Blege” or dwarf-salmon. A landlocked salmon from lake Bygglandsfiord in Setesdal // Skrifter utgitt av det Norske Videnskaps-Akademi i Oslo. I. Matem.-Naturv. Klasse. 1927. № 9. P. 1–25.
- Day F. On the breeding of salmon from parents which have never descended to the sea // Trans. Linn. Soc. London. Ser. 2. Zoology. 1885. V. 2. P. 447–468.
- Einum S., Fleming I.A. Maternal effects of egg size in brown trout (*Salmo trutta*): norms of reactions to environmental quality // Proc. R. Soc. London. B. 1999. V. 266. P. 2095–2100.
- Einum S., Fleming I.A. Selection against late emergence and small offspring in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Evolution. 2000. V. 54. № 2. P. 628–639.
- Eskelinen P. Effects of different diets on egg production and egg quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // Aquaculture. 1989. V. 79. № 1/4. P. 275–281.
- Fleming I.A. Reproductive strategies of Atlantic salmon: ecology and evolution // Reviews in Fish Biology and Fisheries. 1996. V. 6. P. 379–416.
- Fleming I.A., Hindar K., Mjølnerød I.B. et al. Lifetime success and interactions of farm salmon invading a native population // Proc. R. Soc. Lond. B. 2000. V. 267. P. 1517–1523.
- Fontaine M., Vibert R. Sur un parr de saumon hermaphrodite parvenu a maturite sexuelle // Journal du Conseil. 1950. V. 16. № 2. P. 216–226.
- Gibson R.J., Williams D.D., McGowan C., Davidson W.S. The ecology of dwarf fluvial Atlantic salmon, *Salmo salar* L., cohabiting with brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), in southeastern Newfoundland, Canada // Pol. Arch. Hydrobiol. 1996. V. 43. № 2. P. 145–166.
- Hendry A., Bohlin T., Jonsson B., Berg O.K. To sea or not to sea? Anadromy versus non-anadromy in salmonids // Evolution Illuminated: Salmon and Their Relatives. A.P. Hendry and S.C. Stearns (editors). Oxford etc.: Oxford University Press, Inc., 2004. P. 92–125.
- Hindar K., Nordland J. A female Atlantic salmon, *Salmo salar* L., maturing sexually in the parr stage // J. Fish Biology. 1989. V. 35. P. 461–463.
- Jarrams P. Egg, fry and smolt production from salmon, *Salmo salar* L. and sea trout *Salmo trutta* L. reared entirely in freshwater // J. Fish Biology. 1979. V. 15. № 5. P. 607–611.
- Jonsson B., Jonsson N. Ecology of Atlantic Salmon and Brown Trout. Habitat as a Template for Life Histories. Dordrecht: Springer, 2011. 708 p.
- Kendall W.C. The fishes of New England. The salmon family. Part 2. The Salmon // Memoirs of the Boston Society of Natural History. 1935. V. 9. № 1. 166 p.
- MacCrimmon H.R., Gots B.L. World distribution of Atlantic salmon, *Salmo salar* // J. Fish. Res. Board Can. 1979. V. 36. P. 422–457.
- Malmgren A.J. Kritische Uebersicht der Fisch-Fauna Finlands // Archiv für Naturgeschichte. 1864. V. 30. № 1. P. 259–351.
- Moore A., Riley W.D. A sexually mature female Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolt // Aquaculture and Fisheries Management. 1992. V. 23. P. 273–274.
- O’Connell M., Gibson R.J. The maturation of anadromous female Atlantic salmon, *Salmo salar* L., stocked in a small pond in urban St John’s, Newfoundland, Canada // J. Fish Biology. 1989. V. 34. № 6. P. 937–946.
- Oliva O., Johal M.S. On the last Bohemian salmon (*Salmo salar*) // Vest. čs. Společ. zool. 1981. V. 45. № 2. P. 102–114.
- Prouzet P. Observation d’une femelle de tacon de saumon atlantique (*Salmo salar* L.) parvenue a maturite sexuelle en riviere // Bull. Francais Piscicult. 1981. № 282. P. 16–19 (English summary).
- Regan C.T. The geographical distribution of salmon and trout // Salmon and Trout magazine. 1920. V. 22. June. P. 25–35.
- Roff D.A. The Evolution of Life Histories. New York: Chapman & Hall, 1992. 535 p.
- Saunders R.L., Harmon P.R., Knox D.E. Smolt development and subsequent sexual maturity in previously mature male Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Aquaculture. 1994. V. 121. № 1–3. P. 79–93.
- Schluter D. The Ecology of Adaptive Radiation. New York: Oxford University Press, 2000. 288 p.
- Shaw J. Account of experimental observations on the development and growth of salmon-fry, from the exclusion of the ova to the age of two years // Transactions of the Royal Society of Edinburgh. 1840. V. XIV. Part. 2. P. 547–566.
- Stearns S.C. The Evolution of Life Histories. Oxford/New York/Tokyo: Oxford University Press. 1992. 249 p.
- Sutterlin A.M., MacLean D. Age at first maturity and the early expression of oocyte recruitment process in two forms of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their hybrids // Can. J. Fish Aquat. Sci. 1984. V. 41. № 8. P. 1139–1149.
- Thorstad E.B., Hindar K., Berg O.K. et al. Status for småblankbestanden I Namsen // NINA Rapport. 2009. V. 403. 95 s.
- Verspoor E., Cole L.J. Genetically distinct sympatric populations of resident and anadromous Atlantic salmon, *Salmo salar* // Can. J. Zool. 1989. V. 67. P. 1453–1461.
- Verspoor E., Cole L.E. Genetic evidence for lacustrine spawning of the non-anadromous Atlantic salmon populations of Little Gull Lake, Newfoundland // Journal of Fish Biology. 2005. V. 67. Suppl. A. P. 200–205.
- Verspoor E., Stradmeyer L., Nielsen J.L., eds. The Atlantic salmon. Genetics, Conservation and Management. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2007. 500 p.
- West-Eberhard M.J. Developmental Plasticity and Evolution. New York: Oxford University Press, Inc., 2003. 794 p.
- Yarrell W. A History of British Fishes. London: John van Voorst. 1836. V. 2. 472 p.
- Zarnecki S.S. Some evolutionary aspects in salmon (*Salmo salar*) and sea trout (*S. trutta*). ICES. C.M. 1960. № 130. 3 p.

Abnormal Development of Gonads of Dwarf Females and Low Survival of Their Offspring as the Cause of Rarity of Resident Populations of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.)

**A. A. Makhrov^a, M. V. Ponomareva^b, O. V. Khaimina^c, V. E. Gilepp^d, O. V. Efimova^d,
T. A. Nechaeva^d, and T. I. Vasilenkova^d**

^a *Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia*

^b *Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

^c *Russian State Hydrometeorological University, Malookhtinskii pr. 98, St. Petersburg, 195196 Russia*

^d *Vygskiy Fish Hatchery, Sosnovetz, Belomorsky raion, Karelia, 186530 Russia*

e-mail: makhrov12@mail.ru

Received April 28, 2013; in final form, June 13, 2013

Abstract—Fecundity and mass of eggs, as well as survival of offspring, of hatchery-reared small (less than 406 g) females of Atlantic salmon are determined. The absolute fecundity and mass of egg of artificially reared fish are sufficiently less than that of anadromous spawners. Small females are characterized by delayed spawning; histological analysis has demonstrated significant asynchrony in oocyte development of some specimens. Survival of offspring of dwarf females at the early stages of development is lower than of anadromous females. Our results agree completely with the published data. It is suggested that dwarf females are not able to withstand intraspecific and interspecific competition because of low reproductive ability. This explains rarity of natural populations of dwarf (landlocked) forms of Atlantic salmon.

Keywords: gonads, experiment, fish, eggs, histological analysis

УДК 576.35:57.017.6

УХУЖДЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ СТАРЕНИИ: ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ ИЛИ СТОХАСТИКА?¹

© 2013 г. А. Н. Хохлов

Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12

E-mail: khokhlov@genebee.msu.su

Поступила в редакцию 09.05.13 г.

Окончательный вариант получен 25.06.13 г.

*If you want to make God laugh –
describe to Him your theory of aging
Anonymous*

Существует точка зрения, согласно которой происходящие при старении подавление способности клеток многоклеточного организмов к пролиферации и ухудшение регенерации тканей и органов являются следствием специально возникших в процессе эволюции механизмов, уменьшающих риск злокачественной трансформации и защищающих, тем самым, от рака. В то же время в “состарившихся” (senescent) клетках организма начинают накапливаться различные макромолекулярные дефекты, которые, наоборот, увеличивают вероятность превращения таких клеток в раковые. Таким образом, согласно упомянутой концепции, ограничение клеточной пролиферации представляет собой обоюдоострый меч, который, с одной стороны, уменьшает вероятность развития злокачественных опухолей в юности, а с другой — ограничивает продолжительность жизни вследствие накопления “испорченных” клеток в старости. Однако остается неясным, почему помещенные *in vitro* нормальные клетки человека, лишенные упомянутых “антираковых” барьеров, функционирующих на организменном уровне, НИКОГДА не претерпевают спонтанной злокачественной трансформации. Кроме того, непонятно, каким образом избегает и старения, и рака такой организм, как пресноводная гидра, у которой в определенных условиях вообще нет постмитотических и “состарившихся” (senescent) клеток и которая в таких условиях (исключающих необходимость полового размножения) может жить практически бесконечно, обладая огромным регенеративным потенциалом (новый организм может возникнуть даже из 1/100 старого). По-видимому, ограничение клеточной пролиферации в стареющем многоклеточном организме не является следствием реализации какой-либо специальной программы. Судя по всему, никакой программы старения вообще не существует, а оно является лишь некоторым “побочным продуктом” программы развития, реализация которой у высших организмов с необходимостью предполагает появление популяций клеток с очень низкой и даже нулевой пролиферативной активностью, что и определяет ограниченную способность соответствующих органов и тканей к регенерации. В то же время именно наличие таких популяций высокодифференцированных клеток, совсем неспособных или малоспособных к размножению (нейроны, кардиомиоциты, гепатоциты), обеспечивает нормальное функционирование высших животных и человека. Даже регенерация таких органов с помощью стволовых клеток может привести к нарушению необходимых связей в сложноорганизованных системах. Ставший широко распространенным в последние десятилетия редукционизм в экспериментально-геронтологических исследованиях (“все определяется неблагоприятными изменениями отдельных клеток”) привел к появлению целого ряда модельных систем для исследования механизмов старения на изолированных клетках (феномен Хейфлика, модель “стационарного старения”, клеточно-кинетическая модель для тестирования геропротекторов и геропротомоторов и др.). Однако в настоящее время складывается впечатление, что данные, полученные на таких моделях, не могут быть автоматически перенесены на ситуацию в целом организме. По-видимому, в механизмах старения многоклеточных организмов основная роль все-таки отводится нарушениям регуляторных процессов, реализующихся на нейрогуморальном уровне, а не просто накоплению макромолекулярных дефектов в отдельных клетках. Не исключено, что именно нарушение такого рода регуляции может быть причиной часто наблюдающегося аномального УСИЛЕНИЯ в старости интенсивности пролиферации некоторых клеточных популяций, приводящего к старческой акромегалии и возникновению многочисленных доброкачественных образований. По-видимому, с возрастом ухудшается не столько качество самих клеток, сколько качество КОНТРОЛЯ организма над клетками, органами и тканями, что и приводит к увеличению вероятности смерти.

Ключевые слова: старение, регенерация, программа, пролиферация клеток, клеточное старение, рак.

DOI: 10.7868/S0475145013060049

¹ В основу статьи положена пленарная лекция, прочитанная автором на международной конференции “Актуальные проблемы регенеративной медицины” (Киев, 4–5 октября 2012 г.).

Известно, что с возрастом (вернее — при старении, см. ниже) способность тканей и органов подавляющего большинства многоклеточных организмов к регенерации падает. Такое падение, как правило, определяется снижением способности соответствующих клеток организма к размножению (Beausejour, Campisi, 2006; Macieira-Coelho, 2011), хотя, конечно, эффективность регенерационных процессов определяется не только клеточной пролиферацией. И, согласно многим геронтологическим концепциям, именно ухудшение со временем регенеративных возможностей организма приводит к его старению. При этом важно подчеркнуть, что в данном случае речь идет о классическом определении старения как совокупности различных возрастных изменений организма, ведущих к увеличению вероятности его смерти. Если вероятность гибели индивидов (измеряемая только на популяционном уровне и определяемая способностью противостоять различным неблагоприятным факторам как экзогенного, так и эндогенного происхождения — в том числе, способностью к регенерации) достаточно велика, хотя и не меняется со временем, то мы имеем дело с нестареющими организмами, продолжительность жизни которых, тем не менее, очень мала (Khokhlov, 2010b, 2013). В то же время стареющие организмы с очень низкой вероятностью смерти могут жить чрезвычайно долго, создавая иллюзию их “бессмертия”. Это явление Калев Финч назвал “negligible senescence” (Finch, 1990, 1997). Таким образом, старение и продолжительность жизни, конечно, связаны, однако их корреляция не является абсолютной. Кроме того, хотелось бы заметить, что даже многие неживые системы также могут стареть в вышеупомянутом смысле (т.е. вероятность их “гибели” растет со временем), однако, как правило, они не способны к самостоятельной регенерации. Классической иллюстрацией этого положения служит широко известная картинка из замечательной книги Алекса Комфорта (Comfort, 1964), описывающая “старение” стаканов в баре: сосуды из граненого стекла “стареют” по мере накопления дефектов, в то время как вероятность “гибели” их собратьев из тонкого стекла гораздо выше и остается неизменной до полного “вымирания” популяции.

Существует точка зрения (см., например, Campisi, 2005; Beausejour, Campisi, 2006; Campisi, 2007; Campisi, d’Adda di Fagagna, 2007; Campisi, 2008; Campisi, Yaswen, 2009; Campisi, 2011, 2013), согласно которой происходящие при старении подавление способности клеток многоклеточного организма к пролиферации и ухудшение регенерации тканей и органов являются следствием специально возникших в процессе эволюции механизмов, уменьшающих риск злокачественной трансформации и защищающих, тем самым, от рака. В то же время, в “состарившихся” (senes-

cent) клетках организма начинают накапливаться различные макромолекулярные дефекты, которые, наоборот, увеличивают вероятность превращения таких клеток в раковые. Таким образом, по мнению Кампизи и ее коллег, ограничение клеточной пролиферации представляет собой обоюдоострый меч, который, с одной стороны, уменьшает вероятность развития злокачественных опухолей в юности, а с другой — ограничивает продолжительность жизни вследствие накопления “испорченных” клеток в старости.

Однако остается неясным, почему помещенные *in vitro* нормальные клетки человека, лишенные упомянутых “антираковых” барьеров, функционирующих на организменном уровне, НИКОГДА не претерпевают спонтанной злокачественной трансформации. Во всяком случае, этого практически никогда не наблюдали в сотнях лабораторий, занимавшихся культивированием таких клеток. Трансформировать нормальные фибробласты человека можно только с помощью специальных воздействий, например, вирусом SV-40. Данные нескольких работ, в которых все же были описаны случаи спонтанной трансформации нормальных клеток человека, получены на клетках, выделенных из тканей и органов, пораженных раковыми опухолями, поэтому чистота этих экспериментов вызывает определенные сомнения (Frosina, 2001).

Кроме того, если придерживаться точки зрения Кампизи, остается совершенно непонятным, каким образом избегает и старения, и рака такой организм, как пресноводная гидра, у которой в определенных условиях вообще нет постмитотических и “состарившихся” (senescent) клеток и которая в такой ситуации (исключающей необходимость полового размножения) может жить практически бесконечно, обладая огромным регенеративным потенциалом (новый организм может возникнуть даже из 1/100 старого) (Хохлов, 1988; Martinez, 1998; Bosch, 2008; Estep, 2010; Martinez, Bridge, 2012). “Выкручивается” гидра, судя по всему, следующим образом (Хохлов, 1988). Полагается, что так называемые интерстициальные клетки (или просто i-клетки) гидры способны как участвовать в образовании почек, так и давать начало гаметам. Гаметогенез у гидры происходит периодически, после чего она вновь может переходить к бесполому размножению. Однако в определенных условиях (изменение температуры окружающей среды) гаметогенез затягивается, что приводит к истощению запасов i-клеток, одряхлению особи и ее смерти. Зона непрерывного роста расположена у гидры под гипостомом. Вновь образованные клетки перемещаются вверх (к гипостому и щупальцам) или вниз (к образующимся почкам и половым железам), а также по стебельку к подошве, через аборальную пору которой выделяются некротические массы. При этом размеры и индивидуальные особенно-

сти полипа остаются постоянными. Таким образом, гидра постоянно полностью обновляется, не обременяя себя “состарившимися” клетками.

Согласно концепции старения, которой мы придерживаемся (Хохлов, 1988; Khokhlov, 2010a, 2010b, 2013), именно ограничение пролиферации клеток, образующих ткани и органы подавляющего большинства многоклеточных организмов, является следствием накопления в них различных макромолекулярных повреждений. При этом наиболее важные из них — это повреждения ДНК (т.к. повреждение главной матрицы во многих случаях не может быть “отремонтировано”), которые в дальнейшем, через цепь различных событий, ведут к увеличению вероятности смерти организма, т.е. к старению (Gensler, Bernstein, 1981; Хохлов, 1988; Акифьев, Потапенко, 2001; Khokhlov, 2010b, 2013). Чем выше скорость пролиферации клеток, тем легче они должны избегать накопления на уровне всей клеточной популяции указанных повреждений за счет простого их “разбавления”. Гидре же за счет непрерывного обновления всех клеток удается сохранять в определенных условиях свою жизнеспособность на неизменном уровне в течение практически неограниченного времени.

Надо сказать, что в последнее время интерес к пресноводной гидре как примеру нестареющего организма начал снова возрастать, о чем свидетельствует целый ряд недавно появившихся публикаций (Martinez, 1998; Bosch, 2008; Estep, 2010; Martinez, Bridge, 2012).

Есть основания полагать, что ограничение клеточной пролиферации в стареющем многоклеточном организме не является следствием реализации какой-либо специальной программы старения. Судя по всему, такой программы вообще не существует, а оно является лишь некоторым “побочным продуктом” программы развития (Austad, 1999; Austad, 2004; Holliday, 2007; Khokhlov, 2010a, 2013), реализация которой у высших организмов с необходимостью предполагает появление популяций клеток с очень низкой и даже нулевой пролиферативной активностью, что и определяет ограниченную способность соответствующих органов и тканей к регенерации. В то же время именно наличие таких популяций высокодифференцированных клеток, совсем неспособных или малоспособных к размножению (нейроны, кардиомиоциты, гепатоциты), обеспечивает нормальное функционирование высших животных и человека. Даже регенерация таких органов с помощью стволовых (сателлитных) клеток может привести к нарушению необходимых связей в сложноорганизованных системах.

Как уже отмечалось ранее (Khokhlov, 2010a), программой в биологическом смысле является некоторый набор команд, “выдача” которых в организме не происходит в ответ на некоторое внешнее воздействие, а определяется только вре-

менной шкалой. В этом смысле апоптоз можно считать запрограммированным явлением лишь применительно к эмбриональному развитию, когда его отсутствие просто сделает невозможным появление нормального новорожденного организма.

Конечно, в природе существует много примеров такого явления, как запрограммированная смерть. Однако в данном случае речь идет именно о запрограммированной ГИБЕЛИ организма (которую В.П. Скулачев назвал фенотозом (Skulachev, 1997, 1999, 2011)), но не о запрограммированном СТАРЕНИИ, т.е. запрограммированном увеличении с возрастом вероятности смерти. Такой способ элиминации уже не нужных особей представляется мне слишком громоздким и нецелесообразным, чтобы именно им воспользовалась эволюция для обеспечения благополучия вида в целом.

Известно, что у человека старение начинается, по некоторым данным, лет в 15. Но это — у человека, существа социального и потому защищенного от неблагоприятного воздействия внешней среды достижениями цивилизации. В дикой же природе старение, как правило (подчеркиваю — как правило, ибо есть и исключения типа слонов), не наблюдается, ибо практически все особи погибают задолго до начала этого процесса. Кроме того, как мне кажется, даже в тех случаях, когда эволюция “видит” старение до завершения репродуктивного периода, она старается ЗАМЕДЛИТЬ этот процесс и увеличить максимальную продолжительность жизни, увеличивая тем самым как длительность развития, так и период фертильности (собственно, именно это мы и наблюдаем на протяжении последних миллионов лет). По-видимому, ИЗОБРЕТЕНИЕ или УСКОРЕНИЕ старения (скажем, с помощью специальной программы) для эволюции либо невыгодно, либо просто лишено смысла.

В пользу отсутствия созданной эволюцией специальной программы старения может служить и следующий довод. В принципе, любую программу можно сломать. В частности, мы знаем много случаев нарушения программы развития, в результате чего либо погибает эмбрион, либо на свет появляется аномальное потомство. Однако мне не известны случаи нарушения соответствующей программы (если она существует) у отдельных особей стареющих видов, в результате чего они становились бы “бессмертными”.

К сожалению, значительно возросший в последнее время интерес к экспериментально-геронтологическим исследованиям привел к парадоксальной ситуации: хотя в этой области появляется все большее и большее количество работ, лишь небольшая их часть действительно посвящена изучению механизмов старения. На наш взгляд, это определяется, в числе прочего, следующими обстоятельствами:

1) Как правило, классическое определение старения как совокупности возрастных изменений, приводящих к увеличению вероятности смерти, игнорируется.

2) Основной акцент делается на увеличении или уменьшении продолжительности жизни, хотя очень часто, как уже отмечалось выше, это не имеет никакого отношения к модификации процесса старения (в частности, вполне успешно можно продлить жизнь нестареющим организмам; в то же время, само наличие старения не обязательно свидетельствует о низком долголетии).

3) В качестве контрольных используются животные с определенными аномалиями (типа генетических заболеваний), так что любое благоприятное воздействие на соответствующие патологические процессы ведет к увеличению продолжительности жизни.

4) Слишком большое значение придается увеличению или уменьшению СРЕДНЕЙ продолжительности жизни, которая во многом определяется факторами, никак не связанными со старением.

5) Все большее количество геронтологических экспериментов проводится на модельных системах, обеспечивающих лишь косвенную информацию о механизмах старения, интерпретация которой во многом зависит от той фундаментальной концепции, которой придерживаются конкретные исследователи. В частности, это касается сложившейся в настоящее время ситуации с использованием термина “клеточное старение” (cell senescence). Если изначально он был введен для обозначения различных неблагоприятных изменений в нормальных клетках ВСЛЕДСТВИЕ истощения ими митотического потенциала (Hayflick, Moorhead, 1961; Hayflick, 1965, 1979), то теперь все чаще этим термином, наоборот, называют сопровождающееся определенным каскадом внутриклеточных реакций подавление пролиферации клеток (в том числе, и раковых) под влиянием различных ДНК-повреждающих факторов (Campisi, 2011; Sikora et al., 2011; Campisi, 2013).

6) И, наконец, то, что можно назвать “проблемой редукционизма”. Подавляющее большинство геронтологических теорий, появившихся в последние десятилетия, сводили механизмы как “нормального”, так и ускоренного или замедленного старения многоклеточных организмов к определенным макромолекулярным изменениям (не принципиально, стохастическим или запрограммированным) в составляющих их клетках. Это привело к появлению большого количества цитогеронтологических модельных систем, обеспечивающих изучение “возрастных” изменений в клетках, освобожденных от “организменного шума”, связанного с функционированием нейрогуморальной и нервной систем.

Такой редукционизм в экспериментально-геронтологических исследованиях (“все определяется неблагоприятными изменениями отдельных клеток”) способствовал, в частности, и разработке модели Хейфлика, а также некоторых моделей, используемых в нашей лаборатории (модель “стационарного старения”, клеточно-кинетическая модель для тестирования геропротекторов и геропротомов, оценка способности клеток к колониеобразованию и др.).

Что касается упомянутой модели, основанной на широко известном феномене Хейфлика (старение *in vitro*), то, как уже неоднократно отмечалось ранее (Оловников, 2005, 2007a, 2007b; Khokhlov, 2010a, 2010b; Khokhlov et al., 2012; Wei et al., 2012; Khokhlov, 2013), она, судя по всему, не имеет прямого отношения к механизмам старения. Иначе говоря, невозможно досконально объяснить, почему мы стареем, основываясь на явлении ограниченного митотического потенциала нормальных клеток, который практически никогда полностью не исчерпывается *in vivo*. Впрочем, теперь мы, благодаря А.М. Оловникову (Оловников, 1971, 1996), по крайней мере, знаем, каким образом это явление реализуется в клетках.

Наверное, если бы продолжительность жизни человека возросла в несколько раз, некоторые клеточные популяции нашего организма все же исчерпали бы свой митотический потенциал и тогда “лимит Хейфлика” привел бы ко “второй волне” старения, однако пока этого, судя по всему, не происходит. Тем не менее, необходимо заметить, что некоторые исследователи (см., в частности, (Mikhelson, 2001)) продолжают считать укорочение теломера в клетках ключевым механизмом старения.

В то же время наша модель “стационарного старения” (накопление “возрастных” повреждений в культивируемых клетках, размножение которых остановлено тем или иным способом — лучше всего, с помощью контактного торможения) предполагает сходство процессов в модельной системе и в целом организме (Vilenchik et al., 1981; Хохлов, 1988; Khokhlov, 1992, 1998; Akimov, Khokhlov, 1998; Khokhlov, 2003; Alinkina et al., 2012; Yablonskaya et al., 2013). Собственно, такое сходство напрямую вытекает из упомянутой выше нашей теории ограничения клеточной пролиферации как основного механизма накопления с возрастом макромолекулярных изменений в клетках многоклеточных организмов (Хохлов, 1988; Khokhlov, 2010a, 2010b, 2013). Более того, наши последние исследования показали, что клетки, находящиеся в стационарной фазе роста, действительно “стареют по Гомпертцу”, т.е. вероятность их гибели экспоненциально увеличивается со временем (Khokhlov, 2010b, 2013). При этом такие эксперименты можно проводить на самых разных клетках, в том числе и на бактериях, дрож-

жах (именно на них наиболее часто выполняются исследования феномена “стационарного старения”), растительных клетках, микоплазмах и др., что обеспечивает эволюционный подход к анализу получаемых данных. Важно также отметить, что, если модель Хейфлика довольно сильно затрудняет повторы экспериментов, ибо клетки все время изменяются от пассажа к пассажу (“нельзя войти дважды в одну реку”), то модель “стационарного старения” позволяет, скажем, работать на обладающих неограниченным митотическим потенциалом трансформированных (либо нормальных, но иммортализованных) клетках, так что многократное воспроизведение опытов уже не является проблемой (Khokhlov, 2012).

К сожалению, в настоящее время складывается впечатление, что даже данные, полученные на таких моделях, не могут быть автоматически перенесены на ситуацию в целом организме (Khokhlov, 2010b, 2013). Наши собственные исследования различных геропротекторов и геропромоторов с помощью модели “стационарного старения”, клеточно-кинетической модели, а также с помощью оценки способности клеток к колониеобразованию показали, что во многих случаях изучаемые факторы не оказывают положительного действия на жизнеспособность культивируемых клеток, хотя и достоверно продлевают жизнь экспериментальным животным, а также улучшают самочувствие и качество жизни людей. Это обстоятельство позволило нам предположить, что во многих случаях действие геропротектора проявляется только на уровне целого организма и не сводится лишь к улучшению жизнеспособности его клеток. По-видимому, сходный вывод может быть сделан и для многих геропромоторов.

Судя по всему, в механизмах старения многоклеточных организмов основная роль все-таки отводится нарушениям регуляторных процессов, реализующихся на нейрогуморальном уровне, а не просто накоплению макромолекулярных дефектов в отдельных клетках. Не исключено, что именно нарушение такого рода регуляции может быть причиной часто наблюдающегося аномального УСИЛЕНИЯ в старости интенсивности пролиферации некоторых клеточных популяций, приводящего к старческой акромегалии и возникновению многочисленных доброкачественных образований. По-видимому, с возрастом ухудшается не столько качество самих клеток, сколько качество КОНТРОЛЯ организма над клетками, органами и тканями, что и приводит к увеличению вероятности смерти.

В связи с вышесказанным я бы назвал свою теперешнюю научную позицию антиредукционистской (Khokhlov, 2010b; Alinkina et al., 2012; Khokhlov, 2013; Yablonskaya et al., 2013). По-видимому, процесс старения многоклеточного орга-

низма запускается именно на организменном уровне, хотя реализация его и происходит, в значительной степени, на уровне отдельных клеток. Особая роль в этом может отводиться тому, что мы называем микроокружением клеток (Conboy et al., 2005; Zahidov et al., 2010).

По-видимому, механизмы, определяющие развитие и регенерацию, очень схожи. В частности, рисунок на кончиках пальцев человека, определяющий их отпечатки, появляется с помощью программы развития, но очень точно (со 100%-ной акуратностью) поддерживается системой регенерации. Однако в последнем случае приходится говорить не о программе в упомянутом мной ранее смысле, а об одной из систем, возникших в результате реализации программы развития и определяющих надежное функционирование организма на заданном этой программой уровне.

У человека существуют по-настоящему “бессмертные” клетки — это клетки зародышевой линии (Medvedev, 1981; Хохлов, 1988). Они являются аналогами i-клеток у гидры. Только в этом случае “гидрой” можно считать весь человеческий род на протяжении многих поколений, а отдельных индивидов — сменяющимися с абортальной поры или шупалец погибающими клетками. По поводу того, как клетки зародышевой линии, передаваемые из поколения в поколение, избегают старения, существует много разных концепций, но мне представляется наиболее оправданной та, которая ставит во главу угла обеспечиваемый организмом постоянный “отбор лучших”, а не какие-то особые механизмы выживания, свойственные половым, но не соматическим клеткам (Medvedev, 1981; Хохлов, 1988). Само собой разумеется, что без теломеразы тут дело тоже не обходится, однако она есть и в стволовых клетках, однако это не обеспечивает им “бессмертие”. Что же касается линий трансформированных клеток, то они действительно “бессмертны”, однако составляющие их отдельные клетки (как и отдельные особи популяции многоклеточных организмов) часто гибнут и лишь интенсивное размножение остальных “членов команды” обеспечивает практически бесконечное существование “вида”. Стоит затормозить пролиферацию таких клеток, и вся линия очень быстро погибнет из-за “стационарного старения”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Акифьев А.П., Потапенко А.И. Ядерный генетический материал как инициальный субстрат старения животных // Генетика. 2001. Т. 37. № 11. С. 1445–1458.
- Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Докл. АН СССР. 1971. Т. 201. № 6. С. 1496–1499.
- Оловников А.М. Редумера как недостающее звено в понимании старения человека // Клинический геронтолог. 2005. № 11. С. 50–69.

- Хохлов А.Н. Пролиферация и старение (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. Сер. "Общие пробл. физ.-хим. биологии", Т. 9). Москва: ВИНТИ, 1988. 176 с.
- Akimov S.S., Khokhlov A.N. Study of "stationary phase aging" of cultured cells under various types of proliferation restriction // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998. V. 854. P. 520.
- Alinkina E.S., Vorobyova A.K., Misharina T.A. et al. Cytoogerontological studies of biological activity of oregano essential oil // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2012. V. 67. P. 52–57.
- Austad S.N. Is aging programed? // *Aging Cell.* 2004. V. 3. P. 249–251.
- Austad S.N. Why We Age: What Science is Discovering About the Body's Journey Through Life. Chichester: John Wiley & Sons, Inc., 1999. 256 p.
- Beausejour C.M., Campisi J. Ageing: balancing regeneration and cancer // *Nature.* 2006. V. 443. P. 404–405.
- Bosch T.C.G. Stem Cells in Immortal Hydra // *Stem cells: from hydra to man.* Springer Netherlands, 2008. P. 37–57.
- Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors // *Cell.* 2005. V. 120. P. 513–522.
- Campisi J. Aging and cancer cell biology, 2007 // *Aging Cell.* 2007. V. 6. P. 261–263.
- Campisi J. Aging and cancer cell biology, 2008 // *Aging Cell.* 2008. V. 7. P. 281–284.
- Campisi J. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2011. V. 21. P. 107–112.
- Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer // *Annu. Rev. Physiol.* 2013. V. 75. P. 685–705.
- Campisi J., d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. P. 729–740.
- Campisi J., Yaswen P. Aging and cancer cell biology, 2009 // *Aging Cell.* 2009. V. 8. P. 221–225.
- Comfort A. Ageing: The Biology of Senescence. New-York—Chicago—San Francisco: Holt, Rinehart and Winston, Inc., 1964. 365 p.
- Conboy I.M., Conboy M.J., Wagers A.J. et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment // *Nature.* 2005. V. 433. P. 760–764.
- Estep P.W. Declining asexual reproduction is suggestive of senescence in hydra: comment on Martinez, D., "Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra" // *Exp. Gerontol.* 2010. P. 45. P. 645–646.
- Finch C.E. Longevity, Senescence, and the Genome. Chicago: University of Chicago Press, 1990. 938 p.
- Finch C.E. Comparative perspectives on plasticity in human aging and life spans // *Between Zeus and the Salmon. The Biodemography of Longevity* / Eds. K.W. Wachter and C.E. Finch. Washington, D.C.: National Academy Press, 1997. P. 245–268.
- Frosina G. Counteracting spontaneous transformation via overexpression of rate-limiting DNA base excision repair enzymes // *Carcinogenesis.* 2001. V. 22. P. 1335–1341.
- Gensler H.L., Bernstein H. DNA damage as the primary cause of aging // *Q. Rev. Biol.* 1981. V. 56. P. 279–303.
- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1965. V. 37. P. 614–636.
- Hayflick L. Progress in cytoogerontology // *Mech. Ageing Dev.* 1979. V. 9. P. 393–408.
- Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1961. V. 25. P. 585–621.
- Holliday R. Aging: The Paradox of Life. Why we Age. Dordrecht: Springer, 2007. 148 p.
- Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992. V. 663. P. 475–476.
- Khokhlov A.N. Cell proliferation restriction: is it the primary cause of aging? // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998. V. 854. P. 519.
- Khokhlov A.N. Cytoogerontology at the beginning of the third millennium: from "correlative" to "gist" models // *Russ. J. Dev. Biol.* 2003. V. 34. P. 321–326.
- Khokhlov A.N. Does aging need an own program or the existing development program is more than enough? // *Russ. J. Gen. Chem.* 2010a. V. 80. P. 1507–1513.
- Khokhlov A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytoogerontological studies // *Biophysics.* 2010b. V. 55. P. 859–864.
- Khokhlov A.N. Can cancer cells age? Stationary cell culture approach to the problem solution // *Visualizing of senescent cells in vitro and in vivo. Programme and abstracts (Warsaw, Poland, 15–16 December 2012).* Warsaw, Poland, 2012. P. 48–49.
- Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // *Curr. Aging Sci.* 2013. V. 6. P. 14–20.
- Khokhlov A.N., Wei L., Li Y. et al. Teaching cytoogerontology in Russia and China // *Adv. Gerontol.* 2012. V. 25. P. 513–516.
- Macieira-Coelho A. Cell division and aging of the organism // *Biogerontology.* 2011. V. 12. P. 503–515.
- Martínez D. Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra // *Exp. Gerontol.* 1998. V. 33. P. 217–225.
- Martínez D.E., Bridge D. Hydra, the everlasting embryo, confronts aging // *Int. J. Dev. Biol.* 2012. V. 56. P. 479–487.
- Medvedev Zh.A. On the immortality of the germ line: genetic and biochemical mechanism. A review // *Mech. Ageing Dev.* 1981. V. 17. P. 331–359.
- Mikhelson V.M. Replicative mosaicism might explain the seeming contradictions in the telomere theory of aging // *Mech. Ageing Dev.* 2001. V. 122. P. 1361–1365.
- Olovnikov A.M. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory // *Exp. Gerontol.* 1996. V. 31. P. 443–448.
- Olovnikov A.M. Hypothesis: lifespan is regulated by chromosome DNA of the hypothalamus // *J. Alzheimer's Dis.* 2007a. V. 11. P. 241–252.
- Olovnikov A.M. Role of paragenome in development // *Russ. J. Dev. Biol.* 2007b. V. 38. P. 104–123.
- Sikora E., Arendt T., Bennett M. et al. Impact of cellular senescence signature on ageing research // *Ageing Res. Rev.* 2011. V. 10. P. 146–152.
- Skulachev V.P. Aging is a specific biological function rather than the result of a disorder in complex living systems: biochemical evidence in support of Weismann's hypothesis // *Biochemistry (Mosc.).* 1997. V. 62. P. 1191–1195.

- Skulachev V.P.* Phenoptosis: programmed death of an organism // *Biochemistry (Mosc.)*. 1999. V. 64. P. 1418–1426.
- Skulachev V.P.* Aging as a particular case of phenoptosis, the programmed death of an organism (a response to Kirkwood and Melov “On the programmed/non-programmed nature of ageing within the life history”) // *Aging (Albany NY)*. 2011. V. 3. P. 1120–1123.
- Vilenchik M.M., Khokhlov A.N., Grinberg K.N.* Study of spontaneous DNA lesions and DNA repair in human diploid fibroblasts aged in vitro and in vivo // *Studia biophysica*. 1981. V. 85. P. 53–54.
- Wei L., Li Y., He J. et al.* Teaching the cell biology of aging at the Harbin Institute of Technology and Moscow State University // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2012. V. 67. P. 13–16.
- Yablonskaya O.I., Ryndina T.S., Voeikov V.L. et al.* A paradoxical effect of hydrated C₆₀-fullerene at an ultralow concentration on the viability and aging of cultured Chinese hamster cells // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2013. V. 68. P. 63–68.
- Zahidov S.T., Hohlov A.N., Malolina E.A. et al.* Ageing of the spermatogenesis system // *Biol. Bull.* 2010. V. 37. P. 10–17.

Impairment of Regeneration in Aging: Appropriateness or Stochastics?¹

A. N. Khokhlov

Evolutionary Cytogerotology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia 119991, Leninskiye Gory 1, building 12.

E-mail: khokhlov@genebee.msu.su

Received May 9, 2013; in final form, June 25, 2013

Abstract—There is a viewpoint that suppression of the proliferative capacity of cells and impairment of the regeneration of tissues and organs in aging are a consequence of specially arisen during evolution mechanisms that reduce the risk of malignant transformation and, thus, protect against cancer. At the same time, senescent cells of the body begin to accumulate a variety of macromolecular defects, which, conversely, increase the likelihood of their transformation into cancer cells. Thus, according to the point, the restriction of cell proliferation is a double-edged sword, which, on the one hand, reduces the likelihood of developing cancer at an early age, but on the other hand — limits life span due to the accumulation of “damaged” cells in old age. However, it remains unclear why normal human cells in vitro, with none of the mentioned “anticancer” barriers functioning at the organismal level only, NEVER undergo spontaneous malignant transformation. In addition, it is also unclear how the freshwater hydra which, under certain conditions, has really no postmitotic and senescent cells, escapes both aging and cancer and, at such conditions (excluding the need for sexual reproduction), can live almost indefinitely, having a great regenerative potential (new organism can arise even from a 1/100 of the old one). I believe that the restriction of cell proliferation in an aging multicellular organism is not a consequence of implementing a special program. Apparently, there is no special program of aging. It is only a “byproduct” of the program of development, implementation of which in higher organisms suggests the need for the emergence of cell populations with very low or even zero proliferative activity, which determines the limited capacity of relevant organs and tissues to regenerate. At the same time, it is the presence of highly differentiated cell populations, barely able or completely unable to reproduce (neurons, cardiomyocytes, hepatocytes), that ensures the normal functioning of the higher animals and humans. Even the regeneration of these organs with the help of stem cells could lead to a breach of the necessary interactions in complex systems. Reductionism in experimental-gerontological research (“everything is determined by deleterious changes in single cells”) that has become widespread in recent decades, stimulated the emergence of a number of model systems for studying mechanisms of aging in isolated cells (Hayflick phenomenon, the model of “stationary phase aging”, the cell-kinetic model for testing geroprotectors and geropromoters, etc.). However, at present it seems that the data obtained in such models cannot be automatically applied to the situation in the whole organism. Apparently, the impairment of regulatory processes, realized at the neurohumoral level, still plays the main role in the mechanisms of aging of multicellular organisms, not just the accumulation of macromolecular defects in individual cells. It is possible that it is the deterioration of such regulation that may be the cause of the observed abnormal INCREASE of the intensity of proliferation of some cell populations in old age, resulting in senile acromegaly and age-related rise of numerous benign tumors. It seems that the quality of the cells themselves does not worsen with age as much as reliability of the organism CONTROL over cells, organs and tissues, which leads to an increase in the probability of death.

Keywords: aging, regeneration, program, cell proliferation, cell senescence, cancer

¹ The paper is based on the plenary lecture delivered at the international conference “Regenerative Medicine: Topical Issues” (October 4–5, 2012, Kyiv, Ukraine).

УДК 591

**ПАМЯТИ АНДРЕЯ ПАВЛОВИЧА ДЫБАНА
(18.04.1922–24.02.2013)**

DOI: 10.7868/S0475145013060086

24 февраля 2013 года, на 91-м году жизни, скончался выдающийся ученый профессор Андрей Павлович Дыбан. А.П. Дыбан служил науке 70 лет, 50 из которых в НИИ экспериментальной медицины (Санкт-Петербург).¹ Особенностью научного творчества А.П. Дыбана являлось то, что он не замыкался в рамках только одного научного направления, а, обладая энциклопедическими знаниями не только в области экспериментальной эмбриологии и научным предвидением, успешно развивал и вносил существенный вклад в новые научные области: экспериментальную тератологию, цитогенетику развития млекопитающих, генетику поведения, трансгеноз млекопитающих. Представители старшего и среднего поколений запомнили А.П. Дыбана как высокоинтеллектуального, обладавшего острым аналитическим умом ученого, блестящего полемиста и оратора, чьи выступления

были залогом переполненных аудиторий; как красивого, духовно богатого, порядочного, интеллигентного, свободно владевшего английским, немецким, польским, украинским языками, большого личного обаяния человека. Он был не только ученым теоретиком, автором многочисленных обзоров и монографий, послуживших научным базисом для нескольких поколений ученых, но и блестящим экспериментатором, работавшим своими руками до 85 лет, автором цитологических, цитогенетических, гистологических методов. У истоков многих успешно развивающихся в настоящее время направлений стоят пионерские фундаментальные, ставшими классическими, исследования Андрея Павловича Дыбана, получивших заслуженное всемирное признание ученых, изучающих механизмы нормального и патологического развития лабораторных животных и человека: эмбриологов, биологов развития, тератологов, цитогенетиков.

¹ Подробная биография и характеристика научных достижений А.П. Дыбана содержатся в юбилейной статье, посвященной его 90-летию (Онтогенез 2012. Т. 43. № 6. С. 447–449).

Редколлегия журнала "Онтогенез"

УДК 591

ПАМЯТИ ВЛАДИМИРА НИКИТИЧА ЯРЫГИНА (10.01.1942–10.06.2013)

DOI: 10.7868/S0475145013060098



10 июня 2013 г. на 72-м году жизни после тяжелой непродолжительной болезни скончался известный ученый, выдающийся организатор науки и преподаватель Владимир Никитич Ярыгин — Академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, член Президиума РАМН, заведующий кафедрой биологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова.

В.Н. Ярыгин родился в семье врачей 10 января 1942 г. В 1958 г. окончил с золотой медалью среднюю школу в г. Ярославле. Вся дальнейшая его жизнь связана со 2-м Московским медицинским институтом. В 1964 г. он с отличием окончил институт и продолжил обучение в аспирантуре на кафедре гистологии, которую окончил досрочно. В 1966 г. защитил кандидатскую диссертацию, посвященную сравнительному цитологическому анализу одно- и двухъядерных нервных клеток. Его докторская работа “Экспериментальный анализ цитологических проявлений компенсаторной реакции нейрона” защищена в 1974 г. В 1978 г. В.Н. Ярыгину было присвоено ученое звание профессора.

Владимир Никитич работал ассистентом кафедры гистологии, затем старшим научным сотрудником ЦНИЛ, доцентом кафедры морфоло-

гии медико-биологического факультета. С сентября 1975 г. до кончины в июне 2013 г. он руководил кафедрой биологии 2-го МОЛГМИ (РНИМУ) им. Н.И. Пирогова. С 1978 по 1984 гг. являлся деканом факультета повышения квалификации преподавателей, затем деканом лечебного факультета и проректором по учебной работе. В ноябре 1984 г. стал ректором 2-го Московского государственного медицинского института и в этой должности работал до июля 2007 г. В эти годы открыты три новых факультета, организованы новые кафедры, среди которых кафедра неонатологии, детской анестезиологии и реанимации, управления и экономики здравоохранения.

В.Н. Ярыгин читал студентам мединститута курс лекций по биологии. Он выступал с лекциями также в университетах США и в Китае. Возглавляемый им коллектив кафедры биологии активно усовершенствовал программы по биологии для медицинских вузов страны с учетом современных достижений в молекулярной биологии, молекулярной генетики, клеточной биологии, геномики и биологии развития, общей и медицинской экологии. Под руководством В.Н. Ярыгина создан учебно-методический комплекс по медицинской биологии, включающий курс лекций, учебники для медицинских вузов и средних специальных учебных заведений, пособия по биологии для поступающих в вуз. Комплекс удостоен в 1997 г. премии по образованию Правительства РФ.

В.Н. Ярыгин — соавтор и титульный редактор учебника по биологии для студентов медицинских вузов в одном томе (1984) и в двух томах (10 изданий), учебника для средних медицинских учебных заведений (9 изданий), пособия по биологии для поступающих в медицинские вузы (13 изданий), учебного пособия базового курса биологии для бакалавров (6 изданий), учебника углубленного курса биологии для бакалавров (2012), учебника по биологии в 2-х томах для студентов медицинских вузов (2011).

Научные интересы В.Н. Ярыгина были сначала связаны с изучением механизмов пластичности нервной системы. В последнее время руководимый им коллектив сосредоточился на изучении клеточных механизмов развития различных тканей, особенно на исследовании биологии стволовых и прогениторных клеток с целью создания терапевтических биомедицинских клеточных техно-

логий нового поколения. Он был координатором отраслевой научной программы РАМН “Новые клеточные технологии — медицине (2002—2012 гг.)”, В.Н. Ярыгин — лауреат премии Правительства РФ в области науки и техники (2005). Он почетный доктор Ярославской государственной медицинской академии. Награжден рядом орденов РФ.

В.Н. Ярыгина будут долго помнить и как главного редактора журнала “Бюллетень экспериментальной биологии и медицины” — ведущего медико-биологического журнала России. Он достойно продолжил традиции этого журнала, заложенные выдающимися предшественниками. Он был также главным редактором нового журнала “Клеточные технологии в биологии и медицине”.

Со студенческих дней В.Н. Ярыгин был тесно связан с Институтом биологии развития РАН. Здесь в лаборатории цитологии он выполнил и кандидатскую и докторскую свои работы. Затем до последних дней он обсуждал с нами свои научные планы. Не раз выступал на совете института, участвовал в школах по биологии развития. В течение многих лет В.Н. Ярыгин был активным членом редколлегии журнала “Онтогенез”. Он компетентно и с интересом обсуждал представленные в журнал статьи по медицинским аспектам онтогенеза. Нам очень будет его не хватать, и не только как коллеги по профессии. Для многих сотрудников он был близким товарищем, хорошим отзывчивым и умным человеком.

Отец Владимира Никитича, профессор Никита Еремеевич Ярыгин (1917—2004) — один из организаторов Ярославского медицинского института, ректор (1955—1968). Сестра — Т.Н. Ярыгина-Николаева, профессор, зав. кафедрой факультетской педиатрии этого института. Брат — К.Н. Ярыгин —

член-корр. РАМН, зав. лаб. клеточных технологий Института биомедицинской химии РАМН. В.Н. Ярыгин вырастил двух сыновей.

Основные публикации В.Н. Ярыгина

Ярыгин Н.Е., Ярыгин В.Н. Патологические и приспособительные изменения нейрона. М.: Медицина, 1973. 191 с.

Ярыгин В.Н. Популяционный подход в исследовании количественного аспекта нейротканевых отношений / В кн.: Нервно-сосудистое обеспечение тканевых процессов. М., 1979. С. 5—14.

Ярыгин В.Н. Динамика компенсаторных процессов в популяции симпатических нейроцитов / В кн.: Цитологические механизмы гистогенезов. М.: Наука, 1979. С. 186—196.

Родионов И.М., Ярыгин В.Н., Мухаммедов А.А. Иммунологическая и химическая десимпатизация. М.: Наука, 1988. 150 с.

Ярыгин В.Н., Ярыгин К.Н. “Исследования в области стволовых клеток — ключ к пониманию механизмов регенерации тканей” / В кн.: Вопросы морфологии и патологии. М., 2007. С. 28—69.

Ярыгин В.Н. и А.С. Мелентьев. Руководство по геронтологии и гериатрии в четырех томах. М.: Гэотар Медиа, Т. IV (2004, 2008), Т. II (2005), Т. III (2007), Т. I (2009). (Титульный редактор, совместно с проф. А.С. Мелентьевым, и соавтор).

Ярыгин В.Н., Глинкина В.В., Волков И.Н., Васильева В.И., Синельщикова В.В. Биология, учебник для студентов медицинских вузов в двух томах (10-е издание). Гэотар Медиа, 2012.

*Клямкин А.Г., Мустафин А.Г.,
Бродский В.Я., Васецкий С.Г.*