

СОДЕРЖАНИЕ

Том 51, номер 5, 2020

ОБЗОРЫ

Моделирование раннего развития эмбрионов мыши и человека *in vitro*

Л. Ш. Измайлова, Е. А. Воротеляк, А. В. Васильев

323

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

Экспрессия и роль серотонинового рецептора 1a типа
в эмбриональном тимусе крыс

Н. В. Лифанцева, Ц. О. Конеева, С. Н. Воронова,
Г. В. Луценко, Л. А. Захарова, В. И. Мельникова

338

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

Механизм прорастания пыльцы и рост пыльцевых трубок
у можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.) *in vitro*

М. В. Сурсо, Д. Г. Чухчин, С. С. Хвиюзов, С. А. Покрышкин

351

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

мРНК генов Толл-подобных рецепторов экспрессируются
в тканях глаза плодов человека

О. В. Бурменская, Р. А. Полтавцева, И. Г. Панова

363

Интрацитоплазматическая трансдукция кальция в сперматозоидах
Bos taurus при капацитации и акросомной реакции

В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина

369

МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

Особенности пула протеасом в спонтанно возникающих
злокачественных опухолях молочной железы мышей

Т. М. Астахова, Е. В. Моисеева, Н. П. Шарова

379

In silico анализ регуляторных *цис*-элементов в промоторах генов, кодирующих
апопластную инвертазу и сахарозосинтазу у березы повислой

Т. В. Тарелкина, Н. А. Галибина, Ю. Л. Мощенская, Л. Л. Новицкая

386

Contents

Vol. 51, No. 5, 2020

REVIEWS

- Modeling of Early Development of Mouse and Human Embryos *in vitro*
L. Sh. Izmailova, E. A. Vorotelyak, and A. V. Vasiliev 323
-

BIOLOGY OF ANIMAL DEVELOPMENT (INVERTEBRATES AND VERTEBRATES)

- Expression and Role of Serotonin Receptor 1a in the Rat Embryonic Thymus
*N. V. Lifantseva, Ts. O. Koneeva, S. N. Voronova,
G. V. Lutsenko, L. A. Zakharova, and V. I. Melnikova* 338
-

DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF PLANTS

- Mechanism of Pollen Germination and Pollen Tubes Growth
in Common Juniper (*Juniperus communis* L.) *in vitro*
M. V. Surso, D. G. Chuhchin, S. S. Khviyuzov, and S. A. Pokryishkin 351
-

MOLECULAR BIOLOGY OF DEVELOPMENT

- mRNAs of Genes of Toll-like Receptors Are Expressed in Human Fetal Eye Tissues
O. V. Burmenskaya, R. A. Poltavtseva, and I. G. Panova 363
- Intracytoplasmic Calcium Transduction in *Bos taurus* Spermatozoa
at Capacitation and Acrosome Reaction
V. Yu. Denisenko and T. I. Kuzmina 369
-

MECHANISMS OF NORMAL AND PATHOLOGICAL TISSUE DEVELOPMENT

- Features of Proteasome Pool in Spontaneously Occurring Malignant Tumors
of the Mammary Gland in Mice
T. M. Astakhova, E. V. Moiseeva, and N. P. Sharova 379
- In silico* Analysis of Regulatory *cis*-Elements in the Promoters of Genes
Coding Apoplastic Invertase and Sucrose Synthase in Silver Birch
T. V. Tarelkina, N. A. Galibina, Yu. L. Moshchenskaya, and L. L. Novitskaya 386
-

МОДЕЛИРОВАНИЕ РАННЕГО РАЗВИТИЯ ЭМБРИОНОВ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

© 2020 г. Л. Ш. Измайлова^{а, *}, Е. А. Воротеляк^а, А. В. Васильев^{а, б}

^аИнститут биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

^бМГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра эмбриологии,
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

*e-mail: luba.ranaway-94@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.03.2020 г.

После доработки 12.05.2020 г.

Принята к публикации 15.05.2020 г.

Эмбриональное развитие млекопитающих включает преимплантационный этап, имплантацию и постимплантационное развитие, во время которого эмбрион прикреплен к стенке матки материнского организма. Моделирование развития эмбрионов в культуре позволяет изучить процесс онтогенеза в динамике, что особенно ценно для изучения раннего постимплантационного развития. Мы приводим обзор существующих систем культивирования для эмбрионов мыши и человека. Также рассмотрен новый экспериментальный подход для изучения раннего эмбриогенеза млекопитающих — эмбриоподобные клеточные конструкторы. С помощью этих методов были получены важнейшие результаты в области закладки зародышевых листков эмбриона мыши и человека, молекулярных и клеточных механизмов морфогенеза. Цель этого обзора — обобщение возможностей и ограничений таких систем для изучения эмбриогенеза млекопитающих и поиск направлений для дальнейшего развития этого подхода.

Ключевые слова: культивирование эмбрионов, эмбриональное развитие, мышь, человек, моделирование имплантации

DOI: 10.31857/S0475145020050043

ВВЕДЕНИЕ

Системы для культивирования эмбрионов млекопитающих разрабатываются для изучения раннего эмбрионального развития и его патологий. Данный подход позволяет оценить непосредственный эффект экспериментальных воздействий, тогда как любые воздействия на эмбрион, находящийся в матке, опосредуются материнским организмом. Кроме того, это позволяет изучать процесс онтогенеза в динамике. Для нормального развития эмбриона *in vitro* необходимо воссоздать условия внутри материнского организма, что является непростой задачей (Piliszek, Kwon, 2011; Esteves et al., 2013).

Преимплантационное развитие эмбриона мыши включает дробление зиготы, хетчинг, или выход из блестящей оболочки и образование первых трех клеточных слоев будущего эмбриона: трофэктодермы, эпибласта и гипобласта. Раннее эмбриональное развитие человека во многом похоже, однако есть ряд отличий. Например, разделение внутренней клеточной массы на две субпопуляции происходит у эмбриона человека уже после им-

плантации. У мыши имплантация происходит примерно на 5 сутки после оплодотворения. Эмбрион человека проходит имплантацию на 7-е или 8-е сутки развития. Эмбрионы, которые не смогли прикрепиться к стенке матки, останавливаются в развитии и вскоре погибают. Момент имплантации эмбриона долгое время был временным рубежом, который не могли преодолеть при культивировании эмбрионов мыши и человека *in vitro*. Не удавалось добиться прикрепления эмбриона и продолжения его развития. На данный момент удалось добиться имплантации эмбрионов как мыши, так и человека на искусственную подложку и пронаблюдать последующее раннее постимплантационное развитие в культуре (Bedzhov et al., 2014; Deglincerti et al., 2016).

Новые сведения в области раннего эмбрионального развития человека необходимы для усовершенствования вспомогательных репродуктивных технологий и для решения проблем, возникающих при естественной репродукции (Shahbazi et al., 2016). Однако изучение эмбрионов человека неоднозначно с этической точки зрения. Основным до-

кументом, регулирующим научную работу с использованием эмбрионов человека, является “Руководство по проведению исследований стволовых клеток эмбриона человека”, выпущенное Международным обществом исследований стволовых клеток. Эмбрион человека в соответствии с международными нормами можно культивировать только до 14-х суток развития или до первых признаков начала гаструляции, то есть до образования первичной полоски (ISSCR, 2006). В связи с этим в условиях *in vitro* возможно наблюдать только процесс имплантации, преимплантационное и раннее постимплантационное развитие эмбриона человека (Piliszek, Kwon, 2011; Bedzhov et al., 2014; Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014; Deglincerti et al., 2016).

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ МЕТОДА ПОДДЕРЖАНИЯ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ В КУЛЬТУРЕ

Первая система моделирования имплантации эмбрионов млекопитающих *in vitro* была описана в 1970-м г. Дженкинсоном и Уилсоном (Jenkinson, Wilson, 1970). Эмбрионы культивировали на субстрате, состоящем из фрагмента хрусталика глаза быка. Ученым удалось добиться прикрепления эмбриона к подложке и пронаблюдать начало образования зародышевого цилиндра. В этой работе подтверждается важность прикрепления бластоцисты к субстрату для продолжения развития и образования зародышевого цилиндра. В связи с этим имплантацию начали изучать отдельно.

Для имплантации эмбриону необходимо освободиться из блестящей оболочки. Как правило, эмбрион сам способен сделать это, но при культивировании удаление блестящей оболочки делает более вероятным прикрепление бластоцисты к подложке (Khalifa et al., 1992; Piliszek, Kwon, 2011; Bedzhov et al., 2014; Shahbazi et al., 2016; Deglincerti et al., 2016).

Для моделирования имплантации эмбриона важен тип субстрата. Поверхность должна иметь подходящую жесткость, быть адгезивной и позволять качественно визуализировать прикрепленный эмбрион. В работах, посвященных моделированию имплантации эмбриона мыши использовали различные типы субстрата: пластик без дополнительного покрытия, ламинин, фибронектин (Carson et al., 1988; Kauma, Matt, 1995), а также клеточные подслои (Bouillon et al., 2016). Было показано, что сокультивирование эмбрионов с культурой клеток эндометрия повышает вероятность образования бластоцисты и имплантации эмбриона после переноса в матку (Simón et al., 1999).

Для имплантации и последующего развития эмбриона мыши культуральная среда должна содержать сыворотку крови и гормоны: эстроген и прогестерон (Hsu, 1973; Hsu, 1979; Ma et al., 2003). Эти гормоны участвуют в процессе имплантации *in vivo*, могут продлить период рецептивности люминального эпителия, однако их воздействие на бластоцисту пока не до конца ясно (Ma et al., 2003; Bedzhov et al., 2014; Shahbazi et al., 2016; Deglincerti et al., 2016). Трудности в получении сыворотки, а также непостоянство ее состава и угроза вирусной контаминации привели к необходимости снижения доли сыворотки в среде или замены ее другими факторами, например, альбумином (Bentin-Ley et al., 2000; Tao et al., 2013; Morris et al., 2012; Bedzhov et al., 2014; Roode et al., 2012). Однако, было показано, что при хранении в средах и белковых добавках с альбумином, из-за деградации аминокислот, накапливается аммоний, что может быть губительно для эмбрионов (Kleijkers et al., 2016).

В работах Хсу (Hsu, 1973, 1974, 1979) впервые показано преодоление имплантационного барьера и длительное, в течение 8-ми суток после помещения бластоцист в культуру, развитие эмбриона *in vitro*. Эмбрион мыши прикрепляется к подложке из коллагена и развивается до стадии семи сомитов, что соответствует практически половине эмбриогенеза мыши *in vivo*. Было показано, что после образования зародышевого цилиндра эмбрионы могут развиваться и в неприкрепленном состоянии в течение трех суток. Метод кратковременного культивирования не прикрепленного эмбриона мыши, изъятых из матки в постимплантационный период, был разработан в 1966 г. и носит название Whole Embryo Culture (WEC) (New, 1966).

В 1970 г. коллектив авторов из Кембриджского университета, Роберт Эдвардс с коллегами (Edwards et al., 1971), впервые культивировали эмбрион человека. Авторы провели искусственное оплодотворение яйцеклетки человека *in vitro* и культивировали эмбрион до 16-ти клеточной стадии. Однако, моделирование процесса имплантации эмбриона человека еще долгое время оставалось нерешенной проблемой. Начиная с 70-х гг. XX в., начинается активное развитие методов культивирования эмбрионов человека и вспомогательных репродуктивных технологий. Благодаря чему, в 1978 году родился первый ребенок, полученный при помощи экстракорпорального оплодотворения (Steptoe, Edwards, 1978).

Что касается культивирования эмбриона человека в постимплантационный период, то на данный момент его поддержание в культуре после 14-ти су-

ток развития или после начала образования первичной полоски ограничено в большинстве стран (Pera et al., 2015). В связи с этим культивирование эмбриона человека в постимплантационный период ограничивается периодом, начиная от 8-х суток развития, когда культивируемый эмбрион прикрепился к модельному субстрату, до 14-х суток. Моделирование имплантации на искусственный субстрат и раннее постимплантационное развитие эмбриона человека *in vitro* впервые осуществили только в 2016 году (Shahbazi et al., 2016; Deglincerti et al., 2016).

ВНЕШНИЕ МЕХАНИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ

На развитие эмбриона *in vivo* влияют внешние механические сигналы, поступающие от материнских тканей: жесткость субстрата, наличие и размер внешней полости, ограничивающей развитие эмбриона. Некоторые исследователи полагают, что механические сигналы являются важнейшими регуляторами в определенные этапы развития эмбриона (Kolahi et al., 2012; Hiramatsu et al., 2013). В других работах высказывается предположение, что развитие эмбриона полностью задано внутренними сигналами и факторами, получаемыми из среды (Bedzhov et al., 2015).

Было показано, что механические сигналы определяют развитие эмбриона мыши в период до стадии бластоцисты. В проведенном исследовании учитывались следующие параметры: процент эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, количество клеток в эмбрионе, процент выхода бластоцист из блестящей оболочки. Было рассмотрено изменение параметров в зависимости от жесткости субстрата к которому прикреплялся эмбрион (культуральный пластик или более мягкие, близкие по плотности к эпителию матки, например, коллагеновый гель). По всем рассмотренным характеристикам эмбрионы лучше развивались на мягком субстрате. Интересно, что уровень экспрессии генов, участвующих в ответе на механические стимулы (*Ctgf* и *Ankrd1*) не отличался между двумя группами эмбрионов, культивировавшихся на разных по плотности субстратах (Kolahi et al., 2012).

Было выдвинуто предположение о влиянии внешних механических сигналов на развитие эмбриона мыши в период непосредственно после имплантации (E5-E5.5), а именно на установление передне-задней оси тела эмбриона. В работе эмбрионы помещали в модельную полость, созданную из полидиметилсилоксана. Наличие внешней полости, ограничивающей развитие эмбриона было необходимо для формирования дистальной

висцеральной энтодермы, что в свою очередь важно для установления передне-задней оси тела эмбриона. В норме клетки дистальной висцеральной энтодермы мигрируют и дают начало антериальной висцеральной энтодерме, которая отвечает за подавление активности постериальных сигнальных путей (Wnt, Nodal) на переднем конце эмбриона (Hiramatsu et al., 2013). Эмбрионы помещались в микрополости, имитирующие полость желточного мешка. Было показано, что элонгация зародышевого цилиндра и появление клеток, экспрессирующих маркеры дистальной висцеральной энтодермы, происходило лишь в тех эмбрионах, которые находились в микрополостях, соответствовавшей по ширине полости желточного мешка. Кроме того, для прохождения этих процессов также требовалось, чтобы жесткость стенок микрополости соответствовала жесткости тканей, окружающих эмбрион при развитии в материнском организме. Культивирование в ограниченном пространстве также способствует разрушению базальной мембраны между эпибластом и висцеральной энтодермой за счет наибольшего напряжения мембраны как раз на дистальном конце эмбриона. Разрыв мембраны, в свою очередь, определяет место возникновения клеток дистальной висцеральной энтодермы (Hiramatsu et al., 2013).

В дальнейшем была опубликована другая статья, авторы которой показали возможность образования дистальной висцеральной энтодермы и при отсутствии внешних факторов. В этой работе использовали линию трансгенных мышей, у которых зеленый флуоресцентный белок экспрессировался под промотором гена *Cer1*, маркера дистальной висцеральной энтодермы. Эта модификация позволила наблюдать за появлением и миграцией клеток этого типа. Было показано, что удлинение зародышевого цилиндра и возникновение дистальной висцеральной энтодермы происходит и в отсутствие каких-либо внешних механических сигналов при культивировании в височной капле (Bedzhov et al., 2015).

Результаты согласуются с тем фактом, что первые клетки, экспрессирующие маркеры дистальной висцеральной энтодермы, появляются еще на стадии бластоцисты, когда эмбрион находится в неприкрепленном состоянии в полости матки (Morris et al., 2012). Вместе эти данные указывают на то, что образование дистальной висцеральной энтодермы и установление передне-задней оси зародыша — это процессы в большей степени заданные самоорганизацией эмбриона и не зависящие от внешних механических сигналов. Беджов с соавторами (Bedzhov et al., 2015) предлагают в качестве возможного объяснения расхождения в

результатах с работой Хираматсу (Hiramatsu et al., 2013) разные условия культивирования, а именно состав среды, и выдвигают предположение, что оптимально подобранные условия поддерживают установление передне-задней оси эмбриона и в отсутствие внешних механических сигналов.

Влияние механических сигналов на развитие эмбриона позвоночных подробно изучалось Л.В. Белоусовым (Belousov, 2015), который активно развивал идею о том, что в основе морфогенеза лежат не только химические и молекулярные внутренние взаимодействия, но и механические сигналы. Им было показано, что эмбрион лягушки способен генерировать механический ответ для противодействия внешним деформирующим воздействиям (сжатие или растяжение) (Belousov et al., 2000). При релаксации натяжения ткани в зародыше шпорцевой лягушки на стадии бластулы развитие полностью дезорганизуется, а на стадии гастрюлы такие манипуляции вызывают нарушение развития осевых структур (Ambrosi et al., 2017). Это направление исследований Л.В. Белоусов назвал морфомеханикой.

СООТВЕТСТВИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭМБРИОНОВ НОРМАЛЬНОМУ ЭМБРИОНАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ *IN VIVO*

Для того чтобы изучать эмбриональное развитие на моделях *in vitro* важно ответить на вопрос: соответствует ли развитие эмбриона в культуре тому, как оно проходит *in vivo*? Проблема тут заключается в том, что культуральные системы создаются как раз для того, чтобы детально изучить и понять сам процесс нормального эмбрионального развития, многие моменты которого пока не ясны.

Морфогенез in vitro u in vivo

Для эмбриона мыши *in vitro* было показано развитие от стадии бластоцисты до стадии зародышевого цилиндра с преодолением имплантационного барьера (Morris et al., 2012; Bedzhov et al., 2014). При формировании зародышевого цилиндра бластоциста претерпевает трансформацию, сопровождаемую активной пролиферацией клеток. Трофэктодерма дает начало экстраэмбриональной эктодерме, которая впоследствии образует эмбриональную часть плаценты. Эпибласт и экстраэмбриональная эктодерма пролиферируют и оказываются окруженными висцеральной энтодермой (производная примитивной энтодермы) (Bedzhov et al., 2014). Анализ экспрессии маркеров показал образование всех основных клеточных типов, характерных для раннего зародыша

у эмбриона, прошедшего имплантацию в искусственной модельной системе. Эмбрион, развивавшийся *in vitro*, на стадии зародышевого цилиндра имеет чашеобразный эпибласт, состоящий из поляризованных клеток. Клетки эпибласта положительны по маркеру плюрипотентности Oct4 и имеют нормальный паттерн экспрессии апикального маркера Par6. Экспрессия Eomes маркирует постериальный эпибласт, висцеральную энтодерму и внезародышевую эктодерму. Кроме того, у полученного в культуре зародышевого цилиндра наблюдается характерное распределение экспрессии Cdx2 и GATA4 — маркеров внезародышевой эктодермы и висцеральной энтодермы соответственно. Также было показано, что примерно через 6.5 сут после оплодотворения у культивируемого эмбриона можно наблюдать экспрессию Cer1, которая обозначает образование антериальной висцеральной энтодермы (Morris et al., 2012; Bedzhov et al., 2014). Напротив нее в соответствии с тем, что происходит при нормальном развитии, была детектирована экспрессия Brachyury. При внедрении в культивируемый эмбрион эмбриональных стволовых клеток они интегрируются в состав эпибласта, как это происходит в нормальном эмбрионе (Morris et al., 2012).

При образовании преамниотической полости эпибласт как *in vitro* так и *in vivo* образует вогнутую структуру, причем делает это не за счет механизма апоптоза, как ранее полагалось, исходя из данных, полученных при изучении развития эмбриональных телец (Couscouvanis, Martin, 1995), а за счет поляризации и реорганизации клеток под воздействием сигналов, передаваемых от базальной мембраны через β -интегриновые рецепторы (Bedzhov et al., 2014). Было показано, что преобразование эпибласта может происходить при подавлении апоптоза. Клетки эпибласта, изначально округлые, поляризуются и образуют розетку с единым центром, где образуется проамниотическая полость.

Постимплантационный эмбрион мыши демонстрирует нормальное развитие в культуре (Glanville-Jones et al., 2013; Drakou, Georgiades, 2015). Изолированный на стадии E5.5 эмбрион развивается до стадии поздней гастрюляции (E7.5). Эмбрионы, культивируемые с момента E5.5, продемонстрировали образование утолщенной дистальной висцеральной энтодермы, экспрессирующей характерный маркер Cer1, образование первичной полоски дополнительно верифицированное распределением экспрессии маркеров первичной полоски и мезодермы Brachyury и Mesp1. Все эмбрионы, культивируемые со стадии E5.5, достигли гастрюляции, но с небольшим отставанием от эмбрио-

нов, развивавшихся *in vivo* (Drakou, Georgiades, 2015).

В другой работе (Kalaskar, Lauderdale, 2014) эмбрионы мыши развивались в бессывороточной среде начиная со стадии E10.5 в течение 16–18 или 38–40 ч. После этого было произведено сравнение по ряду морфологических параметров с эмбрионами, развивавшимися в матке. Среди эмбрионов, которые развивались в культуре 16–18 ч, 58% были сравнимы с нормальными эмбрионами по размеру, количеству сомитов, размеру головы, развитию камер сердца, размеру мозга и зачатков конечностей; у них, также как у нормальных эмбрионов, присутствовал пигментный эпителий сетчатки. Развитие отставало от эмбрионов *in vivo* примерно на час. В той группе эмбрионов, которые развивались в культуре в течение 38–40 ч, 30–40% эмбрионов были схожи с контролем по ключевым морфологическим параметрам и отставали от него примерно на 2–3 ч. Интересно, что при сокультивировании нескольких эмбрионов вместе в 45% случаев выделялся один хорошо развитый эмбрион, сравнимый по развитию и размеру с контрольными эмбрионами, а все остальные отставали (Kalaskar, Lauderdale, 2014).

Возможные причины отставания в развитии части эмбрионов можно объяснить субоптимальными условиями и гипоксией, которым эмбрион подвергался при переносе из матки в культуру. Также это может быть результатом повреждения сосудов эмбриона или желточного мешка при переносе эмбриона (отчасти об этом свидетельствует частое недоразвитие конечностей у эмбрионов мыши в культуре, что может быть связано с недостаточностью кровоснабжения). Также эмбрионы, которые попадали в культуру на более поздних стадиях (E10.5), лучше переносили развитие *in vitro*, чем эмбрионы на более ранних стадиях (E10). Один из выводов, который можно сделать, что условия в культуре субоптимальны и чем дольше эмбрион находится в культуре, тем больше в его развитии будет наблюдаться различий с нормой (Kalaskar, Lauderdale, 2014).

Для эмбриона человека было показано развитие *in vitro* от стадии бластоцисты до ранней постимплантационной стадии (Deglincerti et al., 2016; Shahbazi et al., 2016). Было произведено детальное сравнение развития эмбрионов в культуре с тем, что известно о нормальном развитии эмбрионов *in vivo*. На 7–8 день в культуре бластоцисты прикрепилась к пластику и уплощались. Затем происходило деление Oct4+ эпибласта и GATA6+ гипобласта, что согласуется с данными, полученными по эмбрионам, развивавшимся *in vivo*. Далее в работе проследили развитие Oct4–/GATA6–/

GATA3+/CK7+ производных трофобласта. С восьмого дня трофобласт подразделяется на две популяции. Также как и при развитии *in vivo*, одна из них содержит клетки с одним ядром (цитотрофобласт), находящиеся вблизи к эпибласту и гипобласту, в то время как вторая состоит из многоядерных клеток (синцитиотрофобласт), располагающихся на периферии, имеющих фенотип HCGβ+. Также в прикрепившемся эмбрионе было показано образование проамниотической полости, проходящее за счет поляризации клеток эпибласта, а не апоптоза, что согласуется с результатами, полученными на мышках. Клетки предположительно Oct4+/Nanog+ эпибласта образовали полость и приобрели фенотип CD24+ (маркер зрелого эпибласта). Далее GATA6+ клетки гипобласта также образовали полость (предположительно полость желточного мешка). На 10–11 день культивирования эмбрион сформировал двухслойный диск: произошло деление Oct4+ клеток эпибласта на две популяции различающиеся по форме клеток, предположительно диск эпибласта и амниотический эпителий. Рядом с гипобластом клетки имели форму цилиндрического эпителия, а на противоположном полюсе рядом с трофобластом имели плоскую форму (Deglincerti et al., 2016; Shahbazi et al., 2016). Полученные данные указывают на то, что эмбрион человека в культуре демонстрирует развитие первых трех клеточных типов, амниотической полости, полости желточного мешка и образование двухслойного диска, а также деление трофобласта на цитотрофобласт и синцитиотрофобласт.

Изменения в экспрессии генов и метаболизме

Условия *in vitro* влияют на профиль экспрессии генов эмбриона (Rinaudo, Schultz, 2004; Giritharan et al., 2012; Mantikou et al., 2016; Mahdavinezhad et al., 2019). Гены с измененной экспрессией относятся к самым разным клеточным процессам: биогенез рибосом, синтез белка, апоптоз, регуляция клеточного цикла и пролиферации и связывание селена, мембранный транспорт (*Glut3*, *Aquaporin8*) (Rinaudo, Schultz, 2004), дифференцировка основных линий клеток и поддержание плюрипотентности (*Oct4*, *Nanog*, *Grb2*, *Gata6*) и имплантация (*Mmp9*) (Mahdavinezhad et al., 2019). Также во многих работах отмечено, что экспрессия различных генов различается в зависимости от среды, в которой культивировали эмбрион (Rinaudo, Schultz, 2004; Morbeck et al., 2014).

Среди работ, посвященных изменению экспрессии генов эмбриона в культуре особо отмечено изменение экспрессии импринтируемых ге-

нов (Doherty et al., 2000; Khosla et al., 2001), которая определяется уровнем метилирования. Было высказано предположение, что изменение экспрессии импринтируемых генов связано с изменением уровня метилирования генома, индуцированное факторами сыворотки (Khosla et al., 2001). Для эмбрионов, развивавшихся *in vitro*, показано понижение экспрессии генов: *Igf2* и *H19* и увеличение экспрессии гена *Grb10* (Khosla et al., 2001).

Для эмбрионов, развивавшихся *in vitro*, показана сниженная способность к имплантации при переносе в матку. Одна из возможных причин этого — нарушение дифференцировки трофэктодермы. Это также подтверждается при изучении профиля экспрессии клеток плаценты. Он существенно изменен у эмбрионов, находившихся в культуре в преимплантационный период (Fauque et al., 2010). Для развивавшегося *in vitro* эмбриона была показана пониженная экспрессия *Cdx2*, гена связанного с дифференцировкой трофэктодермы, и повышенная экспрессии *Oct4* и *Nanog* (Mahdavinezhad et al., 2019). *Cdx2* и *Oct4* взаимно ингибируют друг друга, так что полученный результат вполне логичен. Также показано, что профили экспрессии эпибласта и трофэктодермы значительно сильнее различаются у эмбриона *in vivo*, чем после культивирования *in vitro*, что подтверждает предположение о нарушении дифференцировки трофэктодермы в культуре (Giritharan et al., 2012).

Эффект, который оказывает на профиль экспрессии генов условия культивирования, в принципе показан в большом количестве работ. Однако, на это влияют также факторы, не связанные с условиями *in vitro*. Так, например, возраст матери влияет на профиль экспрессии генов эмбриона в большей мере (по числу генов с измененной экспрессией), чем содержание в культуре (Mantikou et al., 2016).

Моделирование имплантации

Важнейшим начальным событием в процессе имплантации как *in vivo*, так и *in vitro* является активация бластоцисты. Под воздействием стероидных гормонов клетки трофобласта дифференцируются и приобретает инвазивные свойства, а также секретирует факторы, например хориотропный гормон человека (ХГЧ), стимулирующие апоптоз люминального эпителия матки и дифференцировку клеток стромы в децидуальные клетки (в случае эмбриона мыши). После активации бластоциста прикрепляется к субстрату (Bedzhov et al., 2014). В норме трофэктодерма активно внедряется в стенку матки, но в модельной системе этого не проис-

ходит. Бластоциста не погружается в субстрат, даже если он состоит из мягкого вещества, например, коллагенового геля. Вероятно, инвазия эмбриона в стенку матки — это обоюдный процесс, в котором эмбрион участвует наравне с клетками эндометрия матки (Ashary et al., 2018).

Для моделирования событий, происходящих при имплантации, были предложены 3D культуральные системы, в которых субстрат для прикрепления похож на стенку матки. Он состоит из мягкого скэффолда, например: фибрин-агарозный матрикс (Wang et al., 2012), децеллюлированный матрикс эндометрия (Olalekan et al., 2017), матригель (Buck et al., 2015) и содержит клетки, выделенные из эндометрия (Bentin-Ley et al., 2000; Wang et al., 2012).

В таких 3D моделях воссоздается структура эндометрия и моделируются его ответ на гормоны и взаимодействие с эмбрионами. Было показано, что клетки в таких системах экспрессируют рецепторы эстрогена и прогестерона (Olalekan et al., 2017) и при обработке гормонами клетки эндометрия человека продуцирует маркеры децидуализации пролактин и IGFBP-1 (Olalekan et al., 2017), что повышает вероятность прикрепления эмбриона или его суррогата (например, сфероидов из клеток трофобласта) к подложке (Wang et al., 2013). Модельный эндометрий мыши децидуализируется в месте прикрепления эмбриона (Ye et al., 2012).

Другая часто используемая для изучения имплантации модель — это сокультивирование эмбриона или сфероидов из клеток трофобласта с монослоем клеток эндометрия без скаффолда. С использованием этой модели была показана роль стромы, как биосенсора качества эмбрионов (Teklenburg et al., 2010; Brosens et al., 2014). У человека клетки стромы эндометрия по-разному отвечают на кокультивирование с нормальными эмбрионами и с эмбрионами низкого качества (замершими в развитии или с высоким процентом фрагментации). Кокультивирование с эмбрионами может повлиять на миграцию стромы, профиль ее экспрессии или секреции. Среда, кондиционированная эмбрионами низкого качества, вызвала снижение в клетках стромы уровня экспрессии шаперона SHC70, что вызвало стресс эндоплазматического ретикулума (Brosens et al., 2014). В другой работе эмбрион низкого качества значительно повлиял на профиль секреции клеток стромы, произошло понижение секреции ряда интерлекинов и HB-EGF (Teklenburg et al., 2010). С другой стороны, было показано, что среда, кондиционированная эмбрионами низкого качества не влияет на миграцию децеллюлированных

клеток стромы, а среда, кондиционированная эмбрионами высокого качества, повышает миграцию децудуализированных клеток стромы, но, как ни странно, подавляет миграцию не децудуализированных клеток стромы (Berkhout et al., 2018). На профиль экспрессии и секреции недецудуализированной стромы эмбрионы никак не повлияли (Teklenburg et al., 2010).

Имеющиеся результаты сложно сопоставлять друг с другом потому что в разных работах по-разному определяется качество эмбриона: как процент фрагментации (Berkhout et al., 2018), или способность к имплантации после переноса в матку. Однако, эти результаты предполагают, что строма играет роль биосенсора, чувствительного к качеству имплантирующегося эмбриона, а не является пассивным субстратом для внедрения.

Было показано, что факторы, выделяемые эмбрионом, и гормоны также влияют на рецептивность клеток эпителия эндометрия. Инкубация в среде, кондиционированной эмбрионами человека, успешно имплантировавшимися после переноса в матку, повышает вероятность того, что к эпителию прикрепятся клетки трофобласта (Cuman et al., 2013). В работе (Evans et al., 2019) показано, что клетки эпителия эндометрия наиболее рецептивны при воздействии гормонов, имитирующих гормональный фон в рецептивную фазу менструального цикла. Для изучения взаимного влияния эмбриона и эпителия была создана модель (Vergara et al., 2019), которая позволяет изучать изменения в транскрипции отдельно субстрата и модельного эмбриона после прикрепления. Авторы сокультивировали культуру клеток рецептивного и нерецептивного люминального эпителия со сфероидом из клеток JEG-3-GFP (генетически модифицированная линия клеток хориокарциномы человека, экспрессирующая зеленый флуоресцентный белок под промотором гена PGK). После прикрепления сфероидов возможно разделение GFP+ и GFP- фракций и отдельный анализ их при помощи метода РНК секвенирования.

Также на модели кокультивирования эмбриона или сфероидов из клеток трофобласта с монослоем клеток был изучен начальный этап имплантации — прикрепление эмбриона к люминальному эпителию. Мембранный белок CD98 был предложен, как один из маркеров рецептивности эпителия эндометрия (Domínguez et al., 2010). Пик экспрессии CD98 в норме в человеческом эпителии приходится на окно имплантации, причем локализован он строго на апикальной поверхности клеток. Повышенный уровень экспрессии CD98 зафиксирован в тех местах, где к культуре клеток прикрепился эмбрион. Кроме того, при индук-

ции экспрессии CD98 в клетках нерецептивной линии люминального эпителия человека повышается процент прикрепления к этим клеткам бластоцист мыши (Domínguez et al., 2010).

В прикреплении эмбриона участвуют также интегрины. Интегрин $\beta 3$ важен для прохождения имплантации (Kaneko et al., 2011), подавление его экспрессии при помощи малых интерферирующих РНК в клетках Ишикава (клетки аденокарциномы эндометрия человека) ингибирует прикрепление к ним эмбриона (Kaneko et al., 2011). Инкубация бластоцист или клеток эндометрия с блокирующим пептидом RGD снижало процент прикрепления бластоцист к монослою клеток (Kaneko et al., 2013). Экспрессия интегрин $\alpha v \beta 3$ повышается в клетках Ишикава вокруг места прикрепления эмбрионов (как человека, так и мыши). Подавление экспрессии интегрин $\alpha v \beta 3$ в клетках Ишикава снижает стабильность прикрепления эмбрионов (Kang et al., 2014).

Также была показана роль микро-РНК при имплантации (Kang et al., 2015). У женщин с нарушенным процессом имплантации изменен профиль микро-РНК, секретируемых эндометрием, в том числе miR-145. При повышении экспрессии miR-145 в клетках подложки стабильность прикрепления эмбрионов понижается. Показано, что miR-145 влияет на взаимодействие инсулиноподобного фактора роста со своим рецептором, что может играть роль в прикреплении эмбриона (Kang et al., 2015).

В моделях имплантации эмбриона мыши *in vitro* изучалось влияние сигнального пути FGF на развитие эмбриона в периимплантационный период. В преимплантационной бластоцисте клетки мигрируют от полярной к муральной трофэктодерме. Миграция заканчивается при имплантации бластоцисты, после чего полярная трофэктодерма делится и выпячивается в обратном направлении, образуя экстраэмбриональную эктодерму. Во время этого процесса клетки делятся и меняют морфологию с плоского эпителия на цилиндрический. После имплантации и прекращения миграции в клетках устанавливается градиент уровня экспрессии Cdx2: высокий уровень экспрессии Cdx2 у клеток полярной трофэктодермы и более низкий у клеток муральной трофэктодермы. Было показано, что во время имплантации миграция клеток трофэктодермы прекращается за счет того, что между муральной и полярной трофэктодермой образуется тканевая граница (происходит накопления актина и миозина, изменяются углы соединения между клетками) (Christodoulou et al., 2019). На подразделение трофэктодермы на субпопуляции и на сохранение мультипотент-

Таблица 1. Характеристики современных моделей имплантации эмбриона

	Показана имплантация	Показаны имплантация и раннее постимплантационное развитие	Система включает клетки эпителия матки или аналоги	Система включает клетки стромы матки или аналоги	Модельная система позволяет качественную визуализацию
Hsu, 1972, 1973, 1979	Да	Да	Нет	Нет	Нет
Bedzhov et al., 2014; Deglincerti et al., 2016; Shahbazi et al., 2016	Да	Да	Нет	Нет	Да
Bentin-Ley et al., 2000	Да	Нет	Да	Да	Да

ности (признаком чего является экспрессия Cdx2) в полярной части влияют сигналы от эпибласта, а именно сигнальный путь FGF. Сигнальный путь FGF активен в полярной трофэктодерме во время имплантации. Если его ингибировать, то пропадает экспрессия Cdx2 в полярной трофэктодерме. Ингибирование активности FGF при помощи SU5402 также вело к нарушению образования границы между муральной и полярной трофэктодермой. Это, в свою очередь, привело к тому что полярная трофэктодерма не образовала экстраэмбриональную эктодерму и эмбриональный цилиндр не развивался. Авторами был сделан вывод о том, что сигнальный путь FGF необходим для морфогенеза полярной трофэктодермы и поддержания мультипотентности во время имплантации (Christodoulou et al., 2019).

В работах, посвященных изучению имплантации, было также показано раннее постимплантационное развитие прикрепленного эмбриона (Bedzhov et al., 2014; Deglincerti et al., 2016). Прикрепление эмбриона к пластику обуславливает некоторые морфологические различия между эмбрионами, проходившими имплантацию *in vitro* и *in vivo*. При имплантации эмбриона в такой системе мы теряем возможность пронаблюдать установление нормальной структуры париетальной энтодермы, также не образуется мембраны Райхерта между париетальной энтодермой и трофэктодермой (Bedzhov et al., 2014).

На данный момент не существует модели, в которой были бы показаны одновременно оба процесса: взаимодействие эмбриона с субстратом, включающим в себя клетки матки, повторяющее многие аспекты нормальной имплантации и раннее постимплантационное развитие прикрепленного эмбриона (табл. 1). Создание такой модели позволило бы изучать процесс имплантации и раннего постимплантационного развития в комплексе.

Временной предел культивирования эмбриона

При помощи метода WEC возможно поддержание развивающегося эмбриона мыши в культуре только до стадии раннего органогенеза (Hsu, 1973, 1979). Это может быть связано с невозможностью выстраивания эмбрио-плацентарной связи (Hsu, 1973; Tam, 1998).

Культивирование эмбриона человека в постимплантационные сроки ограничено международными нормами и разрешено до 14-х суток развития. Развитие эмбриона человека *in vitro* было показано до 12-ти суток развития. В описанных моделях на этапе имплантации эмбрион прикрепляется к пластику. Данная модель позволяет проводить качественную визуализацию эмбриона в ранний постимплантационный период при использовании в качестве субстрата пластика оптического качества, но не поддерживает нормальное развитие эмбриона после 12-ти суток развития. (Deglincerti et al., 2016).

Таким образом, условия, в которых содержится эмбрион *in vitro*, а также все манипуляции с ним влияют на его развитие на разных уровнях (Rinaudo, Schultz, 2004; Giritharan et al., 2012; Mantikou et al., 2016; Mahdavinezhad et al., 2019). На более ранних стадиях это влияние более существенно, и различие условий *in vitro* и *in vivo* часто приводит к гибели эмбриона, фрагментации, остановке развития. В культуральных условиях хуже проходит дифференцировка трофэктодермы, что может приводить к нарушению имплантации или нарушению развития плаценты при переносе эмбриона в матку (Giritharan et al., 2012; Mahdavinezhad et al., 2019). На более поздних стадиях развития влияние условий *in vitro* на эмбрион не так очевидно. В культуре эмбрион мыши в постимплантационные сроки образует морфологически нормальный зародышевый цилиндр (Bedzhov et al., 2014), проходит гастрюляцию (Glanville-Jones et al., 2013; Drakou, Georgiades, 2015).

Развитие проходит с небольшим отставанием от развития *in vivo* (Kalaskar, Lauderdale, 2014). Выделение основных клеточных типов и пространственный паттерн экспрессии маркеров во время этих процессов совпадает с тем, что наблюдается у эмбрионов, развивавшихся *in vivo* (Bedzhov et al., 2014).

Однако влияние условий *in vitro* на развитие эмбриона довольно существенно. Было показано, что при культивировании даже в течение короткого времени у эмбриона нарушается эпигенетическая регуляция и меняется профиль экспрессии генов, в том числе импринтируемых (Doherty et al., 2000; Khosla et al., 2001; Rinaudo, Schultz, 2004; Giritharan et al., 2012; Mantikou et al., 2016; Mahdavinezhad et al., 2019). Изменения в профиле экспрессии генов — это одна из возможных причин особенностей физических характеристик (вес, тесты на когнитивные навыки, общее развитие), наблюдаемых у животных и человека, находившихся в культуре на стадии эмбриона (для человека — после процедуры ЭКО) (Ecker et al., 2004; Watkins et al., 2007; Bouillon et al., 2016). Однако на данный момент эти различия еще относительно плохо описаны и требуют дальнейшего серьезного изучения. Во многом такие исследования затруднены (особенно для человека), так как на развитие эмбриона влияют другие трудно отслеживаемые переменные, такие как возраст матери, состояние ее здоровья, процедуры, применяемые для индукции гиперовуляции. Есть указания на то, что вариабельность, вызываемая в развитии эмбриона этими причинами сопоставима с тем влиянием, которое оказывает на эмбрион поддержание *in vitro* (Gardner, 2005; Mantikou et al., 2016).

Методы культивирования эмбриона развиваются в сторону создания *in vitro* условий, максимально аналогичных условиям *in vivo*, что позволит наблюдать эмбриогенез животных на протяжении всего срока эмбрионального развития, а также улучшит вспомогательные репродуктивные технологии.

СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПЕРИИМПЛАНТАЦИОННОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Современное направление исследований в этой области включает в себя помимо моделей, позволяющих поддерживать развитие в культуре эмбрионов мыши или человека, также системы для культивирования эмбриоподобных структур, созданных с использованием плюрипотент-

ных эмбриональных клеток или клеток с индуцированной плюрипотентностью (Shao et al., 2017; Rivron et al., 2018). В некоторых работах такие конструкторы также включают в себя стволовые клетки трофобласта (Harrison et al., 2018) и стволовые клетки экстраэмбриональной энтодермы (Sozen et al., 2018; Zhang et al., 2019). Такие модельные объекты (эмбриоиды) схожи с эмбрионами в периимплантационные сроки и обладают определенными способностями к самоорганизации и развитию.

Преимущества моделей такого типа связаны с тем, что они являются более пластичными клеточными конструкторами, чем эмбрион; эмбриоиды можно создавать с различными заданными свойствами, необходимыми для конкретной задачи. К минусам можно отнести ограничения в способности к полноценному развитию. Кроме того, предполагалось, что их использование не сопряжено с этическими трудностями. Однако создание эмбриоподобных клеточных органоидов, обладающих некоторыми свойствами эмбриона человека на ранних постимплантационных стадиях развития, что уже было показано в некоторых работах (Simunovic et al., 2018; Zheng et al., 2019), вызывает вопросы о том, насколько эти эксперименты этически допустимы (Aach et al., 2017; Munsie et al., 2017). Методы создания эмбриоидов появились относительно недавно и создание полностью функционального эмбриона, как человека, так и мыши *in vitro*, и развитие их дольше ранних постимплантационных стадий технологически еще невозможно. Однако уже появились международные документы, регламентирующие научную работу с эмбриоподобными клеточными конструкторами. Международное общество исследования стволовых клеток выпустило руководство (ISSCR, 2016), в котором указано, что такие исследования должны быть запрещены, если они нарушают правило о запрете культивирования эмбрионов человека дольше 14-ти суток (ISSCR, 2006).

Эмбриоподобные самоорганизующиеся системы можно подразделить на 2D колонии, демонстрирующие микропаттерны дифференцировки и эмбриоиды, воспроизводящие некоторые элементы развития в 3D пространстве.

Клеточные конструкторы способны к воссозданию множества процессов, проходящих в норме в раннем эмбриогенезе. С использованием этого метода была продемонстрирована самосборка из эмбриональных стволовых клеток и стволовых клеток трофобласта поляризованной бластоцистоподобной структуры, обладающей полостью, схожей с бластоцелью. Клетки внутри такой модели самоорганизуются и дифференцируются,

например, происходит разделение популяции модельной “внутренней клеточной массы” на две популяции, похожие по взаимному расположению и паттерну экспрессии маркеров на эпибласт и на гипобласт (Kime et al., 2019; Vrij et al., 2019). Также использование бластоидов облегчает изучение сигнальных путей и их влияния на эмбриогенез. Так, например, в работе Риврона (Rivron et al., 2018) с применением этого метода была изучена роль сигнального пути TGF β в развитии на стадии бластоцисты. Авторы показали, что популяция клеток модельной внутренней клеточной массы продуцирует BMP4 и Nodal и активирует сигнальный путь TGF β в клетках трофэктодермы, что влияет на образование и размер полости бластоцисты. Также было показано, что одна из мишеней BMP4 и Nodal — белок Klf6, участвующий в эпителиальном морфогенезе трофэктодермы (Rivron et al., 2018).

Такие структуры способны имитировать как взаимодействия клеток между собой, так и влияние преимплантационных эмбрионов на окружающие ткани материнского организма (или на аналогичные клетки *in vitro*). Сфероиды, содержащие клетки трофобласта, взаимодействуют с клетками эпителия матки, повторяя имплантационные взаимодействия (Turco et al., 2018). Также для бластоцистоподобной клеточной структуры была показана способность индуцировать децидуализацию у мышей (Kime et al., 2019; Li et al., 2019; Zhang et al., 2019).

Помимо моделей преимплантационных эмбрионов были созданы конструкторы, имитирующие структуру и развитие постимплантационных эмбрионов. Такие модели демонстрируют элонгацию, люменогенез, гастрюляциоподобные процессы, характерные для определенных этапов развития: нарушение симметрии в отсутствии внешних сигналов, выделение популяции клеток, аналогов первичных половых клеток и другие черты нормального постимплантационного морфогенеза (Brink Van Den et al., 2014; Shao et al., 2017; Sozen et al., 2018; Beccari et al., 2018; Zheng et al., 2019; Zhang et al., 2019). При моделировании гастрюляции на клеточном конструкторе был показан эпителио-мезенхимный переход и миграция клеток модельного эпибласта, что происходит и *in vivo* (Sozen et al., 2018). В одной из работ у гастрюлоидов пространственно-временной паттерн экспрессии маркеров соответствовал формированию зачатков нервной трубки и кишечной энтодермы (хотя морфологически эти структуры не формировались) (Beccari et al., 2018). Также с использованием клеточных конструкторов было получено косвенное подтверждение того,

что в эмбриогенезе человека, также как и мыши, амниотическая эктодерма является центром химической индукции и участвует в запуске гастрюляции. У мышей гастрюляция запускается при помощи сигналов, поступающих от экстраэмбриональной эктодермы. Однако аналог экстраэмбриональной эктодермы у человека отделен от эпибласта амниотической эктодермой. В созданном в работе эмбриоподобном клеточном конструкторе при воздействии BMP4 выделялись уплощенные клетки — аналоги амниотической эктодермы. При сокультивировании этих клеток с эмбриональными стволовыми клетками, последние приобретают фенотип клеток заднего края первичной полоски. В индукции такой дифференцировки участвует сигнальный путь Wnt — при добавлении в среду IWP2, ингибитора сигнального пути Wnt, описанного эффекта не наблюдается (Zheng et al., 2019).

Недавно появившееся направление в развитии этого метода, заключается в том, чтобы конструировать эмбриоиды из тотипотентных (характерных для клеток эмбриона до 8-ми клеточной стадии развития) культур клеток. Таким образом, клеточные конструкторы, вначале состоящие из неорганизованного агрегата клеток одного типа, или даже одной единственной клетки, сами будут развиваться и дифференцироваться в три первичные эмбриональные ткани (Li et al., 2019). Сгенерированные по такой методике бластоиды обладают множеством сходств с бластоцистой по клеточным механизмам формирования, морфологии и пространственно-временному паттерну экспрессии маркеров. Они способны к имплантации в матку мыши и вызывают децидуализацию, однако не демонстрируют черты позднего постимплантационного развития, со временем дегенерируя в матке. Также бластоиды показали способность к развитию *in vitro* с образованием аналога эмбрионов на стадии E5.5 (Li et al., 2019).

Таким образом, самоорганизующиеся эмбриоподобные клеточные конструкторы являются новым мощным инструментом для изучения раннего эмбриогенеза млекопитающих. Сейчас это направление активно развивается, о чем можно судить по росту количества публикаций по этой теме. Одно из самых больших преимуществ такого подхода в экспериментальной эмбриологии — это то, что при помощи подбора используемых типов клеток и набора биологически активных стимулов появилась беспрецедентная возможность генерировать клеточные эмбриоподобные структуры, как конструктор, создавая модель с заданными свойствами, оптимальную для изучения запланированной стадии и процесса эмбриогенеза. На данный мо-

мент становится ясно, что развитие подобных методов планомерно приближает нас к созданию жизнеспособного и полностью функционального эмбриона из культивируемых клеток. Формируется направление, которое можно обозначить как “синтетическая эмбриология”.

Одним из новых многообещающих современных методов являются системы для культивирования эмбрионов на основе микрофлюидики. Данная группа методов появилась в 1990-х гг. и с тех пор стремительно развивается. Микрофлюидные системы культивирования могут быть открытыми и закрытыми, статическими или динамическими в зависимости от целей конкретного исследования. Данные системы позволяют создать циркуляцию жидкости вокруг эмбриона для его эффективного обмена молекулами со средой (отвода продуктов обмена и поставки питательных веществ и биоактивных молекул). Кроме того, эмбрионы мыши лучше развиваются при совместном культивировании и микрофлюидная система поддерживает их молекулярное взаимодействие друг с другом. В микрофлюидных системах возможно более точно контролировать все характеристики среды, также полностью закрытые системы не дают микрообъемам жидкости пересыхать. Еще одним важным преимуществом данной модели культивирования является то, что при движении в камерах с микрофлюидикой эмбрион получает механические сигналы, схожие с получаемыми *in vivo* (Esteves et al., 2013; Gac, Nordhoff, 2017).

Системы на основе микрофлюидики могут использоваться как для фундаментальных научных исследований, так и в клинической практике для культивирования эмбрионов, гамет, стволовых клеток. На данный момент уже разработаны модельные микрофлюидные системы, позволяющие культивировать эмбрионы человека и проводить искусственное оплодотворение в рамках протоколов вспомогательных репродуктивных технологий (Smith et al., 2011).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделирование развития эмбрионов в культуре позволяет детально изучать эмбриональное развитие мыши и человека и факторы, влияющие на него. Преимуществом модели является то, что эмбрион, содержащийся в культуре, легко доступен для наблюдения и экспериментальных воздействий, что дает возможность изучения влияния любых экспериментальных факторов непосредственно на развивающийся эмбрион. С помощью культивирования эмбриона в условиях *in vitro* были описаны множество аспектов эмбри-

онального развития млекопитающих, относящихся к морфологии, физиологии и молекулярным аспектам эмбриогенеза.

Несмотря на преимущества данного метода и его широкое применение для изучения эмбриогенеза млекопитающих, у него также есть определенные ограничения. Во-первых, эмбрионы, содержащиеся в культуре, имеют ряд отличий от тех, которые развивались в нормальных условиях, во-вторых, поддерживать эмбрион мыши в культуре возможно только в течение половины срока эмбрионального развития, а эмбрион человека в соответствии с международными нормами только 14 сут, в-третьих, моделирование процесса имплантации не совсем соответствует тому, как данный процесс проходит *in vivo*. Таким образом, у метода есть большие перспективы для дальнейшего развития.

Основные направления развития методов культивирования эмбрионов млекопитающих включают в себя подбор условий среды для максимального повторения условий, окружающих эмбрион *in vivo*. В том числе совершенствование субстрата для моделирования процесса имплантации, приближенного к жизни. Наиболее перспективными для моделей имплантации являются субстраты, включающие в себя клетки матки материнского организма, находящиеся на 3D матриксе, имитирующем эндометрий. Необходимо создание модели имплантации, которая позволяла бы наблюдать как имплантацию эмбриона, так и его раннее постимплантационное развитие в рамках одного эксперимента.

В современном развитии методов изучения раннего эмбриогенеза млекопитающих преобладают два направления. Первое заключается в создании культуральных систем и эмбриоподобных клеточных конструкторов с использованием плюрипотентных клеток, отвечающих задачам конкретного эксперимента. Другое направление — это создание клеточных моделей, обладающих большой способностью к самоорганизации. Оба направления открывают перспективы экспериментального изучения раннего развития млекопитающих в околоимплантационный период.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена в рамках Госзадания ИБР РАН № 0108-2019-0004.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Необходимость соблюдения этических принципов неприменима.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Л.Ш. Измайлова и Е.А. Воротеляк написали текст обзора. Е.А. Воротеляк и А.В. Васильев отредактировали статью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aach J., Lunshof J., Iyer E. et al.* Addressing the ethical issues raised by synthetic human entities with embryo-like features // *Elife*. 2017. V. 6. P. 1–20.
- Ambrosi D., Beloussov L.V., Ciarletta P.* Mechanobiology and morphogenesis in living matter: a survey // *Meccanica*. 2017. V. 52. № 14. P. 3371–3387.
- Ashary N., Tiwari A., Modi D.* Embryo Implantation: War in times of love // *Endocrinology*. 2018. V. 159. № 2. P. 1188–1198.
- Beccari L., Moris N., Girgin M. et al.* Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloids // *Nature*. 2018. V. 562. № 7726. P. 272–276.
- Bedzhov I., Leung C.Y., Bialecka M. et al.* *In vitro* culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages // *Nat. Protoc.* 2014. V. 9. № 12. P. 2732–2739.
- Bedzhov I., Bialecka M., Zielinska A. et al.* Development of the anterior-posterior axis is a self-organizing process in the absence of maternal cues in the mouse embryo // *Cell Res.* 2015. V. 25. № 12. P. 1368–1371.
- Bedzhov I., Zernicka-Goetz M.* Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation // *Cell*. 2014. V. 156. № 5. P. 1032–1044.
- Beloussov L.V.* Morphomechanics of development // Springer International Publishing. 2015. 195 p.
- Beloussov L. V., Louchinskaia N.N., Stein A.A.* Tension-dependent collective cell movements in the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos // *Dev. Genes Evol.* 2000. V. 210. № 2. P. 92–104.
- Bentin-Ley U., Horn T., Sjogren A. et al.* Ultrastructure of human blastocyst-endometrial interactions *in vitro* // *J. Reprod. Fertil.* 2000. V. 120. № 2. P. 337–350.
- Berkhout R.P., Lambalk C.B., Huirne J. et al.* High-quality human preimplantation embryos actively influence endometrial stromal cell migration // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018. V. 35. № 4. P. 659–667.
- Bouillon C., Leandri R., Desch L. et al.* Does embryo culture medium influence the health and development of children born after *in vitro* fertilization? // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 3. P. 1–14.
- Brink S.C., Alemany A., Batenburg V. et al.* Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells // *Dev.* 2014. V. 141. № 22. P. 4231–4242.
- Brosens J.J., Salker M.S., Teklenburg G. et al.* Uterine selection of human embryos at implantation // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 4–11.
- Buck V.U., Gellersen B., Leube R.E., et al.* Interaction of human trophoblast cells with gland-like endometrial spheroids: A model system for trophoblast invasion // *Hum. Reprod.* 2015. V. 30. № 4. P. 906–916.
- Carson D.D., Tang J.P., Gay S.* Collagens support embryo attachment and outgrowth *in vitro*: Effects of the Arg-Gly-Asp sequence // *Dev. Biol.* 1988. V. 127. № 2. P. 368–375.
- Christodoulou N., Weberling A., Strathdee D. et al.* Morphogenesis of extra-embryonic tissues directs the remodeling of the mouse embryo at implantation // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 1–12.
- Coucovanis E., Martin G.R.* Signals for death and survival: A two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo // *Cell*. 1995. V. 83. № 2. P. 279–287.
- Cuman C., Menkhorst E.M., Rombauts L.J. et al.* Preimplantation human blastocysts release factors that differentially alter human endometrial epithelial cell adhesion and gene expression relative to IVF success // *Hum. Reprod.* 2013. V. 28. № 5. P. 1161–1171.
- Deglicerti A., Croft G.F., Pietila L.N. et al.* Self-organization of the *in vitro* attached human embryo // *Nature*. 2016. V. 533. P. 251–254.
- Doherty A.S., Mann M.R.W., Tremblay K.D. et al.* Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo1 // *Biol. Reprod.* 2000. V. 62. № 6. P. 1526–1535.
- Domínguez F., Simon C., Quinonero A. et al.* Human endometrial CD98 is essential for blastocyst adhesion // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 10.
- Drakou K., Georgiades P.* A serum-free and defined medium for the culture of mammalian postimplantation embryos // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 468. № 4. P. 813–819.
- Ecker D.J., Stein P., Xu Z. et al.* Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 6. P. 1595–1600.
- Edwards R.G., Steptoe P.C., Purdy J.M.* Fertilization and cleavage *in vitro* of preovulator human oocytes // 1971. P. 287–289.
- Esteves T.C., Rossem F.V., Nordhoff V. et al.* A microfluidic system supports single mouse embryo culture leading to full-term development // *RSC Adv.* 2013. V. 3. № 48. P. 26451–26458.
- Evans J., Walker K.J., Bilandzic M. et al.* A novel “embryo-endometrial” adhesion model can potentially predict “receptive” or “non-receptive” endometrium // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019.
- Fauque P., Mondon F., Letourneur F. et al.* *In vitro* fertilization and embryo culture strongly impact the placental transcriptome in the mouse model // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 2.
- Gac S. Le, Nordhoff V.* Microfluidics for mammalian embryo culture and selection: Where do we stand now? // *Mol. Hum. Reprod.* 2017. V. 23. № 4. P. 213–226.
- Gardner D.K.* *Ex vivo* early embryo development and effects on gene expression and imprinting // *Reprod. Fertil. Dev.* 2005. P. 361–370.
- Giritharan G., Piane L., Donjacour A. et al.* *In vitro* culture of mouse embryos reduces differential gene expression between inner cell mass and trophectoderm // *Reprod. Sci.* 2012. V. 19. № 3. P. 243–252.

- Glanville-Jones H.C., Woo N., Arkell R.M. Successful whole embryo culture with commercially available reagents // *Int. J. Dev. Biol.* 2013. V. 57. № 1. P. 61–67.
- Harrison S.E., Sozen B., Zernicka-Goetz M. *In vitro* generation of mouse polarized embryo-like structures from embryonic and trophoblast stem cells // *Nat. Protoc.* 2018. V. 13. № 7. P. 1586–1602.
- Heo Y.S., Cabrera L., Bormann C. et al. Dynamic microfunnel culture enhances mouse embryo development and pregnancy rates // *Hum. Reprod.* 2010. V. 25. № 3. P. 613–622.
- Hiramatsu R., Matsuoka T., Kimura-Yoshida C. et al. External mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos // *Dev. Cell.* 2013. V. 27. № 2. P. 131–144.
- Hsu Y.C. Differentiation *in vitro* of mouse embryos to the stage of early somite // *Dev. Biol.* 1973. V. 33. № 2. P. 403–411.
- Hsu Y.C., Baskar J. et al. Development *in vitro* of mouse embryos from the two-cell egg stage to the early somite stage // *Development.* 1974. V. 31. № 1. P. 235–245.
- Hsu Y.C. *In vitro* development of individually cultured whole mouse embryos from blastocyst to early somite stage // *Dev. Biol.* 1979. V. 68. № 2. P. 453–461.
- ISSCR. Guidelines for the Conduct of Human Embryonic Stem Cell Research. 2006.
- ISSCR. Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation. 2016.
- Jenkinson E.J., Wilson I.B. *In vitro* support system for the study of blastocyst differentiation in the mouse // *Nature.* 1970. V. 228. № October 17th. P. 227–231.
- Kalaskar V.K., Lauderdale J.D. Mouse embryonic development in a serum-free whole embryo culture system // *J. Vis. Exp.* 2014. № 85. P. 1–8.
- Kaneko Y., Lecce L., Day M.L. et al. B1 and B3 integrins disassemble from basal focal adhesions and B3 integrin is later localised to the apical plasma membrane of rat uterine luminal epithelial cells at the time of implantation // *Reprod. Fertil. Dev.* 2011. V. 23. № 3. P. 481–495.
- Kaneko Y., Day M.L., Murphy C.R. Integrin $\beta 3$ in rat blastocysts and epithelial cells is essential for implantation *in vitro*: Studies with Ishikawa cells and small interfering RNA transfection // *Hum. Reprod.* 2011. V. 26. № 7. P. 1665–1674.
- Kaneko Y., Murphy C.R., Day M.L. Extracellular matrix proteins secreted from both the endometrium and the embryo are required for attachment: A study using a coculture model of rat blastocysts and Ishikawa cells // *J. Morphol.* 2013. V. 274. № 1. P. 63–72.
- Kang Y.J., Forbes K., Karver J. et al. The role of the osteopontin-integrin $\alpha \beta 3$ interaction at implantation: Functional analysis using three different *in vitro* models // *Hum. Reprod.* 2014. V. 29. № 4. P. 739–749.
- Kang Y.J., Lees M., Matthews L.C. et al. miR-145 suppresses embryo-epithelial juxtacrine communication at implantation by modulating maternal IGF1R // *J. Cell Sci.* 2015. V. 128. № 4. P. 804–814.
- Kauma S.W., Matt D.W. Coculture cells that express leukemia inhibitory factor (LIF) enhance mouse blastocyst development *in vitro* // *J. Assist. Reprod. Genet.* 1995. V. 12. № 2. P. 153–156.
- Khalifa E.A.M., Tucker M.J., Hunt P. Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse // *Hum. Reprod.* 1992. V. 7. № 4. P. 532–536.
- Khosla S., Dean W., Brown D. et al. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes // *Biol. Reprod.* 2001. V. 64. № 3. P. 918–926.
- Kime C., Kiyonari H., Ohtsuka S. et al. Induced 2C expression and implantation-competent blastocyst-like cysts from primed pluripotent stem cells // *Stem Cell Reports.* 2019. V. 13. № 3. P. 485–498.
- Kleijkers S.H.M., Montfort A.P.A., Bekers O. et al. Ammonium accumulation in commercially available embryo culture media and protein supplements during storage at 2–8°C and during incubation at 37°C // *Hum. Reprod.* 2016. V. 31. № 6. P. 1192–1199.
- Kolahi K.S., Donjacour A., Xiaowei L. et al. Effect of substrate stiffness on early mouse embryo development // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 7.
- Li R., Zhong C., Yang Y. et al. Generation of blastocyst-like structures from mouse embryonic and adult cell cultures // *Cell.* 2019. V. 179. № 3. P. 687–702. e18.
- Ma W., Song H., Das S.K. et al. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 5. P. 2963–2968.
- Mahdaviniezhad F., Kazemi P., Fathalizadeh P. et al. *In vitro* versus *in vivo*: Development-, apoptosis-, and implantation-related gene expression in mouse blastocyst // *Iran. J. Biotechnol.* 2019. V. 17. № 1. P. 90–97.
- Mantikou E., Jonker M.J., Wong K.M. et al. Factors affecting the gene expression of *in vitro* cultured human preimplantation embryos // *Hum. Reprod.* 2016. V. 31. № 2. P. 298–311.
- Morbeck D.E., Krisher R.L., Herrick J.R. et al. Composition of commercial media used for human embryo culture // *Fertil. Steril.* 2014. V. 102. № 3.
- Morris S.A., Grewal S., Barrios F. et al. Dynamics of anterior-posterior axis formation in the developing mouse embryo // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 610–673.
- Munsie M., Hyun I., Sugarman J. Ethical issues in human organoid and gastruloid research // *Dev.* 2017. V. 144. № 6. P. 942–945.
- New D.A. Development of rat embryos cultured in blood sera // *J. Reprod. Fertil.* 1966. V. 12. № 3. P. 509–524.
- Olalekan S.A., Burdette J.E., Getsios S. et al. Development of a novel human recellularized endometrium that responds to a 28-day hormone treatment // *Biol. Reprod.* 2017. V. 96. № 5. P. 971–981.
- Pera M.F., DeWert G., Dondorp W. et al. What if stem cells turn into embryos in a dish? // *Nat. Methods.* 2015. V. 12. № 10. P. 917–919.
- Piliszek A., Kwon G.S., Hadjantonakis A.-K. *Ex utero* culture and live imaging of mouse embryos // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 770. P. 439–455.
- Rinaudo P., Schultz R.M. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse

- embryos // *Reproduction*. 2004. V. 128. № 3. P. 301–311.
- Rivron N.C., Frias-Aldeguez J., Vrij E.J. et al. Blastocyst-like structures generated solely from stem cells // *Nature*. 2018. V. 557. № 7703. P. 106–111.
- Roode M., Blair K., Snell P. et al. Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling // *Dev. Biol.* 2012. V. 361. № 2. P. 358–363.
- Shahbazi M.N., Jedrusik A., Vuoristo S. et al. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues // *Nat. Cell Biol.* 2016. V. 18. № 6. P. 700–708.
- Shahbazi M.N., Siggia E.D., Zernicka-Goetz M. Self-organization of stem cells into embryos: A window on early mammalian development // *Science*. 2019. V. 364. № 6444. P. 948–951.
- Shao Y., Taniguchi K., Townshend R.F. et al. A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. № 1. P. 1–15.
- Shao Y., Taniguchi K., Gurdziel K. et al. Self-organized angiogenesis by human pluripotent stem cells in a biomimetic implantation-like niche // *Nat. Mater.* 2017. V. 16. № 4. P. 419–425.
- Simón C., Mercader A., Garcia-Velasco J. et al. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999. V. 84. № 8. P. 2638–2646.
- Simunovic M., Metzger J.J., Etoc F. et al. Molecular mechanism of symmetry breaking in a 3D model of a human epiblast // *bioRxiv* (preprint). 2018. V. 21. № July. P. 330704.
- Smith G.D., Swain J.E., Bormann C.L. Microfluidics for gametes, embryos, and embryonic stem cells // *Semin. Reprod. Med.* 2011. V. 29. № 1. P. 5–14.
- Sozen B., Amadei G., Cox A. et al. Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures // *Nat. Cell Biol.* 2018. V. 20. № 8. P. 979–989.
- Stepoe P.C., Edwards R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1978. V. 116. № 4. P. 321.
- Tam P.P.L. Postimplantation mouse development: Whole embryo culture and micro-manipulation // *Int. J. Dev. Biol.* 1998. V. 42. № 7. P. 895–902.
- Tao T., Robichaud A., Mercier J. et al. Influence of group embryo culture strategies on the blastocyst development and pregnancy outcome // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2013. V. 30. № 1. P. 63–68.
- Teklenburg G., Salker M., Molokhia M. et al. Natural selection of human embryos: Decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 4. P. 2–7.
- Turco M.Y., Gardner L., Kay R.G. et al. Trophoblast organoids as a model for maternal–fetal interactions during human placentation // *Nature*. 2018. V. 564. № 7735. P. 263–281.
- Vergaro P., Tiscornia G., Rodriguez A. et al. Transcriptomic analysis of the interaction of choriocarcinoma spheroids with receptive vs. non-receptive endometrial epithelium cell lines: an *in vitro* model for human implantation // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019. V. 36. № 5. P. 857–873.
- Vrij E.J., Reimer Y.S., Javier F.A. et al. Self-organization of post-implantation-like embryonic tissues from blastoids // *bioRxiv*. 2019. P. 510396.
- Wang H., Pila F., Anderson S. et al. A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids // *Mol. Hum. Reprod.* 2012. V. 18. № 1. P. 33–43.
- Wang H., Bocca S., Anderson S. et al. Sex steroids regulate epithelial-stromal cell cross talk and trophoblast attachment invasion in a three-dimensional human endometrial culture system // *Tissue Eng. Part C. Methods*. 2013. V. 19. № 9. P. 676–687.
- Watkins A.J., Platt D., Papenbrock T. et al. Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 13. P. 5449–5454.
- Ye T.M., Pang R.T.K., Leung C.O.N. et al. Development and characterization of an endometrial tissue culture model for study of early implantation events // *Fertil. Steril.* 2012. V. 98. № 6. P. 1581–1589.
- Zhang S., Chen T., Chen N. et al. Implantation initiation of self-assembled embryo-like structures generated using three types of mouse blastocyst-derived stem cells // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1.
- Zheng Y., Xue X., Shao Y. et al. Controlled modelling of human epiblast and amnion development using stem cells // *Nature*. 2019. V. 573. № 7774. P. 421–425.

Modeling of Early Development of Mouse and Human Embryos *in vitro*

L. Sh. Izmailova^{1, *}, E. A. Vorotelyak¹, and A. V. Vasiliev^{1, 2}

¹Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

²Faculty of Biology, Department of Embryology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye Gory 1-12, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: luba.ranaway-94@yandex.ru

Mammalian embryonic development includes preimplantation, implantation and post-implantation development, during which the embryo is attached to the uterus wall. Remodeling of embryo development in culture allows us to study the process of ontogenesis in dynamics, which is especially valuable for studying early post-implantation development. We reviewed existing cultivation systems for mouse and human embryos.

Also we considered a new experimental approach for studying early mammalian embryogenesis – embryo-like cell constructs. Using these methods, the most important results were obtained about embryonic germ layers formation, molecular and cellular mechanisms of morphogenesis of the mouse and human embryos. The purpose of this review is to generalize the possibilities and limitations of such systems for studying mammalian embryogenesis and to find directions for the further development of this approach.

Keywords: embryo cultivation, embryonic development, mouse, human, remodeling of the implantation

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ (БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 57.017.642, 57.032, 577.17.05, 612.438

ЭКСПРЕССИЯ И РОЛЬ СЕРОТОНИНОВОГО РЕЦЕПТОРА 1a ТИПА В ЭМБРИОНАЛЬНОМ ТИМУСЕ КРЫС

© 2020 г. Н. В. Лифанцева^a, Ц. О. Конеева^a, С. Н. Воронова^a,
Г. В. Луценко^b, Л. А. Захарова^a, В. И. Мельникова^{a, *}

^aИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

^bИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997 Россия

*e-mail: v_melnikova@mail.ru

Поступила в редакцию 03.05.2020 г.

После доработки 15.05.2020 г.

Принята к публикации 17.05.2020 г.

Серотонин участвует в регуляции широкого спектра функций иммунной системы у половозрелых животных. Ранее нами было показано, что подавление синтеза серотонина у плодов в период формирования тимуса приводит к долгосрочным необратимым изменениям в функционировании Т-системы иммунитета. Однако механизмы морфогенетического влияния серотонина на развитие тимуса остаются невыясненными. В данной работе была выявлена экспрессия мРНК и белкового продукта серотонинового рецептора 1a типа (Htr1a) в тимусе плодов. Однократное введение плодам *in utero* антагониста Htr1a (NAN-190) на 17-й день эмбрионального развития вызывало стойкое повышение функциональной активности Т-лимфоцитов в постнатальной жизни. На модели органо-типической культуры эмбрионального тимуса показано, что блокада Htr1a ускоряет дифференцировку Т-лимфоцитов на самых ранних стадиях их развития и слабо влияет на образование зрелых форм Т-клеток помощников и цитотоксических Т-лимфоцитов. Присутствие в развивающемся тимусе рецепторов Htr1a подтверждает возможность прямого влияния серотонина на формирование этого органа. Установлено, что серотонин через Htr1a способен изменять баланс цитокинов в формирующемся тимусе, что может лежать в основе механизмов онтогенетической пластичности иммунной системы. Цитокины, ответственные за дифференцировку клеточных элементов тимуса, по-видимому, являются одним из ключевых звеньев, через которые реализуется морфогенетический эффект серотонина, опосредованный активацией Htr1a рецептора.

Ключевые слова: серотонин, Htr1a рецептор, тимус, онтогенез, крыса

DOI: 10.31857/S0475145020050055

ВВЕДЕНИЕ

Нейротрансмиттер серотонин участвует в регуляции широкого спектра биологических функций, как в мозге, так и в периферических органах, в том числе в иммунной системе. У половозрелых животных серотонин контролирует процессы врожденного и адаптивного иммунитета (Baganz, Blakely, 2013). Свои иммуотропные эффекты серотонин осуществляет через специфические рецепторы (Cloëz-Tayarani, Changeux, 2007; Argeola et al., 2015). Механизмы иммуномодуляторного действия серотонина характеризуются клеточной специфичностью и зависят от экспрессии тех или иных типов рецепторов на клетках иммунной системы. В частности, описано влияние серотонина на активность естественных клеток-киллеров, дендритных клеток и макрофагов, хемотаксис, секрецию цитокинов, апоптоз, пролиферацию, диф-

ференцировку и активацию лимфоцитов, а также их созревание в лимфоидных органах (Argeola et al., 2015; Herr et al., 2017). Иммуномодуляторные функции серотонина у половозрелых животных и человека изучены достаточно полно, в то время как данные о его участии в развитии иммунной системы немногочисленны и, главным образом, охватывают ранний постнатальный период.

Становление отдельных структурно-функциональных элементов иммунной системы характеризуется высокой адаптационной пластичностью и чувствительностью ко многим регуляторным факторам, одним из которых является серотонин. Ранее нами было показано, что пренатальный дефицит серотонина в период формирования тимуса приводит к существенным долгосрочным изменениям клеточного состава тимуса и к нарушениям в

функционировании Т-системы иммунитета вплоть до половозрелого возраста (Мельникова и др., 2012). Однако механизмы морфогенетического действия серотонина на развитие тимуса остаются невыясненными, в частности, отсутствие данных об экспрессии рецепторов к серотонину в тимусе плодов не позволяет судить о возможности прямого влияния серотонина на развитие этого органа.

В настоящее время выделяют семь семейств серотониновых рецепторов: Htr1, Htr2, Htr3, Htr4, Htr5, Htr6 и Htr7, многие из которых включают подтипы (Kroeze, Roth, 2006). У половозрелых животных клетки иммунной системы экспрессируют почти все типы серотониновых рецепторов, однако, наиболее представленным является Htr1a. Экспрессия Htr1a выявлена в тимусе, селезенке, лимфатических узлах, а также на циркулирующих в крови Т-лимфоцитах. Через этот тип рецепторов серотонин способен модулировать дифференцировку, пролиферацию и функциональную активность Т-лимфоцитов, а также их созревание в лимфоидных органах у половозрелых животных (Arreola et al., 2015). Антагонисты Htr1a подавляют пролиферацию Т-лимфоцитов, индуцированную митогенами или интерлейкином 2 (ИЛ-2), а также секрецию цитокинов, таких как ИЛ-2 и интерферон- γ (ИФН- γ) (Aune et al., 1994).

Многочисленные исследования свидетельствуют, что Htr1a рецепторы играют важную роль в регуляции развития многих отделов мозга у плодов (Albert, Lemonde, 2004; Gleason et al., 2010; Kishi et al., 2011). Нарушение баланса серотонина в период формирования мозга приводит к долгосрочным структурно-функциональным изменениям, опосредованным в значительной степени через Htr1a. У человека полиморфизм гена Htr1a, обусловленный точечными мутациями в промоторном участке, связывают с патогенезом шизофрении, биполярного расстройства, депрессии, склонности к суициду (Albert, Lemonde, 2004; Kishi et al., 2011). Тимус и мозг формируются в развитии параллельно, однако, роль Htr1a в регуляции развития иммунной системы до настоящего времени не исследовали.

В данной работе мы установили, что Htr1a рецепторы экспрессируются в тимусе плодов крыс и оценили отдаленные последствия блокады этих рецепторов в период активного формирования тимуса. На модели органотипической культуры эмбриональных тимусов изучили влияние блокады Htr1a рецепторов на дифференцировку Т-лимфоцитов, а также предложили возможные механизмы реализации эффектов серотонина на развивающийся тимус, в частности, выявили его влияние на экспрессию тимических цитокинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и экспериментальные процедуры. Работа проведена на крысах Вистар, которых содержали в стандартных условиях с контрольным режимом освещения и свободным доступом к пище и воде. Для получения самок с датированным сроком беременности использовали трех–четырёхмесячных крыс весом 200–250 г. День обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке считали первым днем эмбрионального развития (Э1), день рождения крысят считали первым постнатальным днем (П1). Выделение экспериментального материала выполняли под изофлурановым ингаляционным наркозом с соблюдением правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. В работе использовано 38 беременных самок крыс.

Исследование возрастной динамики экспрессии Htr1a в тимусе крыс. Экспрессию мРНК и белка Htr1a изучали методами полуколичественного ПЦР с обратной транскрипцией и Вестерн-блоттинга в тимусе плодов (в период Э16–Э21) и постнатальных крыс (П3).

ПЦР. Выделение тотальной РНК из тимусов, обратную транскрипцию и ПЦР проводили в соответствии с протоколом, описанным ранее (Melnikova et al., 2019). Ген, кодирующий рибосомальный белок L19 (RPL19), был выбран в качестве референсного. Анализ продуктов проводили с помощью агарозного гель-электрофореза и системы видеорегистрации “ChemiDoc MP Imaging System” (“Biorad”). Для исключения ложноположительного результата проводили отрицательные контроли – ПЦР без матрицы и ПЦР без обратной транскрипции. Специфические праймеры, представленные в табл. 1, подбирали с помощью сервиса NCBI Primer-BLAST с учетом экзон-интронной структуры генов. Праймеры подбирали таким образом, чтобы температура отжига была во всех случаях одинакова, и составляла 59°C. Для детекции Htr1a проводили 30 циклов, референсного гена – 25 циклов, а всех остальных образцов – 28 циклов амплификации. Этот параметр предварительно подбирали для каждого гена экспериментально так, чтобы он соответствовал зоне экспоненциального роста, когда возможен количественный анализ. Выбор метода ПЦР, а не ПЦР в реальном времени был обусловлен ограниченными объемами эмбрионального материала, в то время как в экспериментах, требующих сравнения уровней экспрессии, чувствительность ПЦР была достаточной.

Вестерн-блоттинг. Получение осветленных гомогенатов тимусов, электрофорез и перенос белков на мембрану осуществляли по протоколу, описанному ранее (Melnikova et al., 2019). На дорожку наносили одинаковое количество общего

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для ПЦР

Ген	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера	Размер продукта, п.н.
Htr1a	tgaagactctgggcatcatcat	acccaacaacgcaggcat	116
RPL19	atcgccaatgccaaactct	gagaatccgctgttttgaa	321
ИЛ-10	tgctcttactggctggagt	cctggggcatcacttctacc	264
ИФН- γ	ccctctctggctgttactgc	cgaacttggcgatgctcatg	315
ИЛ-1 α	cccagatcagcacctcacag	gcgagtgcacttaggacgagg	570
ИЛ-1 β	tcaagcagagcacagacctg	ttctgtcgacaatgctgcct	357
ИЛ-4	ctcatctgcagggcttccag	agtgttgtagcggtggactc	173
ФНО- α	ccatgagcacggaaagcatg	ggctcataccagggtctgag	586

белка (по 40 мкг). Качество переноса белков и точность нанесения проб на дорожки контролировали с помощью окрашивания мембран Понсо С. Мембраны инкубировали с первичными антителами кролика к Htr1a (1 : 1000, “Abscam”) в течение ночи при 4°C. По окончании инкубации мембраны несколько раз промывали в TNT буфере (10 mM Трис-НCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, к IgG кролика (1 : 10000, “Jackson Immunoresearch”) в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембраны проявляли стандартным методом усиленной хемилюминесценции (ECL) с помощью набора “ECL Plus Western Blotting Detection Reagents”, (“Amersham”). Рентгеновские пленки сканировали, и полученные изображения обрабатывали в стандартной программе ImageJ, оценивая интегральное поглощение белковых полос. Результаты определения уровня экспрессии исследованных веществ были нормированы на общее содержание белка на дорожку.

Для выяснения вопроса о клеточном распределении рецептора, на Э19 исследовали экспрессию белка Htr1a отдельно в тимоцитах и клетках стромы тимуса. Для этого свежесывленные тимусы гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе и фильтровали через капроновый фильтр. Тимоциты собирали из полученной суспензии центрифугированием, а образцы стромы тимуса собирали пинцетом с поверхности фильтра. Полученные пробы использовали для Вестерн-блоттинга, как описано выше. Для анализа выбран срок Э19, поскольку он соответствует периоду активной дифференцировки всех типов клеток в тимусе, а размер органа уже позволяет получить достаточное количество материала для анализа.

Исследование отдаленных последствий пренатальной блокады Htr1a рецепторов в тимусе. На 17-й день беременности крысам под изофлурановым наркозом вскрывали брюшную полость и с помощью гамильтоновского шприца вводили

плодам *in utero* антагонист Htr1a рецепторов NAN-190 (1 мкг в 5 мкл на плод), затем рану послойно ушивали. Все манипуляции проводили в асептических условиях. Контрольным животным вводили равный объем стерильного 0.9% раствора NaCl. Родившееся потомство выращивали, и на П20 и П40 оценивали функциональную активность Т-лимфоцитов тимуса по их способности к активации Т-клеточным митогеном.

Оценка пролиферативного ответа Т-лимфоцитов тимуса на митоген конканавалин А. Функциональную активность Т-лимфоцитов тимуса оценивали по пролиферативному иммунному ответу, индуцированному митогеном конканавалином А (КонА, 2.5 мкг/мл). Пролиферацию клеток оценивали в культуре лимфоцитов по протоколу, описанному ранее (Мельникова и др., 2012), с использованием [3H]тимидина (60 Ки/мМ, “Amersham”). Для одной экспериментальной точки использовали пять лунок. После инкубации клетки переносили полуавтоматическим харвестером (“Scatron”) на стекловолокнистые фильтры GF/C (“Whatman”). Радиоактивность образцов измеряли на сцинтилляционном счетчике “Rack-beta” (“LKB”).

Органотипическая культура эмбриональных тимусов. Органотипическую культуру тимусов, выделенных из плодов на Э18, проводили по протоколу, описанному ранее (Cunningham et al., 2016; Melnikova et al., 2019). Культуру поддерживали в течение 7 дней с ежедневной заменой культуральной среды и добавлением в среду в опытных лунках антагониста Htr1a рецепторов NAN-190 (10^{-7} M, “Sigma”). После культивирования тимусы гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе, суспензию тимоцитов фильтровали через капроновый фильтр и отмывали центрифугированием. Процентное содержание популяций Т-лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии.

Анализ состава клеточных популяций тимуса. Степень зрелости Т-лимфоцитов анализировали

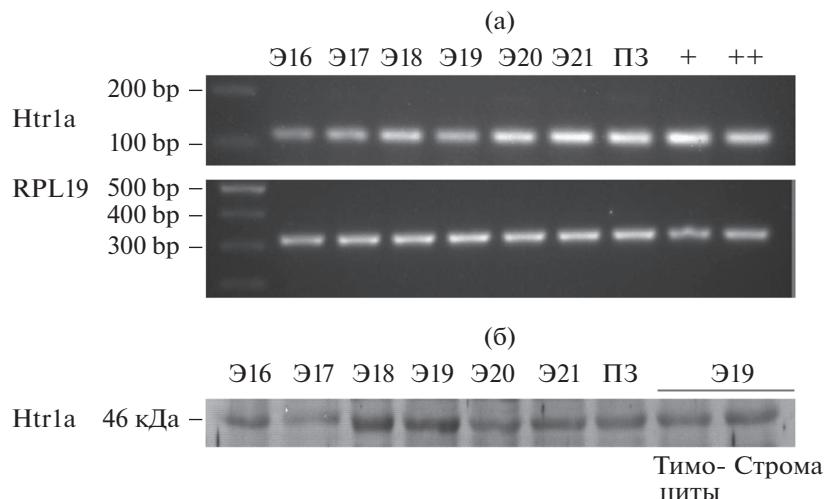


Рис. 1. Возрастная динамика экспрессии Htr1a рецептора в тимусе крыс с 16-го дня эмбрионального развития (Э16) по 3-й день постнатального развития (ПЗ), оцениваемая с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (а) и Вестерн-блоттинга (б). В качестве положительного контроля использованы гипоталамус (+) и ромбэнцефалон (++) 21-дневных плодов.

с помощью двойного мечения моноклональными антителами к CD8b и к CD4 антигенам, конъюгированными с фикоэритрином и флуоресцеин изотиоцианатом, соответственно (“Cederlane”). Иммуноцитохимическое мечение и последующий анализ клеток на цитометре “Cell Lab Quanta SC”, (“Beckman-Coulter”) проводили в соответствии с методом, описанным ранее (Мельникова и др., 2012; Melnikova et al., 2019).

Оценка влияния серотонина на индуцированную митогеном пролиферацию Т-лимфоцитов. Т-лимфоциты, выделенные из тимусов плодов на Э21, культивировали с митогеном Кона, как описано выше. В отдельные лунки за 30 мин до добавления митогена вносили серотонин в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-8} М или антагонист NAN-190 (10^{-7} М). Через 72 ч оценивали включение $[3H]$ тимидина в клетки.

Оценка влияния митогена Кона на экспрессию мРНК Htr1a рецепторов в тимусе плодов и половозрелых крыс. Т-лимфоциты, выделенные из тимусов плодов (Э18) и двухмесячных крыс (П60), инкубировали 24 ч *in vitro* в присутствии митогена Кона (2.5 мкг/мл) и без него. Затем в тимусах определяли мРНК Htr1a рецепторов методом ПЦР.

Анализ синтеза и секреции цитокинов. Тимусы, выделенные из плодов на Э18, инкубировали в среде RPMI-1640 в присутствии серотонина (10^{-7} М), агониста (8-ОН-DPAT 10^{-7} М) или антагониста (NAN-190 10^{-6} М) Htr1a рецепторов в течение 24 ч. Через 4 ч отбирали пробы среды для оценки выделения цитокинов. Через 24 ч тимусы замораживали и хранили до определения мРНК цитокинов

методом ПЦР, как описано выше. Концентрацию цитокинов в образцах среды определяли с помощью цитометрических бус согласно протоколу производителя (“Rat cytokine flex set for BD Cytometric Bead Array”, BD Bioscience). Использовали бусы для определения цитокинов: ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИФН- γ и фактор некроза опухоли (ФНО- α).

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерных программ Excel и Statistica 7.0. Данные представлены в виде: среднее значение $\pm$ стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Htr1a рецептор экспрессируется в формирующемся тимусе у плодов крыс. Методом ПЦР в развивающемся тимусе плодов крыс обнаружена экспрессия мРНК Htr1a рецептора с Э16 по ПЗ (рис. 1а). С помощью Вестерн-блоттинга на тех же стадиях онтогенеза была подтверждена экспрессия белкового продукта Htr1a (рис. 1б). Анализ клеток, экспрессирующих Htr1a рецептор у плодов на Э19 показал наличие рецептора как в Т-лимфоцитах, так и в стромальных элементах тимуса (рис. 1б).

Пренатальная блокада Htr1a рецепторов в тимусе плодов приводит к долгосрочным изменениям бластогенного потенциала Т-лимфоцитов. Пренатальная блокада Htr1a рецепторов вызывала необратимые изменения функционального состояния Т-клеточного иммунитета в постнатальном разви-

тии. Однократное введение плодам на Э17 *in utero* антагониста NAN-190 приводило к долговременному повышению функциональной активности (бластогенного потенциала) Т-лимфоцитов тимуса, оцениваемой по пролиферативному ответу на Т-клеточный митоген КонаА, как в пре-, так и в постпубертатном периоде жизни (рис. 2).

Блокада Htr1a рецепторов влияет на динамику созревания Т-лимфоцитов в органотипической культуре тимусов плодов. Добавление селективного антагониста Htr1a рецепторов (NAN-190) в органотипическую культуру тимусов, выделенных из плодов на Э18, вызывало существенные изменения в динамике дифференцировки предшественников Т-лимфоцитов в течение 7 дней *in vitro*. Доля наименее зрелых тимоцитов CD4⁻CD8⁻-фенотипа снижалась в 1.7 раза, а популяция двойных позитивных клеток CD4⁺CD8⁺-фенотипа, представляющих следующий этап дифференцировки Т-лимфоцитов, увеличивалась в 3 раза (рис. 3), что свидетельствует об ускорении самых ранних этапов дифференцировки предшественников. На популяции зрелых клеток помощников CD4⁺-фенотипа и цитотоксических лимфоцитов CD8⁺-фенотипа антагонист Htr1a рецептора не оказывал значимого влияния (рис. 3).

Серотонин и антагонист Htr1a рецепторов не оказывают влияния на индуцированную митогеном пролиферацию тимоцитов у плодов крыс. Т-лимфоциты, выделенные из плодов на Э21 способны отвечать на Т-клеточный митоген усилением пролиферации (рис. 4). В отличие от половозрелых животных (Мельникова с соавт., 2012) серотонин в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-4} М, а также антагонист Htr1a рецепторов NAN-190 (10^{-7} М) не влияли на пролиферацию Т-лимфоцитов тимуса, индуцированную митогеном (рис. 4).

Активации Т-лимфоцитов митогеном стимулирует экспрессию мРНК Htr1a рецепторов у половозрелых крыс, но не у плодов. У половозрелых животных активация тимоцитов митогеном вызывала повышение уровня экспрессии мРНК рецептора Htr1a. В отличие от половозрелых животных, у плодов на Э18 активация тимоцитов митогеном в течение 24 ч не влияла на экспрессию мРНК Htr1a рецепторов (рис. 5).

Htr1a рецептор участвует в регуляции синтеза и выделения цитокинов в тимусе плодов. Культивирование целых тимусов, выделенных из плодов на Э18, в присутствии агониста (8-ОН-DPAT, 10^{-7} М) или антагониста (NAN-190, 10^{-6} М) Htr1a рецепторов приводило к изменениям секреции ИЛ-10, ИФН- γ и синтеза мРНК ИЛ-10, ИФН- γ и ФНО- α (рис. 6, 7), но не влияло на экспрессию ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4 (данные не представлены). Исследование секреции цитокинов в среду пока-

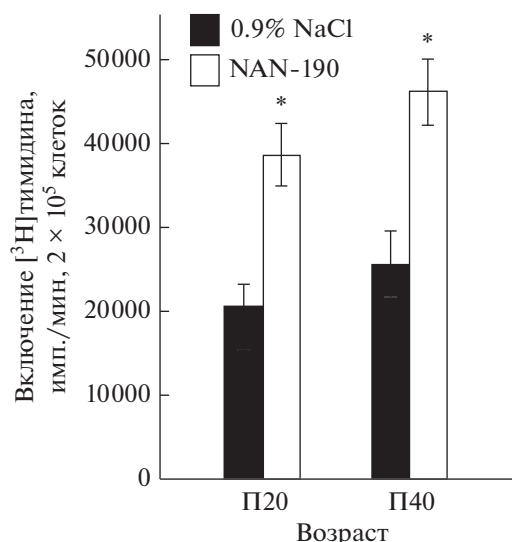


Рис. 2. Индуцированный митогеном конканавалином А (КонаА, 2.5 мкг/мл) пролиферативный ответ лимфоцитов тимуса у крыс, которым на 17-й эмбриональный день однократно вводили антагонист рецепторов к серотонину Htr1a (NAN-190). Контрольным животным вводили 0.9%-ный раствор NaCl. Пролиферативный ответ лимфоцитов оценивали на 20-й и 40-й дни постнатального развития (П20, П40). * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

зало, что через 4 ч культивирования концентрации ИЛ-1 α , ИЛ-2 и ИЛ-4 были менее 40 пг/мл, т.е. ниже предела чувствительности метода. В среде была выявлена относительно высокая концентрация ИЛ-10 (около 300 пг/мл) и ФНО- α (около 200 пг/мл), причем секреция ФНО- α не зависела от серотонина и его рецептора Htr1a. Экспрессия мРНК ФНО- α снижалась под действием экзогенного серотонина или агониста и этот эффект отменялся антагонистом Htr1a (рис. 6). Применение только антагониста (блокада действия внутритимического серотонина) не влияло на экспрессию мРНК ФНО- α (рис. 6).

Экспрессия мРНК ИЛ-10 не менялась в присутствии агониста Htr1a, но снижалась под влиянием антагониста Htr1a (рис. 6). Добавление в среду экзогенного серотонина или агониста Htr1a рецепторов стимулировало выделение ИЛ-10 (рис. 7а). Антагонист Htr1a, добавляемый совместно с агонистом, отменял эффект последнего, а использование только антагониста не влияло на выделение ИЛ-10 (рис. 7а).

Экспрессия мРНК ИФН- γ снижалась в присутствии антагониста и при совместном применении агониста и антагониста, но не менялась при введении только агониста Htr1a рецептора (рис. 6). Концентрация ИФН- γ в культуральной среде в контроле составляла около 65 пг/мл и не менялась в присутствии агониста Htr1a рецепто-

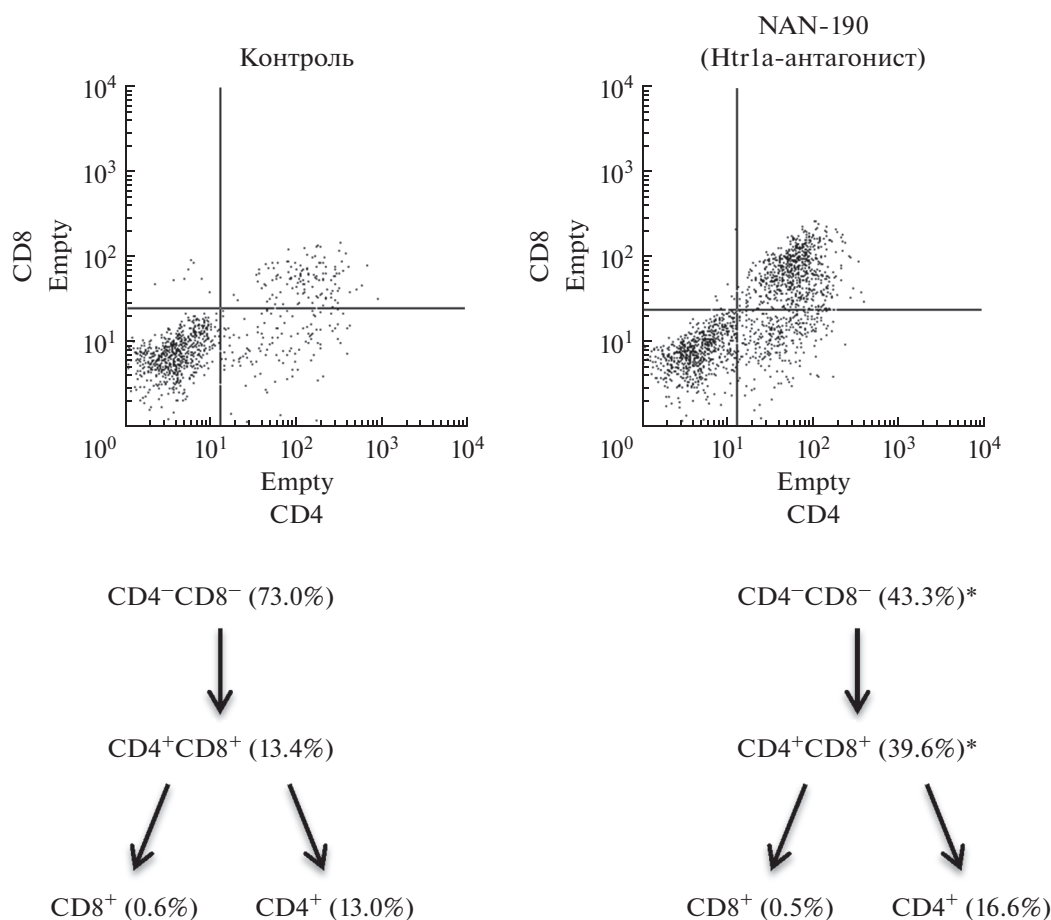


Рис. 3. Влияние антагониста Htr1a рецепторов (NAN-190) на дифференцировку Т-лимфоцитов в тимусе плодов. Органотипическую культуру тимусов, выделенных из 18-дневных плодов, поддерживали в течение 7 дней *in vitro*, в культуральную среду добавляли NAN-190 (10^{-7} М). Экспрессию антигенов CD4 и CD8 анализировали с помощью проточной цитометрии. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

ров (рис. 76). Добавление в среду экзогенного серотонина незначительно усиливало выделение ИФН- γ клетками тимуса. Блокада действия внутритимического серотонина с помощью антагониста Htr1a рецепторов снижала секрецию ИФН- γ , также как и совместное применение агониста и антагониста Htr1a (рис. 76). Добавление в среду экзогенного серотонина стимулировало экспрессию мРНК Htr1a.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным, у плодов крыс клетки формирующегося тимуса экспрессируют Htr1a рецептор на всех изученных стадиях онтогенеза (Э16–П3). Блокада Htr1a в период активного формирования тимуса приводит к стойкому повышению функциональной активности (увеличению blastogenic potential) Т-лимфоцитов в постнатальном периоде жизни. Активация Htr1a рецепторов в эмбриональном тимусе

изменяет баланс цитокинов, которые, по-видимому, являются одним из ключевых звеньев, опосредующих морфогенетический эффект серотонина на формирование органа.

Присутствие как мРНК, так и соответствующего белкового продукта Htr1a на стадиях Э16–Э21, в эмбриональном тимусе свидетельствует о возможности прямого действия серотонина на формирующийся орган у плодов. Следует отметить, что белок Htr1a обнаруживается не только на созревающих предшественниках Т-лимфоцитов, но и на клетках стромы тимуса. Эмбриональный тимус является динамичной системой, где элементы стромы и тимоциты активно взаимодействуют, и дифференцировка стромальных элементов тимуса принципиальным образом зависит от взаимодействия с первыми лимфопоэтическими предшественниками (Meilin et al., 1995; Anderson et al., 2006), заселяющими эпителиальную закладку тимуса на Э13–16 (Brelinska, Malinska, 2005). Дифференцирующие предшественники являются транзитной, по-

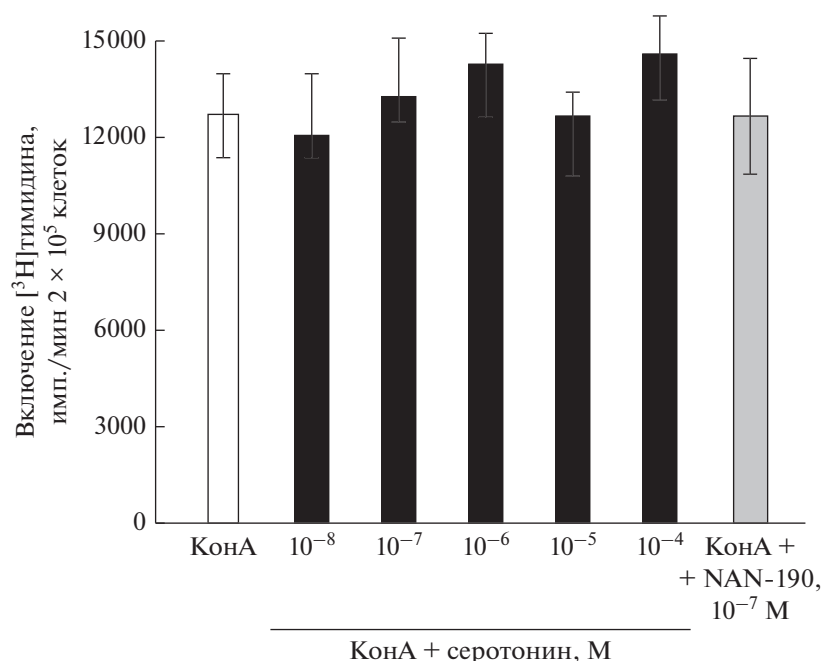


Рис. 4. Влияние серотонина (10^{-8} – 10^{-4} М) и антагониста Htr1a рецепторов (NAN-190 10^{-7} М) на индуцированный митогеном конканавалином А (Кона 2.5 мкг/мл) пролиферативный ответ тимоцитов, выделенных из 21-дневных плодов. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

стоянно обновляющейся популяцией в тимусе, в то время как стромальные клетки представляют собой резидентную популяцию, собственно составляющую ткань тимуса. Строма тимуса обеспечивает дифференцировку предшественников Т-лимфоцитов на протяжении всей жизни (Su, Manley, 2000; Anderson et al., 2006). Это позволяет предположить, что выявленные нами отдаленные последствия блокады Htr1a у плодов обусловлены стойкими изменениями именно в стромальных элементах тимуса. В нашем исследовании введение плодам селективного антагониста Htr1a рецепторов именно в период, когда возможно координирующее действие серотонина на созревание всех типов клеток тимуса, подтверждает это предположение. Однако, нельзя исключать, что наряду с прямым действием серотонина, через рецепторы в тимусе, возможно и опосредованное влияние серотонина на тимус через нейро-эндокринную систему, которая также является мишенью для морфогенетического действия серотонина (Ugrumov et al., 1994; Pronina et al., 2003).

Для изучения роли синтезируемого локально в тимусе серотонина были проведены исследования на модели органотипической культуры эмбрионального тимуса. Согласно полученным данным прямая блокада рецепторов Htr1a ускоряет дифференцировку Т-лимфоцитов на самых ранних стадиях (двойных негативных и двойных позитивных Т-лимфоцитов) и не влияет существенно на обра-

зование наиболее зрелых форм — Т-клеток-помощников и цитотоксических Т-лимфоцитов. Использование в данной модели антагониста рецепторов, а не добавление экзогенного серотонина, свидетельствует о том, что наблюдаемые эффекты обусловлены именно внутритимическим серотонином, а не поступающим из общей циркуляции. Полученные результаты хорошо дополняют существующие представления о том, как происходит дифференцировка стромальных клеток тимуса в эмбриогенезе, согласно которым предшественники Т-лимфоцитов, заселяющие тимус в пренатальном периоде развития, задерживаются в органе значительно дольше, чем это необходимо для дифференцировки предшественников у постнатальных крыс (Manley, 2000; Brelinska, Malinska, 2005). По-видимому, задержка пренатальной волны миграции связана с тем, что эти клетки заселяют совсем незрелый зачаток тимуса и необходимы для полноценной дифференцировки стромальных элементов. Наши данные позволяют предположить, что одним из механизмов, который в норме притормаживает дифференцировку ранних стадий предшественников Т-лимфоцитов и тем самым удлиняет время пребывания первой волны миграции в формирующемся тимусе, может быть активация Htr1a рецепторов на стромальных элементах локальным серотонином.

Помимо влияния на строму тимуса, серотонин, несомненно, действует и на дифференциру-

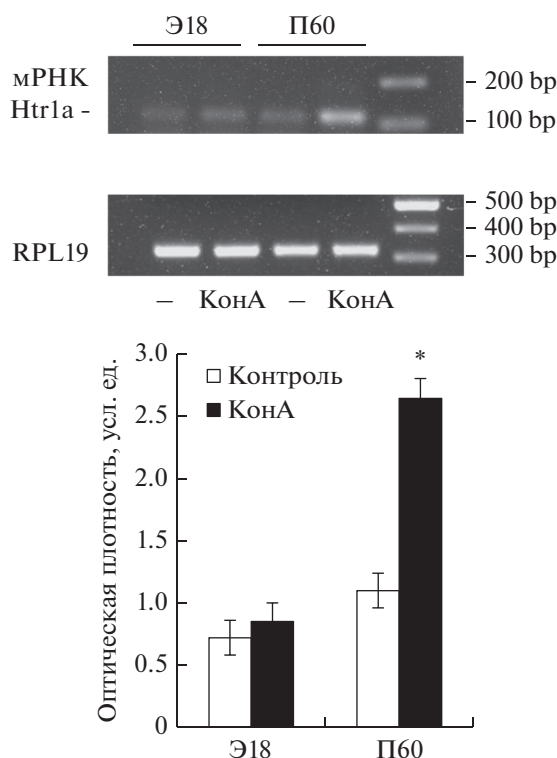


Рис. 5. Влияние митогена конканавалина А (КонА 2.5 мкг/мл) на экспрессию мРНК Htr1a рецепторов в Т-лимфоцитах, выделенных из тимусов 18-дневных плодов (Э18) и двухмесячных крыс (П60), и инкубированных 24 ч *in vitro*. Представлены результаты электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР и оптическая плотность полос. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

ющиеся Т-лимфоциты. Известно, что у взрослых животных серотонин через свой рецептор Htr1a стимулирует пролиферацию активированных Т-лимфоцитов (Aune et al., 1993; Abdouh et al., 2001). В зрелых Т-клетках, выделенных из селезенки и периферической крови, при активации митогеном повышается уровень экспрессии рецептора Htr1a, что, в свою очередь, усиливает пролиферативный ответ Т-лимфоцитов (Abdouh et al., 2001, 2004). В нашем предыдущем исследовании мы показали, что серотонин аналогичным образом влияет на активированные Т-лимфоциты, выделенные из тимуса половозрелых крыс (Мельникова с соавт., 2012). При активации этих клеток митогеном КонА серотонин усиливает их пролиферацию через индукцию своего рецептора (Abdouh et al., 2001). В противоположность этому, эмбриональные тимоциты, хотя и были способны к усилению пролиферативного ответа на митоген, оказались нечувствительны к серотонину и антагонисту Htr1a рецептора. При этом митоген не влиял на экспрессию Htr1a в Т-лимфоцитах, выделенных из тимуса плодов. Такая разница в эффектах серотонина на дифференцирующиеся тимоциты у взрослых и плодов может быть обусловлена малой долей Т-клеток поздних стадий дифференци-

ровки в тимусе плодов. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что механизмы регуляции экспрессии рецептора Htr1a в зрелых и незрелых предшественниках Т-лимфоцитов различаются.

Обнаруженный нами факт, что серотонин через Htr1a рецептор способен влиять на экспрессию цитокинов позволяет предположить возможный механизм долгосрочных изменений в функционировании Т-клеточного звена иммунитета. Известно, что цитокины являются основными медиаторами, обеспечивающими коммуникацию между клетками в тимусе. Существенно, что они представляют собой факторы короткодистантного действия и характеризуются определенной пространственной приуроченностью к местам реализации их эффектов. В тимусе цитокины экспрессируются в основном конститутивно. Главным источником цитокинов являются стромальные элементы — эпителиальные клетки тимуса. При этом субкапсулярные и медулярные эпителиальные клетки отличаются более широким спектром продуцируемых цитокинов по сравнению с кортикальными клетками, тем самым создавая микроокружение, поддерживающее созревание Т-клеток на соответствующих

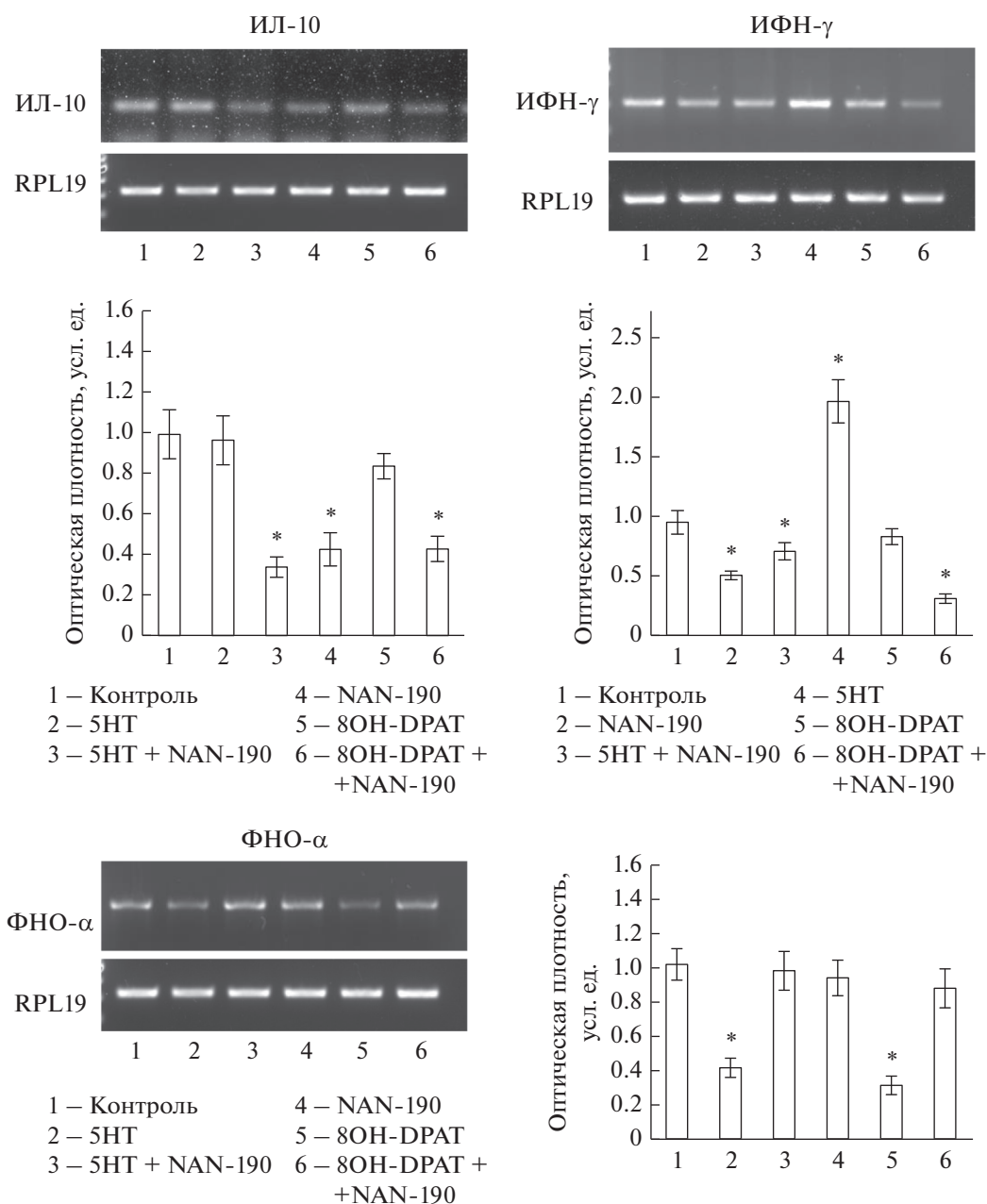


Рис. 6. Влияние серотонина (5HT, 10^{-7} М), агониста (8OH-DPAT 10^{-7} М) и антагониста (NAN-190 10^{-6} М) Htr1a рецепторов на экспрессию мРНК цитокинов ИЛ-10, ИФН-γ и ФНО-α в тимусах, выделенных из 18-дневных плодов и инкубированных 24 ч *in vitro*. Представлены результаты электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР и оптическая плотность полос. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

стадиях. Уровень экспрессии цитокиновых генов и выделение самих цитокинов зависит от взаимодействия тимусных эпителиальных клеток и тимоцитов (Yarilin, Belyakov, 2004). В отличие от стромы, тимоциты продуцируют цитокины не конститутивно, а в зависимости от стадии зрелости. У незрелых кортикальных тимоцитов фенотипа $CD4^+CD8^+$ способность секретировать ци-

токины снижена по сравнению с более поздними стадиями дифференцировки (Wolf, Cohen, 1992).

В пренатальном периоде развития экспрессия генов цитокинов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток в тимусе, начинается не одновременно. У мышей выделяют группу “ранних” цитокинов, мРНК которых обнаруживается с Э14 (соответствует у крыс приблизительно Э16) –

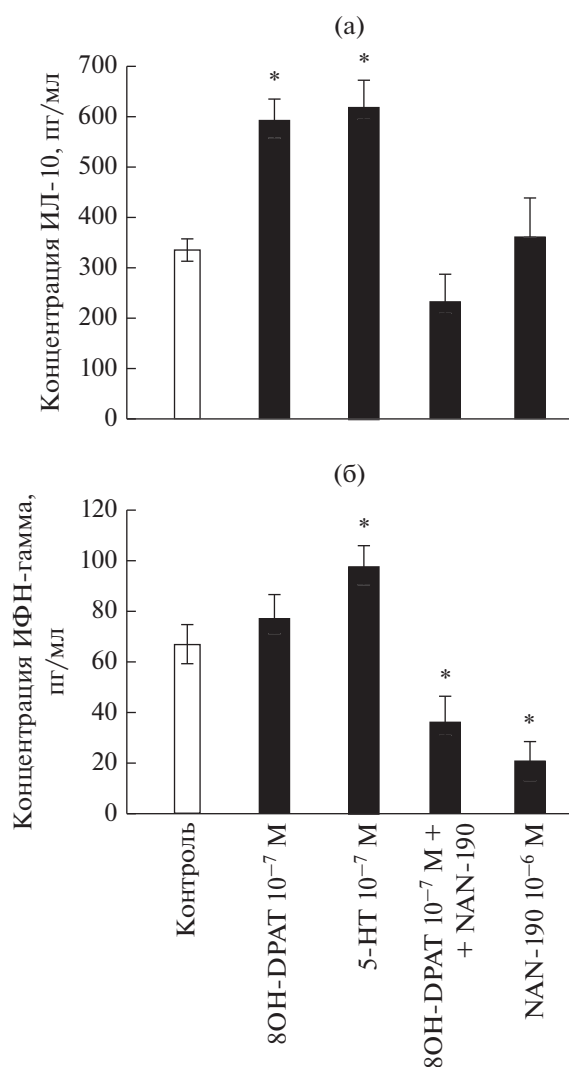


Рис. 7. Влияние серотонина (5НТ, 10^{-7} М), агониста (8ОН-DРАТ 10^{-7} М) и антагониста (NAN-190 10^{-6} М) Htr1a рецепторов на секрецию цитокинов ИЛ-10 (а) и ИФН- γ (б) в тимусах, выделенных из 18-дневных плодов и инкубированных 4 ч *in vitro*. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7 и ИФН- γ . С небольшой задержкой в 2–3 дня начинают экспрессироваться цитокины ИЛ-1 α , ИЛ-2, ИЛ-3, GM-CSF (Montgomery, Dallman, 1991). При этом синтез ИЛ-7, стимулирующего пролиферацию, но не дифференцировку Т-лимфоцитов, замедляется к моменту синтеза ИЛ-2, что свидетельствует о вовлечении определенных цитокинов на определенных стадиях развития тимуса. В тимусе взрослых млекопитающих цитокины функционируют в виде “малой цитокиновой сети” и представляют собой факторы, осуществляющие взаимодействие клеток и индуцирующие синтез друг друга (Yarilin, Belyakov, 2004). Подобную функцию они выполняют, вероятно, и в раннем развитии тимуса. В

формирующемся тимусе плодов цитокины играют важную роль в образовании клеточных ниш, способных впоследствии поддерживать корректное созревание Т-лимфоцитов (Van Ewijk et al., 2000; Nitta et al., 2011). В нашей работе мы показали, что блокада рецепторов Htr1a (т.е. блокада действия серотонина, синтезируемого в тимусе) снижает экспрессию мРНК и секрецию цитокина ИФН- γ , в то время как активация рецептора Htr1a подавляет синтез мРНК ФНО- α . Известно, что эти плейотропные цитокины участвуют в регуляции межклеточных взаимодействий, апоптоза, морфогенеза (Yarilin, Belyakov 2004). Концентрации ИЛ-1 α , ИЛ-2 и ИЛ-4 были ниже предела чувствительности метода (менее 40 пг/мл) и в культуральной среде не определялись. В то же время активация Htr1a агонистом усиливала секрецию регуляторного цитокина ИЛ-10, исходный уровень которого в контроле был относительно высоким (300 пг/мл). Антагонист Htr1a снижал синтез мРНК цитокина ИЛ-10. Полученные результаты показывают, что активация или блокада Htr1a рецептора меняет соотношение различных цитокинов в тимусе. Существующие к настоящему времени данные не позволяют нам обсуждать роль каждого цитокина в эмбриогенезе. Тем не менее, правильный баланс цитокинов в формирующемся тимусе крайне важен для корректного органогенеза. С другой стороны, его чувствительность к воздействию внешних факторов делает возможной тонкую подстройку внутритимического микроокружения. Способность серотонина влиять на экспрессию цитокинов может лежать в основе механизмов онтогенетической пластичности иммунной системы. Поскольку внешние и материнские факторы способны изменять уровень серотонина в общей циркуляции у плодов, этот мономерин может выступать связующим звеном между окружающей средой и формирующейся иммунной системой.

На развитие тимуса может влиять серотонин, поступающий из разных источников. Как показали наши последние исследования, у плодов крыс серотонин синтезируется клетками тимуса (Лифанцева с соавт., 2017). Из данных литературы известно, что серотонин циркулирует в крови плодов крыс в значительной концентрации. В отличие от взрослых животных, у плодов в отсутствие гематоэнцефалического барьера ведущую роль в создании физиологически активной концентрации серотонина в крови играет мозг (Насырова с соавт., 2009). Известно, что стресс или воспаление у матери стимулируют синтез серотонина плацентой и повышают уровень серотонина в крови плода (Williams et al., 2017). До настоящего времени внимание ученых было сконцентрировано на возможных последствиях изменения уровня серото-

нина в крови плодов для развивающегося мозга. Установлено, что при стрессе и воспалении у матери нарушается рост аксонов и созревание ряда отделов головного мозга у плодов, а механизмы таких изменений реализуются через Htr1a рецепторы на нейронах (Balakrishnan et al., 2013; Goeden et al., 2016). Мутации в гене Htr1a ассоциированы с патогенезом шизофрении, биполярного расстройства и ряда других патологий (Gleason et al., 2010; Van Velzen, Toth, 2010). В то же время показано, что у человека некоторые нарушения развития мозга сопровождаются патологиями иммунной системы, например, аутоиммунными расстройствами (Michel et al., 2012). Принято считать, что сопутствующие иммунологические патологии вторичны, обусловлены влиянием нервной системы на формирование иммунной. Поскольку в онтогенезе формирование мозга и тимуса происходит параллельно, наши данные о роли Htr1a в развитии тимуса свидетельствуют о том, что в основе регуляции развития нервной и иммунной систем могут лежать независимые механизмы, опосредованные сходным пулом активных молекул, в частности моноаминами.

Таким образом, в развивающемся тимусе плодов крыс морфогенетический эффект серотонина реализуется при участии Htr1a рецептора, от активации которого зависит экспрессия определенных цитокинов и, как следствие, дифференцировка клеточных элементов стромы и тимоцитов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН за использование оборудования ЦКП при проведении работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН (№ ГЗ 0108-2019-0002) и при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 17-14-01353).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными до и после экспериментальных вмешательств соответствовали международным нормам по биоэтике. План экспериментов одобрен Комиссией по биоэтике ИБР им. Н.К. Кольцова РАН (экспертное заключение № 22 от 15 марта 2018 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Н.В. Лифанцева, Ц.О. Конеева, Г.В. Луценко — выполнение экспериментов, статистическая обработка данных; С.Н. Воронова — получение самок с датированной беременностью, уход за животными в послеоперационный период; Л.А. Захарова — участие в обсуждении результатов и написании текста статьи; В.И. Мельникова — планирование экспериментов, выполнение экспериментов, анализ результатов и написание текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лифанцева Н.В., Конеева Ц.О., Воронежская Е.Е. и др. Экспрессия компонентов серотонинергической системы в развивающемся тимусе крыс // ДАН. 2017. Т. 477. № 6. С. 745–748.
- Мельникова В.И., Извольская М.С., Воронова С.Н. и др. Роль серотонина в становлении и функционировании иммунной системы на разных этапах онтогенеза // Известия РАН. Серия биологическая. 2012. № 3. С. 288–295.
- Насырова Д.И., Сапронова А.Я., Балбаев А.В. и др. Развитие центральной и периферической серотонин-продуцирующей систем у крыс в онтогенезе // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 2009. Т. 45. № 1. С. 68–74.
- Abdough M., Storrington J.M., Riad M. et al. Transcriptional mechanisms for induction of 5-HT_{1A} receptor mRNA and protein in activated B and T lymphocytes // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 4382–4388.
- Abdough M., Albert P.R., Drobetsky E. et al. 5-HT_{1A}-mediated promotion of mitogen-activated T and B cell survival and proliferation is associated with increased translocation of NF-κB to the nucleus // Brain, Behavior and Immunity. 2004. V. 18. P. 24–34.
- Albert P.R., Lemonde S. 5-HT_{1A} Receptors, gene repression, and depression: Guilt by association // Neuroscientist. 2004. V. 10. № 6. P. 575–593.
- Arreola R., Becerril-Villanueva E., Cruz-Fuentes C. et al. Immunomodulatory effects mediated by serotonin // J. Immunol. Res. 2015. V. 2015. Article ID 354957. <https://doi.org/10.1155/2015/354957>
- Anderson G., Lenkinson W.E., Jones T. et al. Establishment and functioning of intrathymic microenvironments // Imm. Rev. 2006. V. 209. P. 10–27.
- Aune T.M., McGrath K.M., Sarr T. et al. Expression of 5HT_{1A} receptors on activated human T cells. Regulation of cyclic AMP levels and T cell proliferation by 5-hydroxytryptamine // J. Immunol. 1993. V. 151. P. 1175–1183.
- Aune T.M., Golden H.W., McGrath K.M. Inhibitors of serotonin synthesis and antagonists of serotonin 1A receptors inhibit T lymphocyte function in vitro and cell-me-

- diated immunity *in vivo* // J. Immunol. 1994. V. 153. № 2. P. 489–498.
- Baganz N.L., Blakely R.D. A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin // ACS Chem. Neurosci. 2013. V. 4. № 1. P. 48–63.
- Balakrishnan B., Dai H., Janisse J. et al. Maternal endotoxin exposure results in abnormal neuronal architecture in the newborn rabbit // Dev. Neurosci. 2013. V. 35. P. 396–405.
- Brelinska R., Malinska A. Homing of hemopoietic precursor cells to the fetal rat thymus: intercellular contact-controlled cell migration and development of the thymic microenvironment // Cell. Tissue Res. 2005. V. 322. P. 393–405.
- Clözé-Tayarani I., Changeux J.P. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective // J. Leukoc. Biol. 2007. V. 81. № 3. P. 599–606.
- Cunningham C.A., Teixeira E., Daniels M.A. FTOC-based analysis of negative selection in T-cell development // Methods in Molecular Biology / Eds. Bosselut R.S., Vacchio M., N.Y.: Humana Press, 2016. V. 1323. P. 141–149.
- Gleason G., Liu B., Bruening S. et al. The serotonin 1A receptor gene as a genetic and prenatal maternal environmental factor in anxiety // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 7592–7597.
- Goeden N., Velasquez J., Arnold K.A. et al. Maternal inflammation disrupts fetal neurodevelopment via increased placental output of serotonin to the fetal brain // J. Neurosci. 2016. V. 36. P. 6041–6049.
- Herr N., Bode C., Duerschmied D. The effects of serotonin in immune cells // Front. Cardiovasc. Med. 2017. V. 4. P. 48.
- Kishi T., Okochi T., Tsunoka T. et al. Serotonin 1A receptor gene, schizophrenia and bipolar disorder: an association study and meta-analysis // Psychiatry Res. 2011. V. 185. P. 20–26.
- Kroeze W.K., Roth B.L. Molecular biology and genomic organization of G protein-coupled serotonin receptors // The Serotonin Receptors: From Molecular Pharmacology to Human Therapeutics / Ed. Roth B.L. Totowa. Humana Press. 2006. P. 1–38.
- Manley N.R. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation // Immunology. 2000. V. 12. P. 421–428.
- Meilin A., Shoham J., Schreiber L. et al. The role of thymocytes in regulating thymic epithelial cell growth and function // Scand. J. Immunol. 1995 V. 42. P. 185–190.
- Melnikova V.I., Lifantseva N.V., Voronova S.N. et al. Gonadotropin-releasing hormone in regulation of thymic development in rats: Profile of thymic cytokines // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 16. P. 4033. <https://doi.org/10.3390/ijms20164033>
- Michel M., Schmidt M.J., Mirnics K. Immune system gene dysregulation in autism and schizophrenia // Dev. Neurobiol. 2012. V. 72(10). P. 1277–1287.
- Montgomery R.A., Dallman M.J. Analysis of cytokine gene expression during fetal thymic ontogeny using the polymerase chain reaction // J. Immunol. 1991. V. 147. P. 554–560.
- Nitta T., Ohigashi I., Nakagawa Y. et al. Cytokine crosstalk for thymic medulla formation // Curr. Op. Immunol. 2011. V. 23. P. 190–197.
- Pronina T., Ugrumov M., Adamskaya E. et al. Influence of serotonin on the development and migration of gonadotropin-releasing hormone neurones in rat fetuses // J. Neuroendocrinol. 2003. V. 15. № 6. P. 549–558.
- Su D.M., Manley N.R. Hoxa3 and Pax1 transcription factors regulate the ability of fetal thymic epithelial cells to promote thymocyte development // J. Immunol. 2000. V. 164. № 11. P. 5753–5760.
- Ugrumov M.V., Trembleau A., Roche D. et al. Monoamine influence on neuropeptide gene expression during ontogenesis // Acta Biol. Hung. 1994. V. 45. P. 441–450.
- Van Ewijk W., Hollander G., Terhorst C. et al. Stepwise development of thymic microenvironments *in vivo* is regulated by thymocyte subsets // Development. 2000. V. 127. № 8. P. 1583–1591.
- Van Velzen A., Toth M. Role of maternal 5-HT(1A) receptor in programming offspring emotional and physical development // Genes Brain Behav. 2010. V. 9(8). P. 877–885.
- Williams M., Zhang Z., Nancea E. et al. Maternal inflammation results in altered tryptophan metabolism in rabbit placenta and fetal brain // Dev. Neurosci. 2017. V. 39(5). P. 399–412.
- Wolf S.S., Cohen A. Expression of cytokines and their receptors by human thymocytes and thymic stromal cells // Immunology. 1992. V. 77. № 3. P. 362–368.
- Yarilin A.A., Belyakov I.M. Cytokines in the thymus: production and biological effects // Curr. Med. Chem. 2004. V. 11. № 4. P. 447–464.

Expression and Role of Serotonin Receptor 1a in the Rat Embryonic Thymus

N. V. Lifantseva¹, Ts. O. Koneeva¹, S. N. Voronova¹, G. V. Lutsenko²,
L. A. Zakharova¹, and V. I. Melnikova^{1,*}

¹Koltsov Institute of Developmental Biology RAS, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: v_melnikova@mail.ru

Serotonin is involved in the regulation of a wide range of immune functions in adult animals. Previously, we have shown that the suppression of serotonin synthesis in fetuses during the thymus development leads to long-term irreversible changes in the T-cell immunity. However, the mechanisms of the morphogenetic effect of serotonin on the development of thymus remain unclear. In this study, the expression of mRNA and serotonin receptor type 1A (Htr1a) protein was revealed in fetal thymus. A single *in utero* administration of Htr1a antagonist (NAN-190) to the fetuses on the 17th day of embryonic development caused a persistent increase in the functional activity of T-lymphocytes in postnatal life. In fetal thymus organotypic culture we demonstrated that Htr1a blockade accelerates the differentiation of T-lymphocytes at the earliest stages and has little effect on the mature forms - T-helpers and cytotoxic T-cells. The presence of Htr1a receptors in the developing thymus confirms the possibility of the direct influence of serotonin on the formation of this organ. It was found that serotonin through Htr1a is able to change the cytokine balance in the developing thymus, which may be the basis of mechanisms of ontogenetic plasticity of the immune system. Cytokines responsible for the differentiation of the cell in the thymus are one of the key links through which the morphogenetic effect of serotonin, mediated by the activation of the Htr1a receptor, is realized.

Keywords: serotonin, Htr1a receptor, thymus, ontogenesis, rat

МЕХАНИЗМ ПРОРАСТАНИЯ ПЫЛЬЦЫ И РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК У МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*JUNIPERUS COMMUNIS* L.) *IN VITRO*

© 2020 г. М. В. Сурсо^а, *, Д. Г. Чухчин^б, С. С. Хвиюзов^а, С. А. Покрышкин^б

^аФедеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики РАН, наб. Северной Двины, 23, Архангельск, 163000 Россия

^бСеверный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, наб. Северной Двины, 17, Архангельск, 163000 Россия

*e-mail: surso@fciarctic.ru

Поступила в редакцию 05.09.2019 г.

После доработки 14.04.2020 г.

Принята к публикации 17.04.2020 г.

Пыльцевые трубки являются популярным объектом при изучении физиолого-биохимических и структурно-динамических процессов в растительных клетках. Большая часть таких исследований посвящена пыльцевым трубкам цветковых растений с коротким репродуктивным циклом. Изучению пыльцевых трубок голосеменных уделяется значительно меньше внимания. В статье рассматриваются процессы гидратации пыльцевых зерен и развитие пыльцевых трубок у можжевельника обыкновенного. Зрелое пыльцевое зерно можжевельника находится в дегидратированном состоянии и содержит не более 2–3% свободной влаги. Регидратация приводит к активации метаболизма, прорастанию пыльцы и росту пыльцевых трубок. Гидратация пыльцевого зерна можжевельника, приводящая к образованию гидрофильной капсулы, вскрытию и сбрасыванию экзины, представляет последовательность событий, контролируемых, вероятнее всего, белками наружной ядерной мембраны микроспоры. В орбиклах пыльцевых зерен можжевельника выявлено необычно большое содержание мом-инозитола, необходимого, вероятно, для быстрой диффузии воды в средний слой интины и образования гидрофильной капсулы. В пыльцевых трубках можжевельника обнаружено два фитостероида: бета-ситостерин и кампестерин, стимулирующих прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок. Везикулы, перемещаясь в гиалоплазме пыльцевой трубки, скапливаются вблизи ее кончика. Везикулы своими мембранами внедряются в мембрану кончика трубки, высвобождая наружу свое содержимое. Наибольшая концентрация митохондрий в растущих пыльцевых трубках наблюдается вблизи обоих ядер и по периферии протопласта, ассоциированного с ядром клетки трубки. В пыльцевых трубках обыкновенного можжевельника между ядром клетки трубки и генеративным ядром велика вероятность существования канала редокс-сигнальной связи. Не исключено, что такая связь может активироваться белками наружных мембран обоих или одного из ядер.

Ключевые слова: можжевельник, пыльца, пыльцевая трубка, инфракрасная спектроскопия, пиролиз, стероиды, орбикулы, мом-инозитол, редокс-сигналинг

DOI: 10.31857/S0475145020050079

ВВЕДЕНИЕ

Пыльцевые трубки у большинства видов голосеменных служат средством доставки мужских половых клеток к архегониям, за исключением цикадовых и гингко, у которых они выполняют гаусториальную функцию (Козубов и др., 1982). В пыльцевых трубках обычно происходят и заключительные этапы микрогаметогенеза. Прорастание пыльцы, рост и развитие пыльцевых трубок

являются важнейшей составляющей половой репродукции растений. Современные представления о развитии пыльцевых трубок базируются, в основном, на результатах исследований пыльцевых трубок покрытосеменных растений *in vitro* (Krichevsky et al., 2007).

Процессы гидратации пыльцевых зерен, прорастания пыльцы, роста и развития пыльцевых трубок у можжевельника изучены недостаточно. Следует отметить, что механизмы гидратации пыльцы очень сильно зависят от структурных и физиолого-биохимических составляющих пыльцевого зерна, поэто-

Аббревиатуры: FTIR: инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием, DCF-DA: 2,7-дихлорофлуоресцеин диацетат, АФК: активные формы кислорода.

Таблица 1. Характеристика полос поглощения в ИК-спектрах

Положение полосы, см ⁻¹	Отнесение полос поглощения
3200–3600	Валентные колебания гидроксильных групп, вовлеченных в водородную связь
2920, 2875–2850	Валентные колебания связей С–Н в метильных и метиленовых группах
1735–1740	Валентные колебания карбонильных групп, несопряженных кетонов и карбоксильных групп
1605, 1512, 1430	Скелетные колебания ароматического кольца
1650–1630	Валентные колебания связей О–Н связанной воды
1030, 1060, 1100	Валентные колебания С–О связи полисахаридов
855, 815, 750–770 (плечо)	Внеплоскостные деформационные колебания С–Н связи ароматического кольца

му изучение их роли в процессах прорастания пыльцы у разных видов также имеет большое значение.

Морфология пыльцы и ультраструктура оболочки пыльцевых зерен видов р. *Juniperus* рассматриваются в работах Д. Сауворза (Southworth, 1986) и Р. Моханти с соавт. (Mohanty et al., 2016), а также в обзоре М.Х. Курманна (Kurmann, 1994). Процессы гидратации пыльцы и механизмы сбрасывания экзины у видов сем. Cupressaceae описаны всего лишь в нескольких экспериментальных работах (Duhoux, 1982; Chichiricco, Pacini, 2008; Takaso, Owens, 2008; Chichiricco et al., 2009; Danti et al., 2011). Обзорных статей, где рассматривались бы особенности роста и развития пыльцевых трубок видов сем. Cupressaceae, также немного (Fernando et al., 2005). Экспериментальных работ, посвященных росту и развитию пыльцевых трубок можжевельника обыкновенного, крайне мало (Diavanshir, Fechner, 1975; Surso, 2018), за исключением серии статей Е. Дьюо (Duhoux, 1972a, 1972b; 1974), существенно восполнивших этот пробел.

В этой статье интерпретируются новые оригинальные экспериментальные данные о процессах гидратации пыльцы и развития пыльцевых трубок у можжевельника обыкновенного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

FTIR-спектроскопия

Относительное содержание групп химических соединений в пыльцевых трубках, пыльце и в орбиклах можжевельника изучали с использованием FTIR-спектроскопии методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Образец пыльцевых трубок можжевельника для анализа готовили следующим образом. После прорастания на агаровой среде с 5%-ной (w/v) сахарозой в течение 7 дней в термостате при 26.5°C пыльцевые трубки смывали с поверхности геля dH₂O. Суспензию осаждали центрифугированием при 1.5 тыс. об./мин. Пеллеты трижды промы-

вали в dH₂O, суспензию каждый раз центрифугировали при 1.5 тыс. об./мин. Образец пыльцевых трубок замораживали при –80°C и лиофильно высушивали. Образец пыльцы, очищенной от примесей просеиванием через мелкое сито, использовался для анализа без дополнительной обработки. Образец орбиклов готовился следующим образом. Водная суспензия пыльцы просеивалась на виброшейкере Retsch через сито с диаметром отверстий 20 мкм. Прошедшая через сито фракция центрифугировалась 10 мин при 4200 об./мин. Пеллеты замораживались при –80°C и высушивались лиофильно.

ИК-спектры записывались на ИК-Фурье-спектрофотометре IR Prestige 21 (Shimadzu, Япония) с приставкой НПВО MIRacle с призмой ZnSe (Pike, США). Полученные значения коэффициентов пропускания преобразовывались в единицы оптической плотности обработкой полученных спектров функцией АТР-коррекции с помощью программы IR Solution. В табл. 1 приведено отнесение характеристических полос поглощения к соответствующим связям.

С целью количественной оценки компонентного состава исследуемых образцов были рассчитаны величины относительной оптической плотности (K) с использованием внутреннего стандарта. Поскольку во всех исследованных образцах углеводы являются основным компонентом, в качестве внутреннего стандарта выбрана интенсивная полоса поглощения 3300 см⁻¹, соответствующая колебаниям гидроксильных групп. Оптические плотности определены относительно базовой линии, которую проводили по волновым числам 4000, 3800, 2400, 1800, 800, 600 см⁻¹ с помощью программы IRSolution. Величины K рассчитывались по формуле:

$$K = \frac{D_K}{D_{CT}},$$

где D_k — оптическая плотность характеристической полосы поглощения компонента, $D_{ст}$ — оптическая плотность внутреннего стандарта 3300 см^{-1} .

Пиролиз

Для пиролиза образцы готовились так же, как и для FTIR-спектроскопии. Для анализа бралась навеска $0.11\text{--}0.35$ мг. Образец подвергался пиролическому разложению с использованием пиролизера EGA/PY-3030D (Frontier Lab) с криоловушкой. Анализ продуктов пиролиза проб проводился методом газовой хромато-масс-спектрометрии на приборе GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Япония). Условия пиролиза: газовая среда — гелий, температура пиролиза 600°C , криофокусирование продуктов пиролиза в течение одной минуты, температура криоловушки -197°C . Разделение: колонка капиллярная HP-5MS, диаметр 0.25 мм, толщина неподвижной фазы 0.25 мкм, длина колонки 30 м. Ввод пробы делением потока $1 : 500$, температура устройства ввода 300°C , газ-носитель — гелий, управление потоком газа — постоянное давление, поток через колонку 1 мл/мин, начальная температура термостата 40°C , подъем температуры со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$, конечная температура термостата 350°C , изотерма 10 мин, температура устройства сопряжения 300°C , температура ионного источника 230°C , энергия ионизации 70 эВ. Настройка масс-детектора: температура интерфейса 280°C , температура ионного источника 230°C . Режим работы масс-детектора — TIC (сканирование масс-спектра), диапазон сканирования масс $30\text{--}600$ Да. Напряжения на ионном источнике и детекторе — по результатам автотюнинга. Напряжение на детекторе 0.7 кВ. Интегрирование автоматическое, корректировка результатов интегрирования ручная. Библиотечный поиск по библиотекам масс-спектров NIST-11/Wiley-10.

Флуоресцентная микроскопия

Лизосомы в гидратированной пыльце и в пыльцевых трубках окрашивали лизосомальным окрашивающим реагентом Absam-Red/Сytoraинter (ab112137), являющимся флуорогенным зондом для маркировки лизосом живых клеток. Митохондрии в пыльцевых трубках окрашивали митохондриальным окрашивающим реагентом Absam-Red/Сytoraинter (ab176832), являющимся флуорогенным зондом для маркировки митохондрий живых клеток. Окрашивание препаратов живых пыльцевых трубок и пыльцы выполняли в соответствии с протоколами компании-производителя. Результаты исследования визуализировали на флуоресцентном микроскопе Altami Lum 1LED (светофильтр G, $460\text{--}550$ нм).

Общий пул АФК выявляли с помощью флуоресцентного красителя DCF-DA. Окрашивание

нативных препаратов пыльцы и пыльцевых трубок проводили в течение $1.5\text{--}2$ ч при 26.5°C в темноте. Конечная концентрация красителя в суспензии составляла 50 мкМ. Окрашенные препараты трижды промывались в dH_2O и просматривались на флуоресцентном микроскопе Altami Lum 1LED (светофильтр B, $420\text{--}485$ нм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности морфологии пыльцевых зерен и прорастание пыльцы можжевельника

У можжевельника обыкновенного пыльцевое зерно шаровидное, диаметром около 25 мкм, с одной функциональной порой, прикрытой крышечкой (рис. 1а), которая теряется при гидратации.

Поверхность экзины хаотично усеяна многочисленными орбикулами, часть которых при гидратации отрывается, оставляя после себя крошечные перфорации (рис. 1б). Орбикулы диаметром около 150 нм, шаровидные, с “шипами” пирамидальной формы (рис. 1в). На микрофотографиях, полученных с помощью ТЕМ, экзина у видов *Juniperus* дифференцирована на два слоя: внутренний, эндоэктину, и внешний, эктоэктину. В интине различимы три электронно-плотных слоя (Mohanty et al., 2016). Пыльцевое зерно можжевельника одноклеточное, т.е. представляет собой не проросшую в микрогаметофит микроспору. Ядро окружено плотным кольцом амиллопластов, которое формируется сразу после распада тетрады, когда микроспоры находятся еще внутри микроспорангиев.

Процесс прорастания пыльцы можжевельника по результатам визуальных наблюдений описан в ряде работ (Duhoux, 1982; Surso, 2018). При гидратации пыльцевого зерна вода всасывается между внутренней и наружной интиной, образуя гидрофильную капсулу, которая быстро увеличивается в объеме и под воздействием тургора выходит наружу через функциональную пору вместе с микроспорой, раздвигая экзину на две равные створки и сбрасывая ее с себя. Прорастание микроспоры в микрогаметофит происходит, когда микроспора находится внутри капсулы. Проксимальный кончик растущей пыльцевой трубки проходит сквозь стенку гидрофильной капсулы, не нарушая ее целостности. Генеративное ядро остается в дистальном кончике трубки, погруженном в капсулу, ядро клетки трубки вместе с ассоциированным протопластом постоянно перемещается в сторону растущего кончика, все удаляясь от генеративного ядра. Гидрофильная капсула сохраняется в течение всего времени проращивания пыльцы *in vitro* и в течение всей жизни трубки *in vivo*, включая период зимнего покоя.

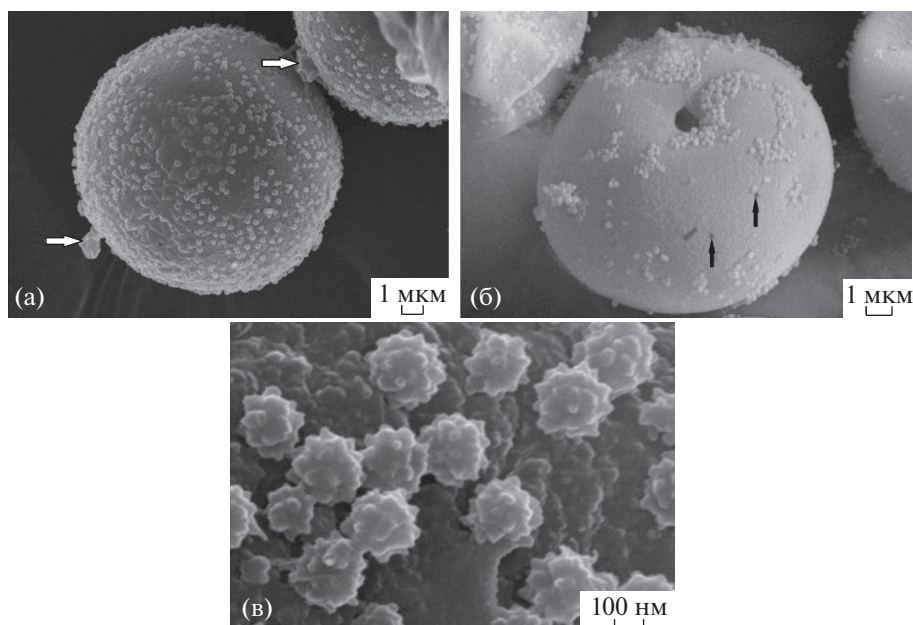


Рис. 1 — Морфология пыльцевых зерен и орбикул можжевельника обыкновенного. а — вид пыльцевого зерна с экватора, видны крышечки, прикрывающие функциональные поры (показаны стрелками), поверхность экзины усеяна многочисленными орбикулами, б — вид гидратированного пыльцевого зерна с полюса, видна открывшаяся функциональная пора и перфорации, образовавшиеся на поверхности экзины в результате отрывания орбикул (показаны стрелками), в — внешний вид орбикул. Взято с сокращениями из: Surso, 2018 (с любезного разрешения Arctic Environmental Research).

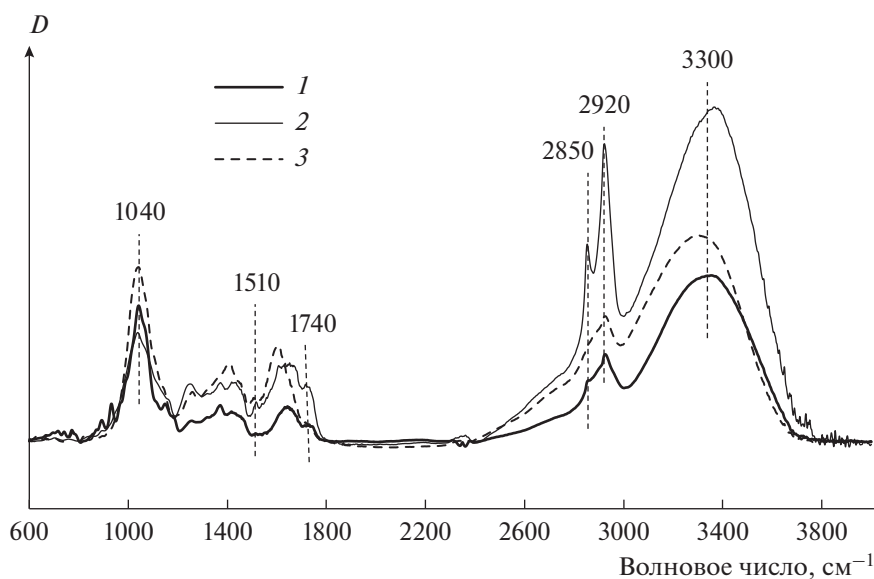


Рис. 2. ИК-спектры пыльцевых трубок (1), пыльцы (2) и орбикул (3) можжевельника.

Результаты ИК Фурье-спектроскопии

ИК-спектры пыльцы, пыльцевых трубок и орбикул имеют схожий вид и характеризуются набором полос поглощения с близкими значениями частот, имеющими разную интенсивность (рис. 2). С целью определения количественных различий

компонентного состава образцов рассчитаны величины относительных оптических плотностей, которые представлены в табл. 2.

В пыльцевых трубках по сравнению с пыльцой наблюдается относительно большее содержание углеводов, характеризующихся величиной K_{1040} , за

Таблица 2. Величины относительной оптической плотности

Образец	Величина относительной оптической плотности				
	1047	1512	1740	2850	2920
Трубки	0.82	0.05	0.09	0.37	0.52
Пыльца	0.33	0.12	0.17	0.59	0.89
Орбикулы	0.85	0.21	0.07	0.46	0.61

счет наличия остаточной сахарозы и вновь синтезированного крахмала, меньшее содержание ароматических веществ (K_{1510}), большее количество соединений с неполярными С–Н связями, таких как липиды, углеводы, белки, РНК, ДНК (K_{2920} и K_{2850}), что свидетельствует о большей гидрофобности пыльцевых трубок. В орбикулах, по сравнению с пылью, отмечено большее содержание углеводов (K_{1040}), меньшее количество соединений, содержащих карбонильные С=О группы: белки, РНК, ДНК, липиды (K_{1740}), меньшее количество соединений с С–Н связями (K_{2920} и K_{2850}), что характеризует их большую гидрофильность. Образец орбикул характеризуется наибольшим содержанием ароматических соединений (K_{1510}), к которым можно отнести ароматические аминокислоты и углеводороды. Наименьшее количество ароматических веществ отмечено в пыльцевых трубках. Кроме того, на ИК-спектрах пыльцы и орбикул присутствует полоса 1600 см^{-1} , соответствующая колебаниям ароматических структур, для пыльцевых трубок интенсивность данной полосы оказалась незначительна, что подтверждает наименьшее содержание в них ароматических соединений. Таким образом, методом ИК-спектроскопии выявлены различия в количественном составе химических соединений в пыльце, пыльцевых трубках и в орбикулах у можжевельника обыкновенного.

Результаты пиролиза. Гормоны роста в пыльцевых трубках можжевельника. О природе орбикул

В пыльцевых трубках можжевельника обнаружено два фитостероида: бета-ситостерин и кампестерин, являющихся стероидными спиртами. Эти стероиды регулируют эластичность и проницаемость мембран, полярный рост клеток, а также инициируют активность мембрано-ассоциированных ферментов, участвуют в гормональном и клеточном сигналинге и связаны с иммунитетом растений к патогенам (Saeidnia et al., 2014; Сулкарнаева, 2016). По своей химической структуре бета-ситостерин аналогичен холестерину, а кампестерин участвует в синтезе brassinosteroidов, являющихся фитогормонами. В пыльце можжевельника и бета-ситостерин, и кампестерин отсутствуют, и появляются только в пыльцевых

трубках, в период их активного роста, поэтому их с большой долей вероятности также можно рассматривать в качестве гормонов роста. Относительное содержание бета-ситостерина в пыльцевых трубках можжевельника составило 0.31%, кампестерина – 0.11%. Добавление в питательную среду стероидных гормонов стимулирует прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок (Ylstra et al., 1995). В пыльце видов р. *Pinus* (*P. sylvestris* L., *P. nigra* Ar.) в небольших количествах были обнаружены стероиды животного происхождения (Janeczko, Skoczowski, 2005). Следует отметить, что в образцах пыльцы, собранной в полевых условиях, даже после очень тщательного просеивания всегда присутствует инвазивный материал беспозвоночных животных и продуктов их жизнедеятельности. Это обстоятельство необходимо учитывать при анализе экспериментальных данных.

В орбикулах пыльцевых зерен у можжевельника выявлено необычно большое (почти 14%) содержание мом-инозитола ($C_7H_{14}O_6$). Этот моносахарид с шестью гидроксильными группами часто содержится во многих лекарственных растениях (Sunita, Manju, 2017; El-Awadi et al., 2018) и обладает выраженными фармакологическими и антисептическими свойствами. В пыльце и трубках мом-инозитол также присутствует, но в гораздо меньших количествах. Следует отметить, что в образцах трубок и, тем более, пыльцы все еще сохраняется значительное количество орбикул, этим, вероятно, и объясняется присутствие мом-инозитола в этих образцах.

В пыльце выявлено большое содержание (6.92%) алифатических углеводов, являющихся продуктами пиролиза жиров и восков, а также каротиноидов, входящих в состав спорополленина. Следует отметить, что в орбикулах такие соединения не обнаружены. Во всех исследованных образцах отмечено наличие лигнина и углеводов. Особенно большое количество углеводов (11.79%) содержится в пыльцевых трубках, что обусловлено, главным образом, синтезом в их протопластах крахмала, а также полисахаридов, входящих в состав оболочек трубок. Продукты пиролиза белков, нуклеиновых кислот и аминокислот обнаружены во всех исследованных образцах. При этом больше всего белков, аминокислот и, возможно, нуклеиновых кислот, содержится в орбикулах (12.89%),

меньше всего — в пыльце (2.45%), в трубках их общее содержание составляет 3.48%.

Появление орбикул на поверхности экзины пыльцевых зерен чаще всего связано с образованием в клетках выступающего слоя микроспорангиев специфичных структур, впервые описанных в 1865 г. Розановым, и вновь открытых в 1927 г. Убишем, названных именем последнего. Гипотетическая схема формирования и транспорта телец Убиша у голосеменных была предложена Г.М. Козубовым (1974). Функциональное значение их все еще во многом остается неясным. Иногда говорится о возможном участии их в синтезе спорополленина и в переносе последнего на поверхность примэкзины. Однако, отсутствие в орбикулах у можжевельника восков, жиров, каротиноидов и высокое содержание в них мом-инозитола свидетельствует, что это, скорее всего, не так.

Происхождение орбикул также не вполне понятно. Высказанное нами ранее предположение о вирусной природе орбикул не подтвердилось. Вероятнее всего, появление предшественников телец Убиша обусловлено синтезом мом-инозитола в цистернах эндоплазматического ретикулума или в вакуолях комплекса Гольджи в клетках тапетума. Тогда, возможно, орбикулы — это всего лишь застывшая масса мом-инозитола своеобразной формы и определенных размеров, “вплавленная” в примэкзину пыльцевого зерна и вмещающая в себя огромное количество белков, аминокислот и ароматических углеводов. Косвенно это подтверждается тем, что при лиофильной сушке образец орбикул многократно увеличивается в объеме, приобретая пенистую структуру. Одним из простых объяснений функционала орбикул может быть участие их в процессе гидратации пыльцевого зерна. У можжевельника обыкновенного образование гидрофильной капсулы при гидратации пыльцевого зерна происходит в течение нескольких секунд за счет быстрого всасывания воды в пространство между внутренней и наружной интиной. Для вскрытия экзины двумя равными створками необходимо, чтобы давление стенки гидрофильной капсулы, образованной наружной интиной, на внутреннюю поверхность экзины, было бы равномерным и достаточным. “Быстрый” осмос наиболее вероятен за счет гликолитического расщепления мом-инозитола в орбикулах, частично внедрившихся в средний слой интины. Таким образом, возможно, орбикулы — это своего рода насосы, способствующие быстрому всасыванию воды через дистальную апертуру (и, возможно, через перфорации) в средний слой интины.

Локализация лизосом и митохондрий в пыльцевых трубках можжевельника

Транспорт везикул и экзоцитоз необходимы для роста и развития пыльцевых трубок, осу-

ществляющих гетеротрофный тип питания (Pettitt, 1985; Camacho, Malho, 2003; Wang et al., 2006). Митохондрии, являющиеся энергетическими центрами, концентрируются внутри клетки там, где возникает необходимость повышенного потребления энергии, перемещаясь, как и везикулы, вдоль микрофиламентов цитоскелета. Изучение локализации и транспорта лизосом и митохондрий внутри тела пыльцевой трубки важно для понимания процессов роста пыльцевых трубок.

В гидратированной пыльце лизосомы локализованы вблизи внутренней поверхности оболочек пыльцевого зерна (рис. 3б).

В пыльцевых трубках везикулы распределены по всему объему гиалоплазмы более или менее равномерно. Однако значительная часть везикул, особенно у активно растущих трубок, скапливается вблизи кончика трубки (рис. 3г). Скопившиеся в гиалоплазме вблизи растущего кончика трубки везикулы своими мембранами внедряются в мембрану кончика трубки, встраивая в нее рецепторные, транспортные белки и липиды, а также высвобождая наружу гидролитические ферменты, сигнальные белки и пептидные гормоны (Battay et al., 1999; Parton et al., 2001; Šamaj et al., 2004). На рис. 3е эти выделения снаружи растущего кончика трубки видны в виде ярко светящихся маленьких шариков. Митохондрии сконцентрированы вокруг обоих ядер и по периферии протопласта (рис. 3з).

Локализация АФК в прорастающей пыльце и в пыльцевых трубках. Существует ли сигнальная связь между ядром клетки трубки и генеративным ядром?

АФК играют важную роль во многих физиолого-биохимических процессах, происходящих в растительных клетках. Однако избыток АФК, обладающих повышенной реакционной способностью, или снижение уровня антиоксидантов могут вызывать окисление биомолекул (липидов клеточных мембран, белков, углеводов, нуклеиновых кислот), приводя к необратимым повреждениям клеток (Gomes et al., 2005). Важное значение АФК в регуляции роста растений подтверждено результатами многих исследований. Однако их роль в репродуктивной деятельности растений во многом остается неясной (Смирнова, 2009; Максимов, 2019).

Зрелое пыльцевое зерно можжевельника находится в дегидратированном состоянии и содержит не более 2–3% свободной влаги. Регидратация приводит к активации метаболизма (Брейгина и др., 2012; Ермаков и др., 2016) и началу процесса, который принято называть “прорастанием пыльцы”. По увеличению или уменьшению концентрации АФК (усилению или ослаблению

флуоресценции) можно проследить последовательность изменений, происходящих в пыльцевом зерне и в пыльцевых трубках.

Наши наблюдения показали, что гидратация пыльцевого зерна можжевельника не является просто осмотической диффузией, а представляет цепь событий, контролируемых, вероятнее всего, белками внешней мембраны ядерной оболочки. У гидратированных пыльцевых зерен до начала образования гидрофильной капсулы при окрашивании DCF-DA относительно слабая флуоресценция наблюдается лишь в оболочке пыльцевого зерна (рис. 4б, внизу слева), ядра почти не флуоресцируют. В момент начала выхода гидрофильной капсулы через функциональную пору наружу происходит яркая флуоресцентная вспышка на поверхности ядра (рис. 4г, вверху). Несколько менее яркая флуоресценция ядер длится до того момента, пока гидрофильная капсула не сбросит экзину. В этот короткий промежуток времени, длящийся несколько секунд, наблюдается также флуоресценция интины, более яркая по периметру дистальной апертуры, в мембране самой апертуры флуоресценции не наблюдается (рис. 4б, вверху). К моменту, когда гидрофильная капсула почти целиком выходит наружу, но микроспора все еще остается внутри экзины, флуоресценция ядер и интины начинает затухать (рис. 4г, внизу). Слабая флуоресценция ядер сохраняется и по завершении процесса гидратации, после сбрасывания экзины (рис. 4б, справа). Следует отметить, что в течение всего процесса гидратации пыльцевого зерна можжевельника ни в гидрофильной капсуле, ни в формирующей ее оболочку наружной интине флуоресценции не наблюдается. Тогда, возможно, через внутреннюю интину в орбиклу осуществляется активный транспорт АТФ и гликолитических ферментов, что вписывается в нашу концепцию функционала орбикул и роли мом-инозитола в процессе гидратации пыльцевого зерна можжевельника. У только что образовавшихся после митоза ядра микроспоры двухклеточных микрогаметофитов флуоресценция обоих ядер и протопласта также сохраняется, очень слабая флуоресценция наблюдается в оболочке проксимального кончика формирующейся трубки и в клеточной перегородке (рис. 4е). По мере роста пыльцевой трубки флуоресценция ядер и протопласта ослабевает (рис. 4з).

Вопрос ядерных взаимосвязей в пыльцевых трубках растений затрагивался не раз (Southworth, 2001). Сложная морфологическая связь между генеративной клеткой и вегетативным ядром в прорастающей пыльце у покрытосеменных впервые была установлена на примере видов *Rhododendron* путем трехмерной реконструкции пыльцевых трубок по ультратонким срезам (Kaul et al., 1987). В пыльцевых трубках голосеменных цитоплазматический тяж между ядрами

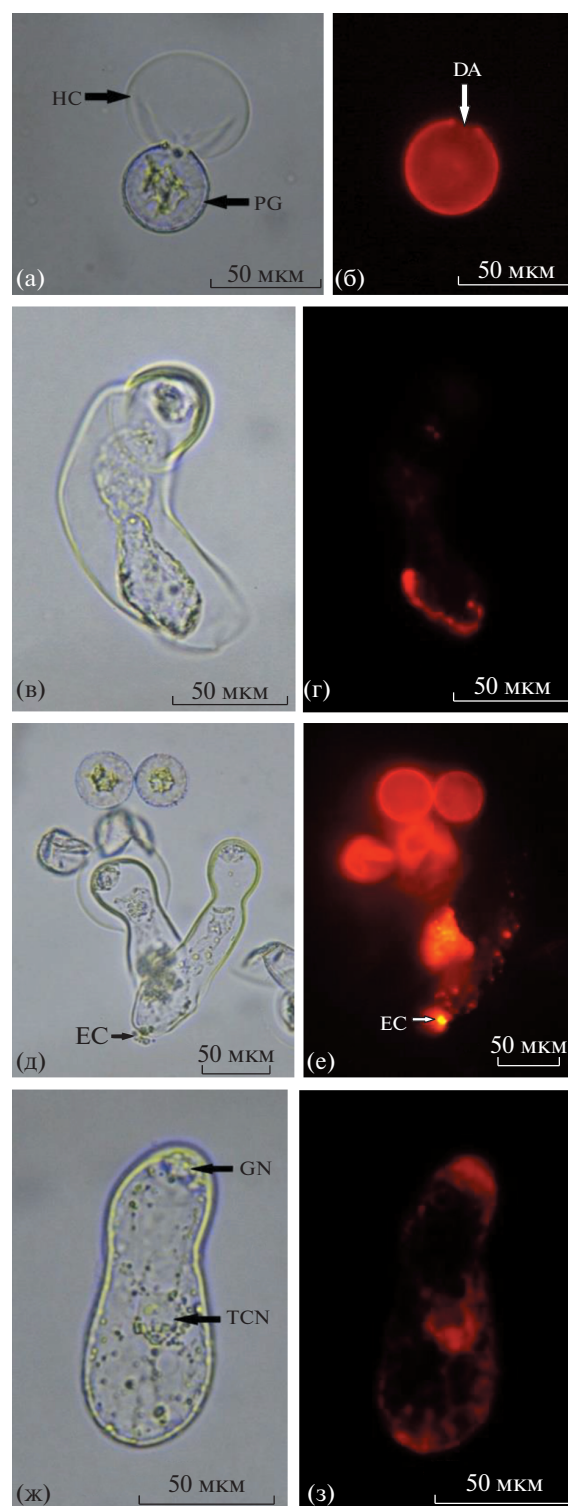


Рис. 3. Локализация лизосом (а–е) и митохондрий (ж, з) в прорастающей пыльце (а, б) и в пыльцевых трубках (в–з) можжевельника (слева – проходящий свет, светлое поле, справа – то же, флуоресценция). а–е – окрашивание лизосомальным окрашивающим реагентом Abcam-Red/Сytopainter, ж, з – митохондриальным окрашивающим реагентом Abcam-Red/Сytopainter. PG – пыльцевое зерно, HC – гидрофильная капсула, DA – дистальная апертура (функциональная пора), TCN – ядро клетки трубки, GN – генеративное ядро, EC – экзоцитоз.

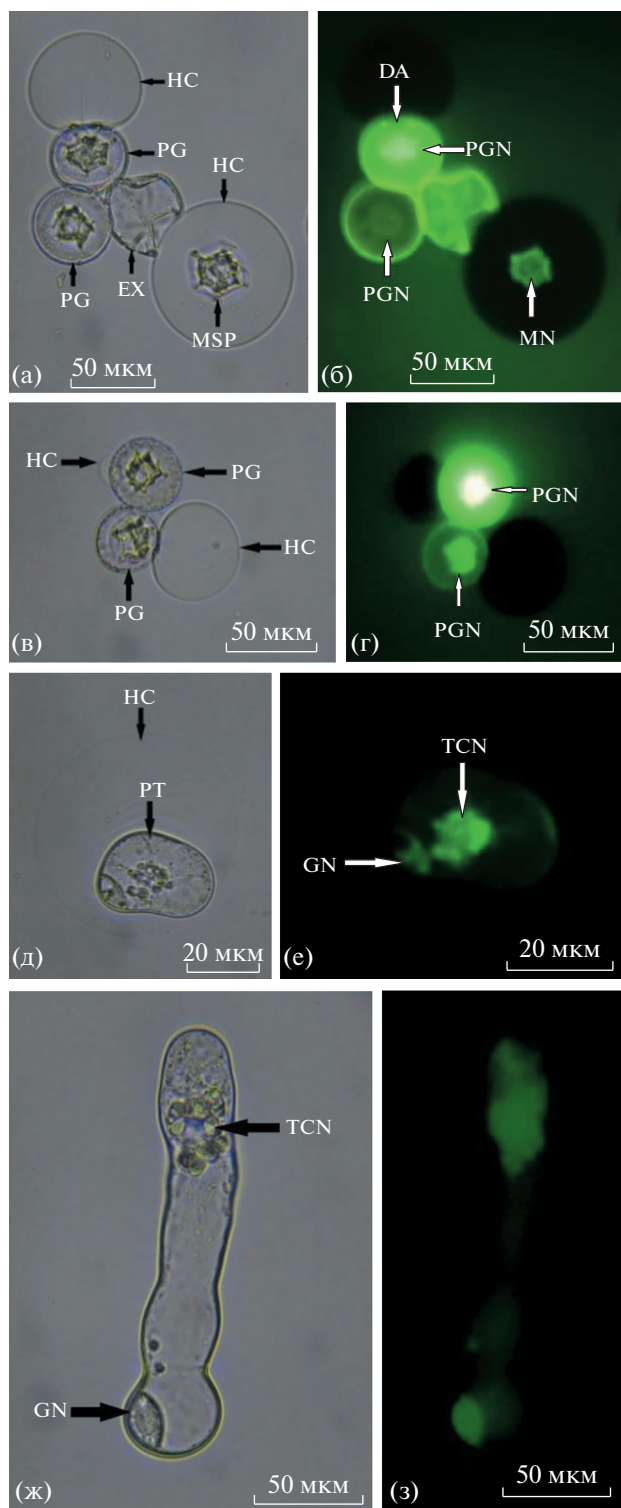


Рис. 4. Выявление АФК в гидратированных пыльцевых зернах и в пыльцевых трубках можжевельника с помощью флуоресцентного красителя DCF-DA (слева — проходящий свет, светлое поле, справа — то же, флуоресценция). а, б — слева внизу — при гидратации пыльцевого зерна образования гидрофильной капсулы не произошло, слева сверху — гидрофильная капсула выходит через функциональную пору, микроспора все еще остается внутри экзины, справа — гидрофильная капсула целиком вышла наружу, раздвинув створки экзины, одноклеточная микроспора в центре гидрофильной капсулы; в — сверху — гидрофильная капсула только что начала выходить из пыльцевого зерна; г — сверху — то же спустя несколько секунд; в, г — внизу — гидрофильная капсула почти полностью вышла наружу, но микроспора все еще остается внутри экзины; д, е — пыльцевая трубка (двухклеточный микрогаметофит) туфелькообразной формы все еще целиком вмещается в гидрофильную капсулу; ж, з — сформировавшаяся пыльцевая трубка: генеративное ядро в дистальном кончике трубки прижимается к одной из ее боковых стенок, ядро клетки трубки с ассоциированным протопластом перемещается ближе к проксимальному кончику растущей трубки. PG — пыльцевое зерно, MSP — микроспора, EX — экзина, HC — гидрофильная капсула, PGN — ядро пыльцевого зерна, MN — ядро микроспоры, DA — дистальная апертура (функциональная пора), PT — пыльцевая трубка, TCN — ядро клетки трубки, GN — генеративное ядро.

пласт ассоциирован с ядром клетки трубки, генеративное ядро лишено собственного протопласта, что характерно для пыльцевых трубок можжевельника в большинстве случаев. При окрашивании пыльцевых трубок DCF-DA проявляется яркая устойчивая флуоресценция АФК в виде узкой неравномерно светящейся на разном протяжении дорожки, тянущейся в теле трубки от ядра к ядру сквозь протопласт и гиалоплазму и заканчивающейся (или начинающейся?) от поверхности одного из ядер. На рис. 5 флуоресценция оболочки слабо выражена только у генеративного ядра. Приведенное изображение не является артефактом или случайным событием, поскольку схожие картины наблюдались и в других трубках.

В последнее время роль АФК в биологических процессах, в том числе редокс-сигналинг, широко обсуждаются. Функции АФК в передаче сигналов внутри растительной клетки трактуются неоднозначно. Неясно, являются ли АФК мессенджерами, индуцирующими новые специфичные сигнальные системы, или регуляторами, управляющими известными сигнальными путями. Потенциальные белки-мишени не обладают специфичностью ни к одной из форм АФК, однако H_2O_2 соответствует ряду критериев вторичных мессенджеров (Праделова и др., 2017). Согласно концепции компартиментализации, “локализация многокомпонентных сигнальных комплексов осуществляется через белковые каркасы, которые позволяют достичь большей специфичности, чем в случае простой диффузии того же

был описан для *Taxus yunnanensis* (Wang et al., 2008). В пыльцевых трубках можжевельника обыкновенного морфологические структуры, которые могли бы связывать оба ядра, не просматриваются.

На рис. 5 показана живая пыльцевая трубка можжевельника, окрашенная DCF-DA. Прото-

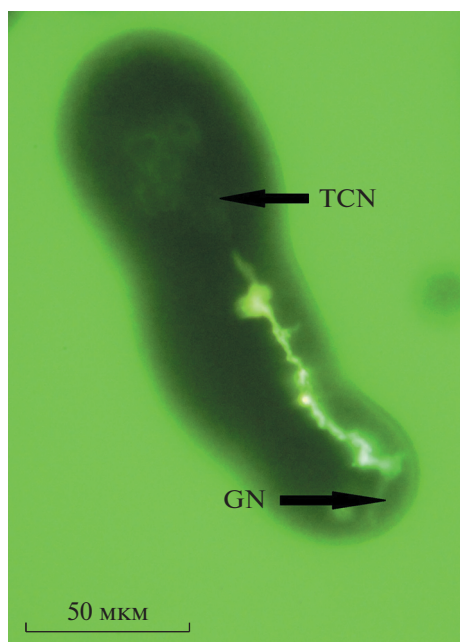


Рис. 5. Характер флуоресценции свидетельствует о возможном существовании канала редокс-сигнальной связи между ядром клетки трубки и генеративным ядром в пыльцевой трубке можжевельника (окрашивание DCF-DA). TCN — ядро клетки трубки, GN — генеративное ядро.

набора участников процесса” (Белоусов и др., 2013). Установлено, что АФК, продуцируемые мембранной НАДФН-оксидазой (NOX), активируют Ca^{2+} -каналы (Foreman et al., 2003; Moonschausen et al., 2007). Считается, что основную роль в функционировании АФК-зависимых сигнальных систем растительной клетки играют редокс-регуляторы, протеинкиназы и протеинфосфатазы, а также факторы транскрипции (Октябрьский, Смирнова, 2007; Креславский и др., 2012) и, возможно, баланс редокс-пар (Билан и др., 2015). Роль актинового цитоскелета в АФК-сигналинге можно, вероятно, с определенными оговорками, рассматривать в качестве фактора компартментализации.

Отсутствие морфологически выраженной связи между ядрами в пыльцевой трубке можжевельника не означает отсутствие между ними связи как таковой. Эта связь жизненно необходима для полноценного функционирования пыльцевой трубки в онтогенезе, когда ядро клетки трубки все более отдаляется (до определенного момента) от ее генеративного ядра. Феномен, показанный на рис. 5, на наш взгляд, свидетельствует о том, что в пыльцевых трубках обыкновенного можжевельника на каких-то этапах их развития между ядром клетки трубки и генеративным ядром нельзя исключить возможного существования редокс-сигнальной связи. Не исключено, что такая связь мо-

жет активироваться белками ядерных мембран. Это косвенно подтверждается тем, что в пыльцевых трубках можжевельника методами MALDI нами обнаружен белок серин/треонин-протеинкиназа, относящийся к семейству фосфатидилинозитол 3-киназ-родственных протеинов киназы, а также ряд белков, принадлежащих к суперсемейству с активностью фосфогидролазы (HD домен-содержащий протеин, металл-зависимая фосфогидролаза), которые функционально способны участвовать в работе АФК-зависимых сигнальных систем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пыльца, орбикулы на поверхности экзины пыльцевых зерен и пыльцевые трубки у можжевельника обыкновенного различаются по химическому составу. В пыльцевых трубках можжевельника обнаружено два фитостероида: бета-ситостерин и кампестерин, стимулирующих прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок. В орбикулах, в отличие от пыльцы, отсутствуют воски, жиры и каротиноиды и содержится большое количество белков, аминокислот и ароматических углеводов. В орбикулах выявлено необычно большое содержание мом-инозитола, играющего, по-видимому, важную роль в процессе гидратации пыльцы. Гидратация пыльцевого зерна можжевельника не является просто осмотической диффузией воды через дистальную аперттуру, а представляет цепь событий, контролируемых, вероятнее всего, белками наружной ядерной мембраны микроспоры. В гидратированной пыльце лизосомы локализованы вблизи внутренней поверхности оболочки пыльцевого зерна. В пыльцевых трубках везикулы распределены по всему объему гиалоплазмы более или менее равномерно. Значительная часть везикул, особенно у активно растущих трубок, скапливается вблизи кончика трубки. Выделение части внутреннего содержимого везикул во внешнюю среду обеспечивается механизмом экзоцитоза. Митохондрии сконцентрированы вокруг обоих ядер и по периферии протопласта. Характер флуоресценции пыльцевых трубок можжевельника, окрашенных DCF-DA, свидетельствует о возможном существовании канала редокс-сигнальной связи между ядром клетки трубки и генеративным ядром.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены с использованием оборудования ЦКП “Арктика” Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-04-00056). Сбор образцов осуществлялся при проведении экспедиционных работ в рамках ФНИР по государственному заданию Федерального исследовательского центра комплексного изучения Арктики Российской академии наук (№ темы — 0409-2019-0039), № гос. регистрации — АААА-А18-118011690221-0.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

С.С. Хвиюзов выполнил FTIR-спектроскопию образцов, обработку спектров и анализ результатов спектроскопии. С.А. Покрышкин выполнил экспериментальную часть пиролиза образцов. Д.Г. Чухчин провел анализ результатов пиролиза. М.В. Сурсо провел светомикроскопические исследования. Все авторы участвовали в обсуждении результатов. Все авторы внесли одинаковый вклад в данное исследование и подготовку статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоусов В.В., Ениколопов Г.Н., Мишина Н.М. Компартиментализация передачи сигналов, опосредованных активными формами кислорода // Биоорганическая химия. 2013. Т. 39. № 4. С. 383–399.
- Билан Д.С., Шохина А.Г., Лукьянов С.А., Белоусов В.В. Основные редокс-пары клетки // Биоорганическая химия. 2015. Т. 41. № 4. С. 385–402.
- Брейгина М.А., Матвеева Н.П., Андреюк Д.С., Ермаков И.П. Трансмембранный перенос K^+ и Cl^- в процессе активации пыльцевого зерна *in vivo* и *in vitro* // Онтогенез. 2012. Т. 43. № 2. С. 103–112.
- Ермаков И.П., Матвеева Н.П., Брейгина М.А. Физиология гаплоидного поколения семенных растений. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2016. 276 с.
- Козубов Г.М. Биология плодоношения хвойных на Севере. Л.: Наука, 1974. 135 с.
- Козубов Г.М., Тренин В.В., Тихова М.А., Кондратьева В.П. Репродуктивные структуры голосеменных (сравнительное описание). Л.: Наука (Ленингр. отд-е), 1982. 104 с.
- Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов В.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 2. С. 163–178.
- Максимов Н.М. Регуляторная роль активных форм кислорода в прорастании мужского гаметофита семенных растений // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2019. 30 с.
- Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций (Обзор) // Биохимия. 2007. Т. 72. Вып. 2. С. 158–174.
- Прадедова Е.В., Нимаева О.Д., Салаяев Р.К. Редокс-процессы в биологических системах // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 6. С. 433–445.
- Смирнова А.В. Роль активных форм кислорода в прорастании пыльцевого зерна. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2009. 27 с.
- Сулкарнаева А.Г. Состав стеринов и активность генов C24-стерин метилтрансферазы *Triticum aestivum* при стрессе. Дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2016. 157 с.
- Batley N.H., James N.C., Greenland A.J., Brownlee C. Exocytosis and endocytosis // The Plant Cell. 1999. № 11. P. 643–660.
- Camacho L., Malho R. Endo/exocytosis in the pollen tube apex is differentially regulated by Ca^{2+} and GTPases // J. Experimental Botany. 2003. № 54. P. 83–92.
- Chichiricco G., Pacini E. Cupressus arizonica pollen wall zonation and *in vitro* hydration // Plant Syst Evol. 2008. № 270. P. 231–242.
- Chichiricco G., Spano L., Torraca G. et al. Hydration, sporoderm breaking and germination of Cupressus arizonica pollen // Plant Biol. 2009. V. 11. № 3. P. 359–368.
- Danti R., Della Rocca G., Calamassi R., Mori B., Mariotti Lippi M. Insights into a hydration regulating system in Cupressus pollen grains // Ann. Bot. 2011. V. 108. P. 299–306.
- Diavanshir K., Fechner G.H. Pollen germination and pollen tube growth of Juniperus from autumn and winter collections // Silvae Genet. 1975. № 24. P. 26–29.
- Duhoux E. Structural growth of the wall of the pollen grain of Juniperus communis (Cupressaceae), growth *in vitro* during the hydration phase // Comptes Rendus Des Seances Hebdomadaires De L'Academie Des Sciences, France, D. 1972a. V. 274. № 20. P. 2767–2770.
- Duhoux E. Formation of the cell wall of the pollen tube during germination of pollen in Juniperus communis growth *in vitro* // Comptes Rendus Des Seances Hebdomadaires De L'Academie Des Sciences, France, D. 1972b. V. 274. № 24. P. 3238–3241.
- Duhoux E. The division of the reproductive cell and the release of its products in the pollen tubes of Juniperus communis and Cupressus arizonica // Revue Generale De Botanique. 1974. V. 81. № 962/963/964. P. 193–204.
- Duhoux E. Mechanism of exine rupture in hydrated taxoid type of pollen // Grana. 1982. V. 21. № 1. P. 1–7.
- El-Awadi M.E., Shalaby M.A.F., Ahmed H.F.S., Abd El-Hamid E.M., Abd El-Azem F.S., Moustafa S.M.A. Phytochemical constituents of methanol and aqueous extracts of Lupinus termis L. seeds using GC-MS // Middle East Journal of Applied Sciences. 2018. V. 8. № 1. P. 272–286.
- Fernando D.D., Lazzaro M.D., Owens J.N. Growth and development of conifer pollen tubes // Sex Plant Repr. 2005. V. 18. № 4. P. 149–162.

- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D.G., Davies J.M., Dolan L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth // *Nature*. 2003. V. 422. P. 442–446.
- Gomes A., Fernandes E., Lima J.L.F.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species // *J. Biochemical and Biophysical Methods*. 2005. V. 65. P. 45–80.
- Kaul V., Theunis C.H., Palser B.F., Knox R.B., Williams E.G. Association of the generative cell and vegetative nucleus in pollen tubes of *Rhododendron* // *Ann. Bot. (USA)*. 1987. V. 59. № 2. P. 227–235.
- Krichevsky A., Kozlovsky S.V., Tian G.-W., Chen M.-H., Zaltsman A., Citovsky V. How pollen tubes grow (Review) // *Developmental Biology*. 2007. V. 303. P. 405–420.
- Kurmman M.H. Pollen morphology and ultrastructure in the Cupressaceae // *Acta. Botanica. Gallica*. 1994. V. 141. P. 141–147.
- Mohanty R.P., Buchheim M.A., Portman R., Levetin E. Molecular and ultrastructural detection of plastids in *Juniperus* (Cupressaceae) pollen // *Phytologia*. 2016. V. 98. № 4. P. 298–310.
- Moonshausen G.B., Bibikova T.N., Messerli M.A., Gilroy S. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 52. P. 20996–21001.
- Janeczko A., Skoczowski A. Mammalian sex hormones in plants // *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2005. V. 43. № 2. P. 71–79.
- Parton R.M., Fisher-Parton S., Watahiki M.K., Trewavas A.J. Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes // *J. Cell Science*. 2001. № 114. P. 2685–2695.
- Pettitt J.M. Pollen tube development and characteristics of the protein emission in conifers // *Ann. Bot.* 1985. V. 56. № 3. P. 379–397.
- Saeidnia S., Manayi A., Gohari A.R., Abdollahi M. The story of beta-sitosterol – A review // *European Journal of Medicinal Plants*. 2014. V. 4. № 5. P. 590–609.
- Šamaj J., Baluška F., Voigt B., Schlicht M., Volkmann D., Menzel D. Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling // *Plant Physiology*. 2004. № 135. P. 1150–1161.
- Southworth D. Pollen exine substructure. III. *Juniperus communis* // *Can. J. Bot.* 1986. V. 64. № 5. P. 983–987.
- Southworth D. Sperm and generative cell (Isolation and manipulation). // *Current Trends in the Embryology of Angiosperms* / Eds. Bhojwani S.S., Soh W.Y. Springer, Dordrecht, 2001. P. 17–32.
- Sunita A., Manju S. Phytochemical examination and GC-MS analysis of methanol and ethyl-acetate extract of root and stem of *Gisekia pharnaceoides* Linn. (Molluginaceae) from thar desert, Rajasthan, India // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2017. V. № 4. P. 168–174.
- Surso M.V. Pollination and pollen germination in common juniper (*Juniperus communis*: Cupressaceae) // *Arctic Environmental Research*. 2018. № 4. P. 162–174.
- Takaso T., Owens J.N. Significance of exine shedding in Cupressaceae-type pollen // *J. Plant Res.* 2008. № 121. P. 83–85.
- Wang B.Y., Su J.R., Fernando D.D. et al. Development of the male reproductive structures in *Taxus yunnanensis* // *Plant Syst. Evol.* 2008. № 276. P. 51–58.
- Wang X.H., Teng Y., Wang Q.L. et al. Imaging of dynamic secretory vesicles in living pollen tubes of *Picea meyeri* using evanescent wave microscopy // *Plant Physiology*. 2006. № 141. P. 1591–1603.
- Ylstra B., Touraev A., Brinkmann A.O., Heberle-Bors E., van Tunen A.J. Steroid hormones stimulate germination and tube growth of *in vitro* matured tobacco pollen // *Plant Physiol.* 1995. V. 107. P. 639–643.

Mechanism of Pollen Germination and Pollen Tubes Growth in Common Juniper (*Juniperus communis* L.) *in vitro*

M. V. Surso^{1,*}, D. G. Chuhchin², S. S. Khviyuzov¹, and S. A. Pokryishkin²

¹Federal Center for Integrated Arctic Research Russian Academy of Science, Severnoi Dviny nab. 23, Arkhangelsk, 163000 Russia

²Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Severnoi Dviny nab. 17, Arkhangelsk, 163000 Russia

*e-mail: surso@fciaarctic.ru

Pollen tubes are a popular object in the study of physiological-biochemical and structural-dynamic processes in plant cells. Most of these studies are devoted to pollen tubes of flowering plants with a short reproductive cycle. Much less attention is paid to the study of pollen tubes of gymnosperms. The article discusses the processes of hydration of pollen grains and the development of pollen tubes in juniper. Mature juniper pollen grain is in a dehydrated state and contains no more than 2–3% of free moisture. Rehydration leads to activation of metabolism, pollen germination and growth of pollen tubes. Hydration of the juniper pollen grain, which leads to the formation of a hydrophilic capsule and exine rupture and shedding, is a sequence of events controlled, most likely, by the proteins of the outer nuclear membrane of the microspore. The orbicules of juniper pollen grains contain an unusually high content of mome-inositol, which is probably necessary for rapid water diffusion into the middle layer of the intine and the formation of a hydrophilic capsule. In pollen tubes of juniper found two phytosterols: beta-sitosterol and campesterol, stimulating the germination of pol-

len and growth of pollen tubes. Vesicles, moving in the hyaloplasm of the pollen tube, accumulate near its tip. Vesicles with their membranes are embedded in the membrane of the tip of the tube, releasing their contents. The highest concentration of mitochondria in growing pollen tubes is observed near both nuclei and along the periphery of the protoplast associated with the tube cell nucleus. In the pollen tubes of common juniper, there is a high probability of the existence of a redox signaling channel between the tube cell nucleus and the generative nucleus. It is possible that this connection can be activated by proteins of the outer membranes of both or one of the nuclei.

Keywords: juniper, pollen, pollen tube, infrared spectroscopy, pyrolysis, steroids, orbicules, mome-inositol, redox signaling

УДК 577.29

МРНК ГЕНОВ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЭКСПРЕССИРУЮТСЯ В ТКАНЯХ ГЛАЗА ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. О. В. Бурменская^а, Р. А. Полтавцева^а, И. Г. Панова^{б, *}

^аФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Опарина, 4, Москва, 117997 Россия

^бФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия
*e-mail: pinag@mail.ru

Поступила в редакцию 19.03.2020 г.

После доработки 28.04.2020 г.

Принята к публикации 30.04.2020 г.

Показана экспрессия мРНК генов Толл-подобных рецепторов (TLRs) 2, 4, 7, 9 в сетчатке, хрусталике и стекловидном теле глаза 13, 17 и 19 недельных плодов человека. Результаты работы могут свидетельствовать о роли этих рецепторов в процессах пролиферации и дифференцировки при нейрогенезе и синаптогенезе сетчатки, в процессах пролиферации и элонгации хрусталиковых волокон, а также в случаях инфицирования о готовности защищать ткани глаза от патогенов.

Ключевые слова: Толл-подобные рецепторы, развитие глаза, сетчатка, хрусталик, стекловидное тело, мРНК, плоды человека

DOI: 10.31857/S0475145020050031

ВВЕДЕНИЕ

Толл-подобные рецепторы (TLRs) — трансмембранные белковые молекулы 1 типа. Они распознают консервативные структуры микроорганизмов (бактерий, вирусов, грибов) и являются сигнальными рецепторами врожденного иммунитета (Хаитов и др., 2009; Kannaki et al., 2010; Akira et al., 2006). TLRs экспрессируются на гемопоэтических клетках, клетках лимфоидного и миелоидного ряда (моноцитах/макрофагах, нейтрофилах, дендритных, тучных клетках, лимфоцитах). Экспрессия TLRs присутствует в эндотелии сосудов, клетках эпителиального и мезенхимального происхождения. В зависимости от типа рецептора они локализуются либо на поверхности, либо в цитоплазме клеток (Brito et al., 2004; Fleer, Krediet, 2007; Iwasaki, Medzhitov, 2010, 2015; Luger et al., 2013; Kulikova et al., 2014; Sriram et al., 2016). Так, рецепторы TLR2, TLR4 располагаются на клеточной мембране и при инфицировании распознают бактериальные лиганды. Такие рецепторы как TLR7 и TLR9 экспрессируются в цитоплазматических органеллах, преимущественно в эндосомах, лизосомах, эндолизосомах и эндоплазматическом ретикулуме. TLR7 распознают собственную и вирусную одноцепочную РНК, а TLR9 является детектором метилированных участков CpG фрагментов ДНК бактериальной природы (Akira et al., 2006; Pandey et al., 2015).

Однако функции TLRs не ограничиваются участием в иммунном ответе организма при попадании инфекционного агента. Показана важная роль TLRs в асептическом воспалении, при травматическом повреждении тканей и процессах репарации (Breen et al., 2012). Появляется все больше сведений, где показана экспрессия TLRs в различных органах и тканях вне инфицирования, как во взрослом организме, так и в процессе его развития. Это подтверждает, что TLRs могут функционировать не только как защитный механизм организма от инфекций (Kannaki et al., 2015), но и участвовать в процессах эмбрионального развития органов и тканей, где им отводится роль регуляторов фундаментальных клеточных процессов, таких как миграция, пролиферация, дифференцировка и апоптоз (Harju et al., 2001; Li et al., 2010; Krysko et al., 2011; Kannaki et al., 2015; Ma et al., 2017).

Рецептор TLR4 является уникальным среди других TLRs тем, что он может вовлекать два сигнальных пути: MyD88 посредством адаптерной молекулы TIRAP и MyD88-независимый путь посредством адаптерной молекулы TRIF, приводящих к активации фактора NF-κB и запуску синтеза провоспалительных цитокинов. Помимо активации воспаления, TLRs также регулируют апоптоз, пролиферацию и выживание клеток, что свидетельствует о свойствах иммунных клеток и их участии в интеграции воспалительных реакций и в

процессах восстановления тканей. В этой связи важными ключевыми сигнальными молекулами TLR являются митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK) (Muzio et al., 1998; Li et al., 2010; Amirchaghmaghi et al., 2013; Ma et al., 2017).

Имеются данные, свидетельствующие о том, что TLRs и их адаптерные белки связаны с различными аспектами нейрогенеза и синаптогенеза в развитии мозга позвоночных и с пластичностью нервных клеток (Rolls et al., 2007; Okun et al., 2011; Kaul et al., 2012; Barak et al., 2014; Kawasaki, Kawai, 2014; Anthoney et al., 2018). В предшествующем исследовании с применением метода иммунохимии нами впервые была показана динамика локализации TLR2 и TLR4 в сетчатке в пренатальном развитии человека, указывающая на то, что эти рецепторы играют важную роль в нормальном развитии сетчатки: нейрогенезе, аксоногенезе и формировании сосудов (Panova et al., 2018).

Сведений об экспрессии генов Толл-подобных рецепторов в тканях глаза человека в период пренатального развития к настоящему времени нами найдено не было. Цель представленной работы — проанализировать экспрессию мРНК генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR7* и *TLR9* в сетчатке, хрусталике и стекловидном теле в процессе нормального развития глаза плодов человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали стекловидное тело, сетчатку и хрусталик от 3-х плодов 13, 17 и 19 нед. гестации. Возраст плодов соответствовал срокам, установленным врачом-акушером. Глазные яблоки, полученные при аутопсии, отделяли от окружающих тканей и отмывали в нескольких сменах физиологического раствора (0.9% NaCl). Затем под бинокулярной лупой МБС-9 вырезали по лимбу роговицу, извлекали стекловидное тело, хрусталик и сетчатку. Сетчатку очищали от пигментного эпителия. Стекловидное тело центрифугировали (erpendorf centrifuge 5417R при 12 500 об./мин и 4°C в течение 30 мин). После центрифугирования надосадочную жидкость удаляли. Осадок стекловидного тела, сетчатку и хрусталик использовали для исследования уровня экспрессии мРНК генов Толл-подобных рецепторов *TLR2*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR9* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (все использованные реактивы и детектирующие амплификаторы производства ООО “ДНК-Технология”, Россия).

Во избежание деградации мРНК взятый материал помещался в пробирки с раствором гуанидинтиоцианата (лизирующий раствор набора “Проба-НК”). Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора “Проба-НК”. Принцип метода основан на лизисе клеток, осаждении РНК изопропанолом в присутствии

соосадителя, последующих отмывках и элюции РНК. В реакции использовали олигонуклеотиды, специфичные в отношении транскриптов генов и не отжигающиеся на матрице геномной ДНК. Поэтому обработка образцов ДНКазой не требовалась. Реакцию обратной транскрипции ставили при температуре 40°C в течение 30 мин, с последующей инактивацией обратной транскриптазы в течение 5 мин при температуре 95°C. В реакции обратной транскрипции использовалась смесь специфических олигонуклеотидов всех исследуемых генов. Амплификация осуществлялась в режиме реального времени с измерением уровня флуоресценции по каналу FAM на каждом цикле при температуре отжига праймеров 64°C. Реализацию “горячего старта” обеспечивали использованием Taq-полимеразы, активность которой блокировали антителами и восстанавливали при прогреве. Реакцию ставили в двух повторах для каждой точки. Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, нормировку уровня экспрессии мРНК исследуемых генов проводили методом сравнения пороговых циклов (метод $\Delta\Delta Cq$) относительно референсных генов *B2M*, *TBP*, *GUSB*, *HPRT1* и образца с минимальным уровнем экспрессии исследуемого гена.

Ввиду ограниченного числа предоставленного материала, статистическую обработку результатов не проводили.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе нами проведен анализ экспрессии мРНК генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR9* в сетчатке, хрусталике и стекловидном теле глаза плодов человека на 13, 17 и 19 нед. пренатального развития. Во всех образцах была обнаружена экспрессия мРНК исследуемых генов. Относительные уровни экспрессии мРНК этих генов графически отражены на рис. 1.

Относительный уровень экспрессии мРНК гена *TLR2* в стекловидном теле на всех сроках исследования практически одинаков и имеет более высокий уровень по сравнению с хрусталиком и сетчаткой. В хрусталике уровень экспрессии мРНК гена *TLR2* ниже, чем в стекловидном теле, но при этом отмечается тенденция увеличения экспрессии этого гена с 13 по 19 нед. В сетчатке уровень экспрессии мРНК гена *TLR2* меньше, чем в стекловидном теле и хрусталиках на всех сроках исследования (рис. 1а).

Уровень экспрессии мРНК гена *TLR4* в стекловидном теле на 13 нед. выше по сравнению с сетчаткой и хрусталиком. На 17 и 19 нед. наблюдается тенденция снижения экспрессии мРНК гена *TLR4* в стекловидном теле. В сетчатке на 17 нед. экспрессия мРНК гена *TLR4* выше, чем на 13 и 19 нед. В хрусталике отмечена тенденция уве-

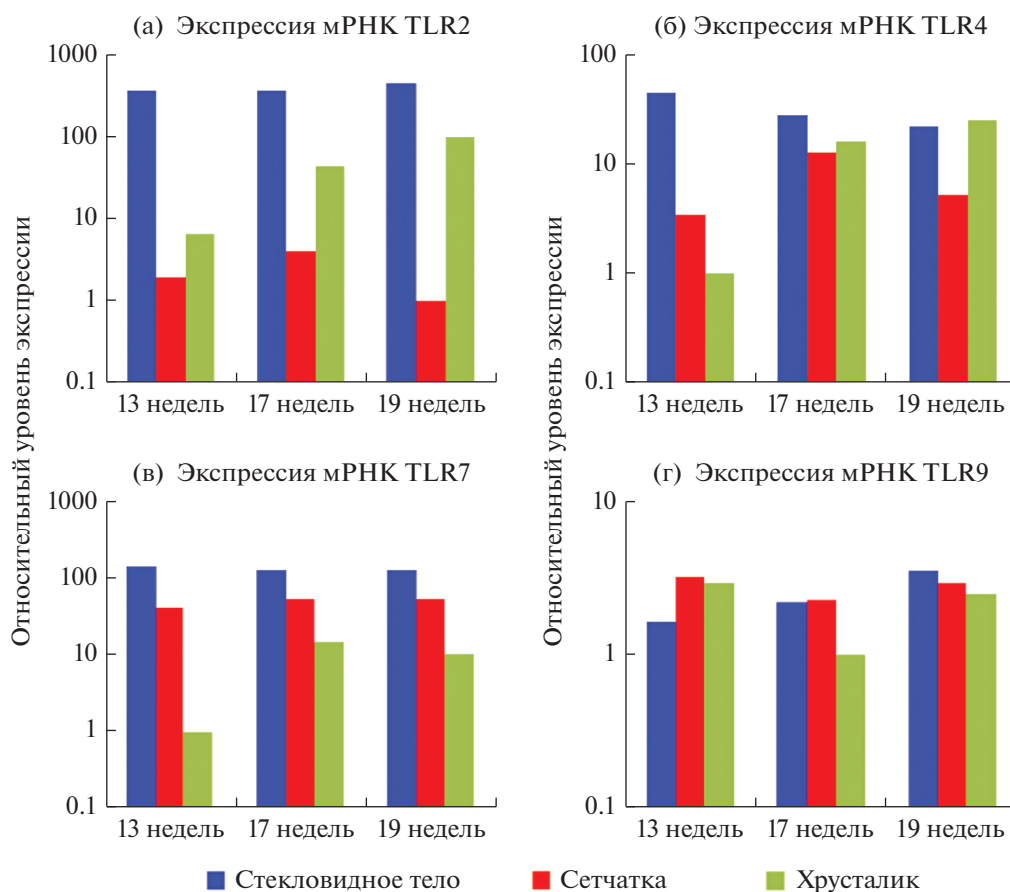


Рис. 1. Относительные уровни экспрессии мРНК генов Толл-подобных рецепторов (TLRs) в тканях глаза в пренатальном развитии человека. (а) – TLR2, (б) – TLR4, (в) – TLR7, (г) – TLR9.

личения экспрессии мРНК гена *TLR4* с возрастом плода (рис. 1б).

Уровень экспрессии мРНК гена *TLR7* в стекловидном теле на всех сроках исследования практически одинаков, но выше по сравнению с хрусталиком и сетчаткой. В сетчатке экспрессия этого гена также примерно одинакова на исследованных стадиях и при этом выше, чем в хрусталике. В хрусталике отмечена тенденция к увеличению экспрессии этого гена на 17 и 19 нед. (рис. 1в).

Уровень экспрессии мРНК гена *TLR9* в стекловидном теле несколько возрастает с 13 по 19 нед. В сетчатке наблюдается незначительное снижение экспрессии мРНК гена *TLR9* на 17 нед. по сравнению с 13 и 19 нед. В хрусталике также отмечается снижение уровня экспрессии этого гена на 17 нед. по сравнению с 13 и 19 нед. (рис. 1г).

Следует отметить, что относительный уровень экспрессии мРНК гена *TLR9* во всех анализируемых тканях значительно ниже, чем экспрессия мРНК генов *TLR2*, *4* и *7*.

В настоящей работе показано, что трансмембранные рецепторы TLR2, TLR4 и внутриклеточные рецепторы TLR7 и TLR9 экспрессируются во

всех исследованных нами тканях глаза плодов человека, способствуя становлению иммунитета, что важно в случае возможного инфицирования глаза (Akira et al., 2006; Kannaki et al., 2010).

Как известно, экспрессия генов этих рецепторов играет важную роль в развитии млекопитающих, регулируя клеточные процессы в развивающихся органах и тканях (Anthoney et al., 2018), включая и глазное яблоко. Ранее методом иммуногистохимии нами была продемонстрирована динамика локализации TLR2 и TLR4 при развитии сетчатки глаза плодов человека (Panova et al., 2018), и это согласуется с экспрессией мРНК этих генов в сетчатке, показанной в настоящей работе. Иммунохимически TLR2, TLR4 также были выявлены в эндотелии сосудов развивающейся сетчатки (Panova et al., 2018).

Хрусталик является производным покровной эктодермы, которая утолщается и дает начало хрусталиковой плакоде. В результате инвагинации хрусталиковой плакоды и смыкания ее краев образуется хрусталиковый пузырек. Клетки передней части хрусталикового пузырька дают начало переднему эпителию хрусталика, а клетки

задней части — волокнам хрусталика, которые формируют ядро и кортикальные слои хрусталика. Рост хрусталика связан с постоянным образованием новых волокон за счет пролиферации мало-дифференцированных клеток эпителия в герминативной зоне. После деления клетки смещаются к экватору, где происходит их удлинение и начало дифференцировки волокон. В процессе образования новых волокон происходит увеличение объема и плотности ядра хрусталика, к которому продолжают добавляться все новые и новые кортикальные слои. Одним из признаков дифференцировки хрусталиковых волокон (помимо синтеза кристаллинов) является постепенное исчезновение в них всех мембрано-окруженных органелл и ядра (незавершенный апоптоз) (Lovicu, McAvoy, 2005; Cvekl, Ashery-Padan, 2014). В процессах пролиферации, дифференцировки и незавершенного апоптоза в хрусталике участвует MAPK сигнальный путь, при этом TLRs являются рецепторами, индуцирующими активацию митоген-активируемых протеинкиназ ERK1 и ERK2 (Li et al., 2003). Показанная в настоящем исследовании экспрессия мРНК генов *TLR 2, 4, 7* в хрусталике, имеющая тенденцию увеличения с возрастом плода, а также экспрессия мРНК гена *TLR9*, указывают на участие этих генов в контроле пролиферации, дифференцировки и незавершенного апоптоза при формировании хрусталиковых волокон.

В эмбриональном развитии в стекловидном теле транзитивно присутствуют гиалоидные сосуды, которые подвергаются регрессии по механизму апоптоза. Помимо гиалоидных сосудов постоянными клетками стекловидного тела являются гиалоциты, которым свойственна функция макрофагов, а также способность синтезировать гиалуроновую кислоту и коллаген II типа (Balazs et al., 1980; Zhu et al., 1999, 2000). Исходя из данных литературы, на сроках проведенного нами исследования гиалоидные сосуды стекловидного тела начинают редуцироваться на 13 неделе, и этот процесс продолжается на стадиях 17 и 19 недель пренатального развития. При этом гиалоциты, присутствующие в стекловидном теле, выполняют роль макрофагов, фагоцитирующих гибнущие клетки (Zhu et al., 1999, 2000). Очевидно, экспрессия мРНК генов *TLRs*, обнаруженная нами в образцах стекловидного тела, связана с экспрессией этих генов в гиалоцитах, эндотелиальных клетках гиалоидных сосудов и с регуляцией апоптоза клеток стенки гиалоидных сосудов. Это согласуется с данными, полученными на мышах, где было показано, что эмбриональные макрофаги экспрессируют Толл-подобные рецепторы 1, 2, 4, 6, 7, 8 и 9 (Balounová et al., 2014).

Исследование функциональной значимости экспрессии Толл-подобных рецепторов является стратегически важным для понимания механизмов, лежащих в основе ряда заболеваний глаза

раннего детского возраста, таких как ретинопатия недоношенных, врожденные катаракта, глаукома, заболевания переднего отрезка глаза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к. б. н., с. н. с. Н.В. Низяевой (ФГБУ “НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова”) за обсуждение результатов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена И.Г. Пановой в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2020 года № 0108-2019-0005.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все протоколы манипуляций с абортивным и аутопсийным материалом человека одобрены комиссией по биоэтике ИБР РАН им. Н.К. Кольцова.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

О.В. Бурменская — проведение ОТ-ПЦР анализа, оформление иллюстративного материала, обсуждение результатов, написание статьи; Р.А. Полтавцева — получение материала при аутопсии, техническая помощь; И.Г. Панова — постановка цели и задачи исследования, подготовка образцов для проведения ОТ-ПЦР анализа, обсуждение результатов, написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Хаитов Р.М., Пащенко М.В., Пинегин Б.В. Роль паттерн-распознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете // Иммунология. 2009. № 1. С. 66–76.
- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity // Cell. 2006. V. 124. P. 783–801.
- Amirchaghmaghi E., Taghavi S.A., Shapouri F. et al. The role of Toll like receptors in pregnancy // Int. J. Fertil. Steril. 2013. V. 7. № 3. P. 147–154.
- Anthoney N., Foldi I., Hidalgo A. Toll and Toll-like receptor signalling in development // Development. 2018. V. 145. dev156018. <https://doi.org/10.1242/dev.156018>
- Balazs E.A., Toth L.Z., Ozanics V. Cytological studies on the developing vitreous as related to the hyaloid vessel system // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1980. V. 213. № 2. P. 71–85.
- Balounová J., Vavrochová T., Benešová M., Ballek O., Kolář M., Filipp D. Toll-like receptors expressed on embryonic macrophages couple inflammatory signals to iron metabolism during early ontogenesis // Eur. J. Immunol. 2014. V. 44.

- P. 1491–1502.
<https://doi.org/10.1002/eji.201344040>
- Barak B., Feldman N., Okun E. Toll-like receptors as developmental tools that regulate neurogenesis during development: an update // *Frontiers in Neuroscience*. 2014. V. 8. Article 272. P. 1–6.
- Breen K., Brown A., Burd I., Chai J., Friedman A., Elovitz M.A. TLR-4-dependent and -independent mechanisms of fetal brain injury in the setting of preterm birth reproductive // *Sciences*. 2012. V. 19. № 8. P. 839–850.
<http://rs.sagepub.com>.
<https://doi.org/10.1177/1933719112438439>
- Brito B.E., Zamora D.O., Bonnah R.A., Pan Y., Planck S.R., Rosenbaum J.T. Toll-like receptor 4 and CD14 expression in human ciliary body and TLR-4 in human iris endothelial cells // *Exp. Eye Res*. 2004. V. 79. P. 203–208.
- Cvekl A., Ashery-Padan R. The cellular and molecular mechanisms of vertebrate lens development // *Development*. 2014. V. 141. P. 4432–4447.
<https://doi.org/10.1242/dev.107953>
- Fleer A., Krediet T.G. Innate immunity: Toll-like receptors and some more // *Neonatology*. 2007. V. 92. P. 145–157.
- Harju K., Glumoff V., Hallman M. Ontogeny of Toll-like receptors *Tlr2* and *Tlr4* in mice // *Pediatr. Res*. 2001. V. 49. P. 81–83.
- Iwasaki A., Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system // *Science*. 2010. V. 327(5963). P. 291–295.
- Iwasaki A., Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system // *Nature Immunology*. 2015. V. 16(4). P. 343–353.
- Kannaki T.R., Reddy M.R., Shanmugam M., et al. Chicken Toll-like receptors and their role in immunity. 2010.
<https://www.researchgate.net/publication/231968721>.
- Kannaki T.R., Reddy M.R., Verma P.C., Shanmugam M. Differential Toll-like receptor (TLR) mRNA expression. Patterns during chicken embryological development // *Anim. Biotechnol*. 2015. V. 26(2). P. 130–135.
<https://doi.org/10.1080/10495398.2014.939658>
- Kaul D., Habbel P., Derkow K. et al. Expression of Toll-Like Receptors in the Developing Brain // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 5. e37767.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037767>
- Kawasaki T., Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways // *Frontiers in Immunology*. 2014. V. 5. Article 461. P. 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- Krysko D.V., Kaczmarek A., Krysko O., Heyndrickx L., Woznicki J., Bogaert P., Cauwels A., Takahashi N., Magez S., Bachert C., Vandenabeele P. TLR-2 and TLR-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation // *Cell Death and Differentiation*. 2011. V. 18(8). P. 1316–1325.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2011.4>. Epub. 2011. Feb. 11.
- Kulikova G.V., Nizyaeva N.V., Nagovitsina M.N., Lyapin V.M., Loginova N.S., Kan N.E., Tyutyunnik V.L., Tyutyunnik N.V., Schegolev A.I. Specific features of TLR4 expression in structural elements of placenta in patients with pre-eclampsia // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2016. V. 160. № 5. P. 718–721.
<https://doi.org/10.1007/s10517-016-3259-8>
- Li D.W., Liu J.P., Wang J., Mao Y.W., Hou L.H. Expression and activity of the signaling molecules for mitogen-activated protein kinase pathways in human, bovine, and rat lenses // *Invest. Ophthalmol. Visual Sci*. 2003. V. 44. P. 5277–5286.
- Li X., Jiang S., Tapping R.I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival // *Cytokine*. 2010. V. 49(1): 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.08.010>
- Lovicu F.J., McAvoy J.W. Growth factor regulation of lens development // *Dev. Biol*. 2005. V. 280. P. 1–14.
- Luger R., Valookaran S., Knapp N. et al. Toll-like receptor 4 engagement drives differentiation of human and murine dendritic cells from a pro- into an anti-inflammatory mode // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. e54879.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054879>
- Ma L., Yang J., Yang L. et al. Developmental expression of Toll-like receptors in the guinea pig lung // *Molecular Medicine Reports*. 2017. V. 15. P. 1243–1251.
- Muzio M., Natoli G., Saccani S. et al. The human Toll signalling pathway: divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) // *J Exp Med*. 1998. V. 187. P. 2097–2101.
- Okun E., Griffioen K.J., Mattson M.P. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease // *Trends Neurosci*. 2011. V. 34. № 5. P. 269–281.
- Pandey S., Kawai T., Akira S. Microbial sensing by toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014. V. 7(1). P. a016246.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016246>
- Panova I.G., Nizyaeva N.V., Sinitsyna V.A., Poltavtseva P.A., Sukhikh G.T. Expression of Toll-like receptors in the early prenatal development of the human retina // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2018. V. 49. № 6. P. 328–332.
- Rolls A., Shechter R., London A., Ziv Y., Ronen A., Levy R., Schwartz M. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis // *Nat. Cell Biol*. 2007. V. 9. P. 1081–1088.
- Sriram G., Natu V.P., Islam I. et al. Innate immune response of human embryonic stem cell-derived fibroblasts and mesenchymal stem cells to periodontopathogens // *Stem Cells International*. Volume. 2016. Article ID 8905365. 15 pages.
<https://doi.org/10.1155/2016/8905365>
- Zhu M., Provis J.M., Penfold P.L. The human hyaloid system: cellular phenotypes and inter-relationships // *Exp. Eye Res*. 1999. V. 68(5). P. 553–563.
- Zhu M., Madigan M.C., van Driel D., Maslim J., Billson F.A., Provis J.M., Penfold P.L. The human hyaloid system: cell death and vascular regression // *Exp. Eye Res*. 2000. V. 70. № 6. P. 767–776.

mRNAs of Genes of Toll-like Receptors Are Expressed in Human Fetal Eye Tissues

O. V. Burmenskaya¹, R. A. Poltavtseva¹, and I. G. Panova^{2, *}

*¹National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia,
ul. Akademika Oparina 4, Moscow, 117997 Russia*

²Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

**e-mail: pinag@mail.ru*

The expression of mRNA genes of Toll-like receptors (TLRs) 2, 4, 7, 9 in the retina, lens and vitreous body of the eye of 13-, 17-, and 19-week fetuses is shown. The results of this work may indicate the role of these receptors in the processes of proliferation and differentiation in neurogenesis and synaptogenesis of the retina, in the processes of proliferation and elongation of the lens fibers, as well as their readiness in cases of infection to protect eye tissues from pathogens.

Keywords: Toll-like receptors, eye development, retina, lens, vitreous body, mRNA, human fetuses

ИНТРАЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ ТРАНСДУКЦИЯ КАЛЬЦИЯ В СПЕРМАТОЗОИДАХ *BOS TAURUS* ПРИ КАПАЦИТАЦИИ И АКРОСОМНОЙ РЕАКЦИИ

© 2020 г. В. Ю. Денисенко^а, Т. И. Кузьмина^{а, *}

^аВсероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ “Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста” (ВНИИГРЖ), Московское шоссе, 55а, Санкт-Петербург, Пушкин, 196601 Россия

*e-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Поступила в редакцию 08.02.2020 г.

После доработки 25.03.2020 г.

Принята к публикации 27.03.2020 г.

Проведен мониторинг показателей интенсивности флуоресценции комплекса мембрана-кальций-хлортетрациклин в сперматозоидах быков в процессах капацитации и акросомной реакции с использованием ингибиторного анализа. Выявлено, что добавление отдельно пролактина, дбцАМФ, ГТФ или ГДФ стимулировало в сперматозоидах освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (ВКД). При совместном действии пролактина и ГТФ, а также дбцАМФ и ГДФ отмечалось дополнительное освобождение Ca^{2+} из ВКД. Предварительная инкубация в присутствии негидролизуемых ГДФ β S или ГТФ γ S ингибировала освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, стимулированное ГТФ или ГДФ, но не оказывала влияние на активированное пролактином или дбцАМФ освобождение Ca^{2+} из ВКД. В то же время при совместном действии пролактина и ГТФ, а также дбцАМФ и ГДФ по-прежнему присутствует дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов, предварительно проинкубированных в присутствии ГДФ β S или ГТФ γ S. Анализ локализации флуоресценции хлортетрациклина в сперматозоидах выявил, что после инкубации сперматозоидов в присутствии дбцАМФ, ГДФ или их совместном воздействии наибольшее количество капацитированных клеток регистрировали при совместном действии этих двух соединений. Инкубация клеток при добавлении пролактина, ГТФ или их совместном действии приводила к увеличению количества акросомных клеток, причем наибольшее количество фиксировали при совместном действии пролактина и ГТФ. Таким образом, допустимо предположить, что мобилизация кальция из внутриклеточных депо детерминирует рост количества капацитированных сперматозоидов быков, эффект наиболее выражен при совместном действии дбцАМФ и ГДФ, и увеличение количества акросомных клеток, максимальное количество которых выявляли при совместном действии пролактина и ГТФ.

Ключевые слова: капацитация, акросомная реакция, кальций, сперматозоиды быков

DOI: 10.31857/S0475145020040035

ВВЕДЕНИЕ

Для контакта сперматозоида с яйцеклеткой и акросомального экзоцитоза, мужские гаметы млекопитающих должны пройти ряд биохимических превращений в женском репродуктивном тракте, т.е. подвергнуться капацитации. Капацитация характеризуется различными мембранными модификациями, приводящими к снижению содержания холестерина (Brouwers et al., 2011). При удалении холестерина снижается текучесть плазматической мембраны сперматозоидов, что приводит к увеличению ее проницаемости для различных ионов (Gadella, Boerke, 2016). В результате изменения про-

ницаемости мембраны изменяются потоки Ca^{2+} и HCO_3^- , что ведет к активации аденилилциклазы и изменению уровня cAMP (Narayana, 2013). Также во время капацитации происходят многочисленные биохимические изменения, в т.ч. увеличение концентраций интрацитоплазматического кальция, цАМФ, внутриклеточного pH и фосфорилирования белков по тирозину (Harrison, Gadella, 2005; Pons-Rejraji et al., 2009).

Регулирование внутриклеточной концентрации Ca^{2+} является одним из важнейших событий, происходящих во время капацитации (Darszon et al., 2005). В опубликованных работах было по-

казано, что капацитация является Ca^{2+} -зависимым процессом (Rodriguez et al., 2012), и кальций действует на различные сигнальные пути в сперме (Lawson et al., 2008). Увеличение pH, концентрации цАМФ и фосфорилирование тирозина не происходит, когда сперматозоиды инкубируют в бескальциевой среде (Battistone et al., 2013). Более того, аденилил циклаза спермы, которая значительно активируется HCO_3^- , также активируется Ca^{2+} (Buffone et al., 2014). Механизмы, участвующие в регуляции Ca^{2+} во время капацитации, изучены недостаточно полно.

Имеются доказательства того, что акросомная реакция сперматозоидов, выражающаяся в виде экзоцитоза при приближении сперматозоида к ооциту, является Ca^{2+} -зависимым процессом (Almadaly et al., 2015). Внеклеточный кальций необходим для акросомной реакции и использование некоторых блокаторов ионных каналов ингибирует этот процесс, указывая на важную роль этих ионов (Pons-Rejraji et al., 2009). В сперматозоидах некоторых видов грызунов, которые инкубировали в бескальциевой среде, акросомная реакция не проходила до тех пор, пока в среду не добавляли кальций (Jimenez-Gonzalez et al., 2006). Хотя точные механизмы, приводящие к увеличению Ca^{2+} в сперматозоидах во время акросомной реакции не известны, имеются данные, что необходимый для экзоцитоза акросомальных везикул Ca^{2+} входит в клетки через потенциалзависимые каналы Т-типа (Florman et al., 2008). Кроме того, показано, что внутриклеточные депо Ca^{2+} также участвуют в инициации акросомной реакции. В отсутствие внеклеточного Ca^{2+} в капацитированных мышинных сперматозоидах акросомная реакция активировалась при действии тапсигаргина, который стимулировал освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Herrick et al., 2005).

Использование флуоресцентных красителей, таких как Quin-2 и Fura-2 (Tsien et al., 1982; Halet, 2016), позволяет измерять концентрацию цитоплазматического Ca^{2+} , однако эти зонды не дают ответ на вопрос об источнике увеличения Ca^{2+} — поступил ли он цитоплазму клетки из внеклеточной среды или из внутриклеточных депо. Концентрация цитоплазматического Ca^{2+} в сперматозоидах быков составляет от 50 до 200 нМ (Vijayaraghavan, Hoskins, 1989), тогда как константа диссоциации комплекса ХТЦ- Ca^{2+} составляет около 400 мкМ, что делает ХТЦ нечувствительным к низким концентрациям Ca^{2+} и не способным к измерениям Ca^{2+} в цитоплазме клеток (Caswell, Hutchinson, 1971). В то же время

способность ХТЦ проникать через мембраны и накапливаться в местах скопления Ca^{2+} в высокой концентрации (внутриклеточные депо Ca^{2+}) делает его использование удобным для изучения уровней Ca^{2+} в местах его высокой концентрации (Cerella et al., 2007).

Зависимость процессов капацитации и акросомной реакции от Ca^{2+} широко представлена в литературе, однако точные механизмы, с помощью которых Ca^{2+} мобилизуется в сперме млекопитающих, еще предстоит полностью установить.

Цель настоящего исследования — идентификация путей трансдукции кальция, мобилизованного из интрацитоплазматических депо сперматозоидов быков, в процессах капацитации и акросомной реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали сперматозоиды от разных быков, полученные непосредственно перед работой. В каждом опыте использовался эякулят спермы от трех быков голштинской породы. Освобождение спермы от семенной плазмы проводили центрифугированием при 300 g в течение 10 мин в среде TALP, содержащей 100 мМ NaCl, 3.1 мМ KCl, 25 мМ NaHCO_3 , 0.3 мМ NaH_2PO_4 , 21.6 мМ лактата натрия, 0.5 мМ CaCl_2 , 0.4 мМ MgCl_2 , 10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата (Sigma, США). Для отмывания спермы к среде TALP добавляли поливинилалкоголь (молекулярной массой 30 000–70 000 Да) (Sigma, США) в концентрации 0.1%. Процедуру отмывания повторяли дважды.

Измерение Ca^{2+} во внутриклеточных депо проводили с помощью флуоресцентного зонда хлор-тетрациклин (ХТЦ) (Sigma, США), обеспечивающего при проведении представленных экспериментов вход ГТФ и ГДФ в сперматозоиды. В случае использования другого зонда для измерения кальция требовалась бы процедура пермеабилзации для обеспечения входа в клетки ГТФ и ГДФ, в то время как ХТЦ способствовал входу в клетки ГТФ и ГДФ без дополнительных процедур (Денисенко, Кузьмина, 2005). Сперматозоиды инкубировали в присутствии ХТЦ в концентрации 100 мкМ в течение 30 мин при температуре 38.5°C, 95% влажности и 5% CO_2 . После окрашивания клетки отмывали с помощью центрифугирования в среде TALP при 300 g в течение 10 мин. Процедуру повторяли три раза. Измерение интенсивности флуоресценции ХТЦ проводили на спектрофлуориметре (Hitachi, Япония) в среде TALP без добавления CaCl_2 . Величина длин волн возбуждения и излучения для

ХТЦ равнялась 380 и 530 нм, соответственно. Содержание в сперматозоидах кальция внутриклеточных депо измеряли в условных единицах (усл. ед.) интенсивности флуоресценции комплекса Ca^{2+} -ХТЦ. Концентрация сперматозоидов при измерении составляла 1.5×10^6 клеток/мл.

С целью активации процессов капацитации сперматозоиды быков инкубировали 4 ч при 38.5°C, 95% влажности и 5% CO_2 . Для капацитации использовали среду Sp-TALP, в которую добавляли 6 мг/мл BSA и 0.5 мМ CaCl_2 . Активацию акросомной реакции проводили с помощью лизофосфатидилхолина (Sigma, США) в концентрации 100 мкМ, который добавляли к предварительно капацитированным сперматозоидам (Parrish, 2014). Продолжительность акросомной реакции составляла 30 мин в условиях, аналогичных используемым для капацитации.

После прохождения капацитации или акросомной реакции из каждого экспериментального образца брали по 20 мкл суспензии сперматозоидов и 20 мкл раствора ХТЦ, смешивали и инкубировали при 38.5°C в течение 10 мин. Раствор ХТЦ (750 мкМ) готовили в буфере, который содержит 130 мМ NaCl, 5 мМ L-цистеина (Sigma, США) и 20 мМ Трис (pH 7.8) (Sigma, США). Раствор готовили ежедневно и хранили в темноте при 4°C. Затем в эту смесь для фиксации добавляли 10 мкл 25% глутаральдегида (Sigma, США) в 1 мМ Трисе (pH 7.4) до конечной концентрации 0.1%. В данной концентрации глутаральдегид обеспечивает стабильную флуоресценцию в течение 2 ч и не оказывает побочных эффектов на клетки (Ward, Storey, 1984). После этого при комнатной температуре каплю суспензии сперматозоидов (10 мкл) размещают на предметном стекле и смешивают с 10 мкл 0.22 М 1,4-дiazобисцикло [2.2.2]-октана (Sigma, США), растворенного в глицерол/PBS (9 : 1, v/v), для снижения выцветания флуоресценции. Образцы накрывают покровным стеклом и хранят в темноте при 4°C.

Оценку сперматозоидов проводили с использованием микроскопа ZEISS AxioLab. A1. (Zeiss, Германия) с фазовым контрастом и эпифлуоресцентной оптикой (возбуждение при 400–440 нм и излучение при 470 нм). Каждую из 200 клеток оценивали в соответствии с одним из трех типов флуоресценции ХТЦ (Fraser et al., 1995): равномерная флуоресценция во всей головке (некапацитированные клетки, образец F), свободная от флуоресценции полоса в постакросомальном районе (капацитированные клетки, образец B), и низкая флуоресценция во всей головке, за исключением тонкой яркой полосы флуоресценции в

экваториальном сегменте (акросома-реактивные клетки, образец AR).

В работе использовали следующие реактивы: инкубационную среду TALP, ГДФβS, ГТФγS, ГТФ, ГДФ, дбцАМФ, пролактин, хлортетрациклин, ЭГТА (Sigma, США).

Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4–5 независимых экспериментов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Обработку данных проводили с помощью пакета статистической программы SigmaStat.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты экспериментов, отражающие воздействие ГДФβS и ГТФγS на стимулированное дбцАМФ и ГДФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков представлены на рис. 1. В экспериментах использовали ГДФβS и ГТФγS в концентрациях 100 мкМ. Добавление дбцАМФ в концентрации 100 мкМ или ГДФ в концентрации 50 мкМ оказывало активирующий эффект на выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов. Совместное действие дбцАМФ и ГДФ приводило к дополнительному освобождению Ca^{2+} из депо. Предварительная инкубация сперматозоидов в присутствии ГДФβS ингибировала освобождение Ca^{2+} из депо, стимулированное добавлением ГДФ. Однако, на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, активированное действием дбцАМФ, или дополнительный выход Ca^{2+} из депо, стимулированный совместным действием дбцАМФ и ГДФ, обработка клеток ГДФβS влияния не оказывала. Внесение в среду инкубации сперматозоидов ГТФγS приводило к ингибированию освобождения Ca^{2+} из депо, вызванного добавлением ГДФ. В то же время освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, стимулированное добавлением одного дбцАМФ, или совместным действием дбцАМФ и ГДФ, по-прежнему отмечалось даже в присутствии ГТФγS.

На рис. 2 представлены данные о влиянии ГДФβS и ГТФγS на стимулированное пролактином и ГТФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков. Выявлено, что добавление пролактина в концентрации 10 нг/мл или ГТФ в концентрации 10 мкМ активировало в клетках освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. При совместном действии пролактина и ГТФ в сперматозоидах отмечали дополнительный выход Ca^{2+} из депо. Инкубация сперматозоидов в присутствии ГДФβS в концентрации 100 мкМ оказывала ингибирующее влияние на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при последующем

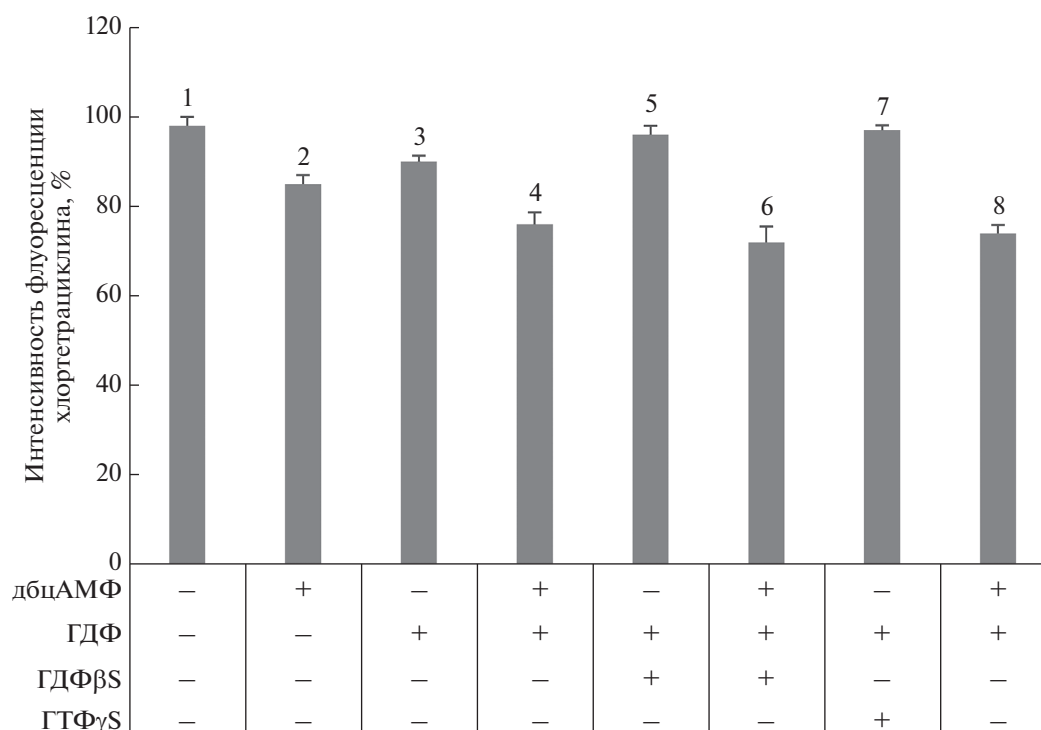


Рис. 1. Влияние ГДФβS и ГДФγS на стимулированное dbcAMP и ГДФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков. Концентрации ГДФβS и ГДФγS – 100 мкМ, dbcAMP – 100 мкМ, ГДФ – 50 мкМ. По вертикали: интенсивность флуоресценции ХТЦ, %. Различия достоверны: $P < 0.001$ (1 и 2; 2 и 8; 3 и 4; 3 и 5; 3 и 6; 3 и 7; 3 и 8; 5 и 6; 7 и 8), $P < 0.01$ (1 и 3; 2 и 4; 2 и 6).

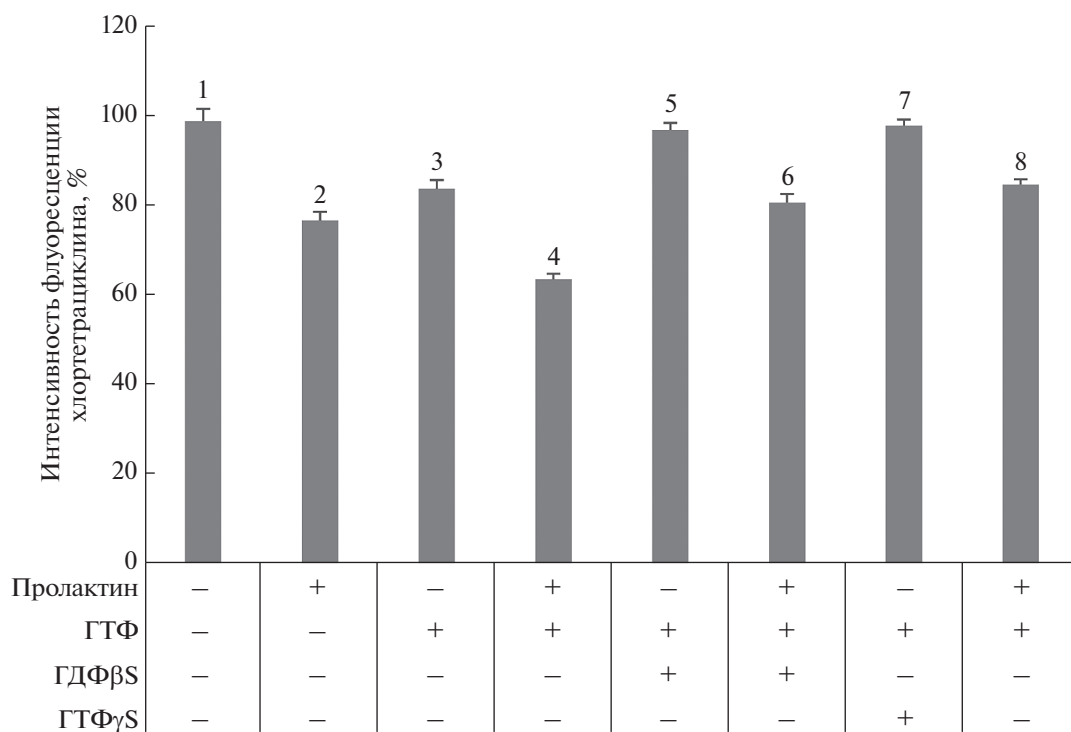


Рис. 2. Влияние ГДФβS и ГДФγS на стимулированное пролактином и ГДФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков. Концентрации ГДФβS и ГДФγS – 100 мкМ, пролактина – 10 нг/мл, ГДФ – 10 мкМ. По вертикали: интенсивность флуоресценции ХТЦ, %. Различия достоверны: $P < 0.001$ (1 и 3; 1 и 2; 2 и 4; 3 и 4; 3 и 5; 3 и 7).

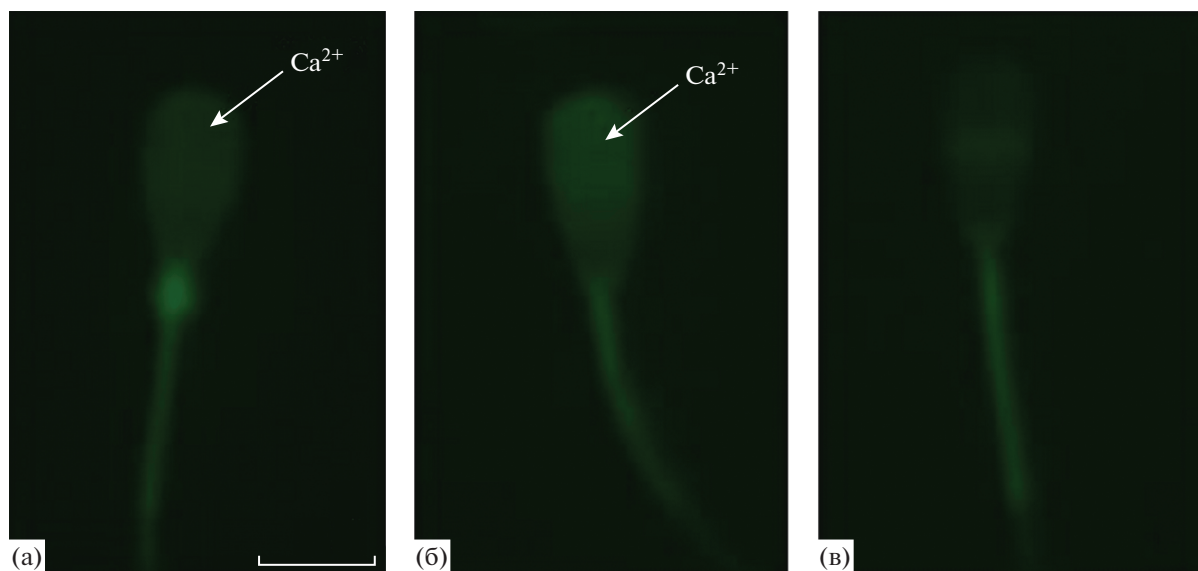


Рис. 3. Репрезентативные изображения образцов окрашивания сперматозоидов быков ХТЦ после инкубации в течение 4 ч в среде Sp-TALP и 6 мг/мл BSA: (а) образец F — некапацированные клетки, (б) — капацированные клетки, (в) AR — акросома-реактивные клетки; Ca^{2+} — внутриклеточные депо кальция. Концентрация ХТЦ — 750 мкМ, для оценки использовали не менее 200 клеток. Длина волн возбуждения 400 нм, эмиссии — 470 нм. Стрелками указана локализация флуоресценции зонда отражающая изменения концентрации Ca^{2+} . Объектив $\times 40$. Размер масштабной линейки соответствует 7 мкм.

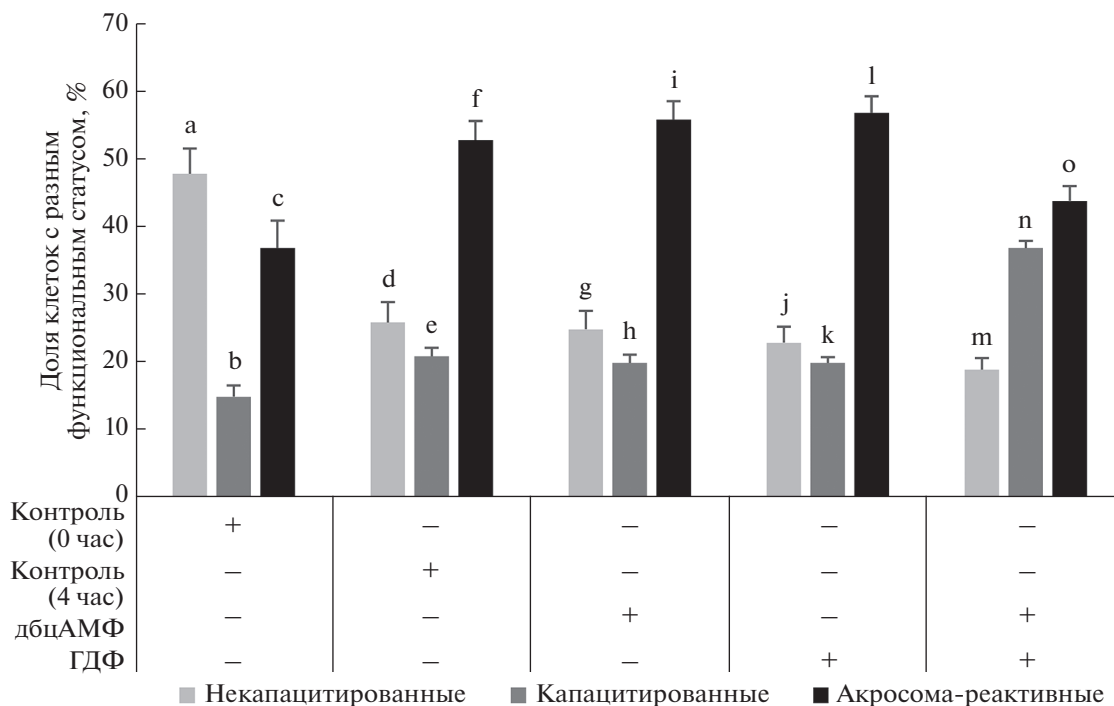


Рис. 4. Влияние дбцАМФ и ГДФ на капацитацию сперматозоидов быков. Концентрации дбцАМФ и ГДФ составляли 100 и 50 мкМ. По вертикали: доля клеток с разным функциональным статусом, %. Различия достоверны при $P < 0.001$ (а и d; а и g; а и j; а и m; о и i; о и l; о и k; н и h; н и e).

добавлении ГТФ. В то же время на действие одного пролактина или на совместное действие пролактина и ГТФ предварительная обработка клеток

ГДФβS не оказывала воздействия. В присутствии ГДФβS пролактин по-прежнему стимулировал выход Ca^{2+} из депо, а совместное действие пролактина

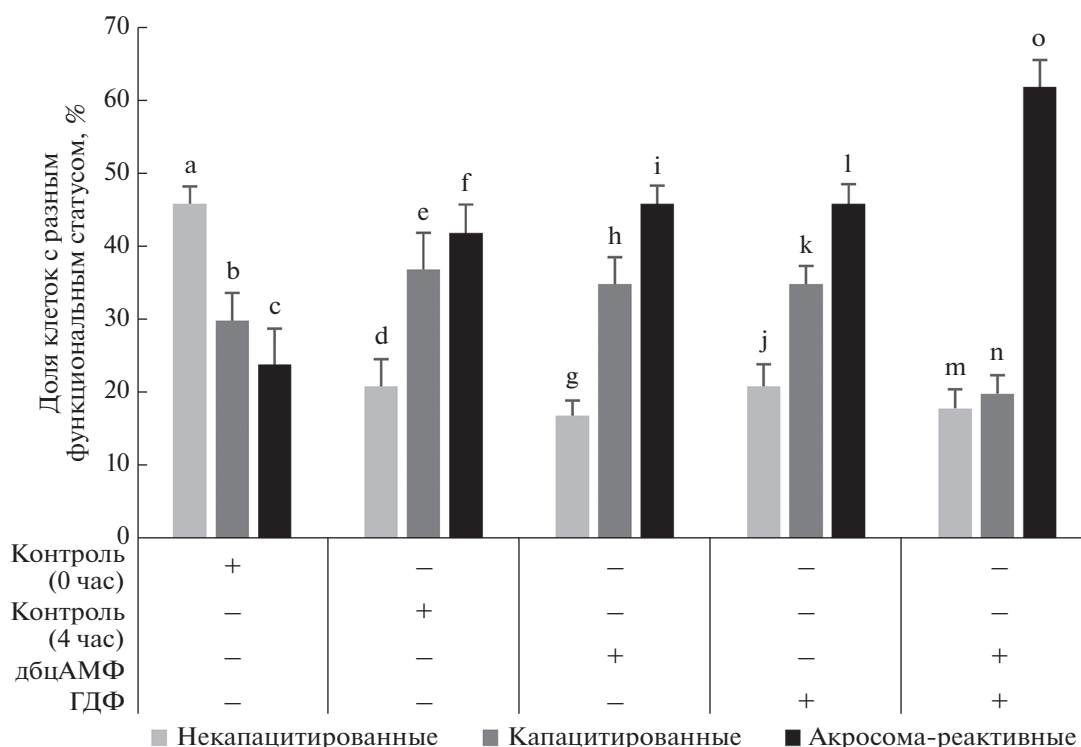


Рис. 5. Влияние пролактина и ГТФ на акросомную реакцию сперматозоидов быков. Концентрации пролактина и ГТФ составляли 10 нг/мл и 10 мкМ. По вертикали: доля клеток с разным функциональным статусом, %. Различия достоверны при $P < 0.001$ (a и d; a и g; a и j; a и m; n и k; n и h), $P < 0.01$ (o и l; o и i).

и ГТФ активировало дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Предварительная инкубация сперматозоидов в присутствии ГТФγS приводила к ингибированию освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо, вызванного добавлением ГТФ. Использование для активации клеток одного пролактина, или совместное действие пролактина и ГТФ, стимулировали освобождение Ca^{2+} из депо при действии одного реагента, или дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при действии двух соединений даже в присутствии ГТФγS.

При анализе сперматозоидов, ранжированных в соответствии с их функциональным статусом (контрольные, капацитированные и акросома-реактивные клетки, рис. 3) использовали среду TALP с добавлением кальция в концентрации 0.5 мМ. На рис. 4 представлены данные о влиянии дбцАМФ и ГДФ на капацитацию сперматозоидов быков. После 4 ч инкубации в контрольных клетках в сравнении с контролем (0 ч инкубации) обнаружено снижение количества контрольных клеток (образец F) и увеличение числа акросомных клеток (образец AR). Совместное (в течение 4 ч) действие дбцАМФ и ГДФ вызывает значительное увеличение процентного содержания капацити-

рованных клеток (образец B), эффект отсутствовал при воздействии каждого из этих соединений в отдельности.

На рис. 5 представлены данные, отражающие эффекты пролактина и ГТФ на акросомную реакцию сперматозоидов. Инкубация контрольных клеток (4 ч) приводит к снижению количества контрольных клеток (образец F) и росту числа акросомных клеток (образец AR) в сравнении с клетками на 0 ч инкубации. После 4 ч инкубации сперматозоидов в присутствии пролактина и ГТФ отмечали значительное увеличение количества акросомных клеток (образец AR) и снижение числа капацитированных клеток (образец B), в сравнении с действием отдельно каждого из этих соединений.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа данных, полученных в экспериментах, обнаружено, что добавление ГТФ или ГДФ к сперматозоидам быков стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Ранее на клетках N1E-115 нейрональной клеточной линии было показано, что ГДФ стимулирует освобождение Ca^{2+} из внутриклеточного депо с задержкой

во времени, которая составляла примерно 90 с (Ueda et al., 1986). Фактически самостоятельно ГДФ не стимулирует освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо; ГДФ βS , который не фосфорилируется до ГТФ βS с помощью нуклеозиддифосфокиназы, не активирует освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Gill et al., 1988). Логично предположить, что эффект этого нуклеотида на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо может быть обусловлен его превращением в ГТФ через катализируемую реакцию фосфорилирования, стимулируемую в присутствии АТФ. Этот процесс превращения ГДФ в ГТФ опосредуется ферментом нуклеозиддифосфокиназа (Ueda et al., 1986). ГДФ βS и ГТФ γS являются соединениями, которые не подвергаются реакции гидролиза. Отсутствие влияния ГТФ γS на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо и его ингибирующее действие на стимулированное ГТФ освобождение Ca^{2+} из депо свидетельствуют о том, что для активации освобождения Ca^{2+} необходим гидролиз ГТФ.

Таким образом, в сперматозоидах быков добавленные отдельно ГТФ и ГДФ стимулируют выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо, причем для реализации воздействия ГТФ необходим его гидролиз, в то время как эффект ГДФ предположительно связан с переходом его в ГТФ и последующим гидролизом.

Если добавленные отдельно ГТФ или ГДФ не стимулируют освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо в присутствии ГДФ βS или ГТФ γS , то при совместном действии пролактина и ГТФ, а также дбцАМФ и ГДФ в сперматозоидах быков по-прежнему отмечается дополнительное освобождение Ca^{2+} из депо в присутствии ГДФ βS и ГТФ γS . Это позволяет предположить, что механизм действия на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при воздействии одного ГТФ или ГДФ, и при участии этих нуклеотидов в совместном действии в присутствии пролактина или дбцАМФ, различен.

В большинстве клеток млекопитающих показано наличие двух типов внутриклеточных депо кальция — инозитолтрифосфат- и рианодин-чувствительных внутриклеточных депо (Berridge, 2002). Согласно гипотезе, выдвинутой Mullaney et al. и Ghosh с соавторами, ГТФ способствует образованию связи между различными внутриклеточными депо кальция (IP_3 -чувствительными и IP_3 -нечувствительными) и обеспечивает переход Ca^{2+} из IP_3 -нечувствительных в IP_3 -чувствительные внутриклеточные депо. Совместное действие

IP_3 и ГТФ способствует дополнительному освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Mullaney et al., 1987; Ghosh et al., 1989). В сперматозоидах млекопитающих присутствуют не менее двух различных органелл для хранения кальция, расположенных в акросомной части и области шейки (Costello et al., 2009). Для образования связи между различными внутриклеточными депо кальция необходимо, чтобы взаимодействующие соединения активировали освобождение Ca^{2+} из различных внутриклеточных депо и одним из соединений должны быть ГТФ или ГДФ. Ранее на сперматозоидах быков нами было показано, что пролактин и ГДФ стимулируют выход Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных депо, а дбцАМФ (теофиллин) и ГТФ — из рианодин-чувствительных внутриклеточных депо кальция (Денисенко и др., 2015). Так как в сперматозоидах быков при совместном действии пролактина и ГТФ, а также дбцАМФ и ГДФ, присутствует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, можно предположить, что в данном случае действие ГТФ и ГДФ направлено на образование связи и обеспечение перехода Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо.

Таким образом, из анализа результатов, полученных в наших экспериментах, следует, что, действуя отдельно, ГТФ или ГДФ стимулируют выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо, при совместном действии пролактина и ГТФ, а также дбцАМФ и ГДФ действие нуклеотидов, вероятно, направлено на образование связи и перемещение Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо.

После завершения капацитации сперматозоиды приобретают способность подвергаться акросомной реакции, при которой происходит экзоцитоз акросомных пузырьков. Связывание сперматозоида с одним из гликопротеинов зоны пеллюцида ооцита стимулировало вход Ca^{2+} и акросомную реакцию в сперматозоидах млекопитающих (Abou-Naila et al., 2014). Сперматозоиды человека обладают внутриклеточными депо Ca^{2+} и освобождение Ca^{2+} из этих депо, стимулированное тапсигаргином, активирует вход Ca^{2+} из внешней среды, который регулирует важные биологические процессы, являющиеся фундаментальными для акросомной реакции (Sosa et al., 2016; Engel et al., 2018). В сперматозоидах быков увеличение количества клеток на стадии акросомной реакции происходило при одновременном использовании для активации сперматозоидов пролактина и ГТФ. В этом случае действие ГТФ направлено на образование связи и обеспечение перехода Ca^{2+} между

различными (IP₃- и рианодинчувствительными) внутриклеточными депо.

В процессах капацитации участвует как внутриклеточный, так и внеклеточный кальций. Инкубация сперматозоидов свиней в бескальциевой среде приводила к ингибированию капацитации, что свидетельствует о необходимости внеклеточного Ca²⁺ для активации процессов капацитации (Martinez-Abad et al., 2017). Также было обнаружено увеличение концентрации внутриклеточного кальция во время прохождения этого процесса (Lopez-Torres et al., 2017). В сперматозоидах быков рост числа клеток на стадии капацитации наблюдали в случае совместного использования дбцАМФ и ГДФ. Вероятно, в данном случае действие ГДФ, также как и ГТФ, направлено на образование связи между различными внутриклеточными депо кальция.

На основании результатов экспериментов предлагается гипотеза, согласно которой капацитация и акросомная реакция в сперматозоидах быков происходит вследствие перемещения Ca²⁺ между различными внутриклеточными депо при воздействии дбцАМФ, пролактина, ГТФ и ГДФ, причем стимулированное совместным действием дбцАМФ и ГДФ перемещение кальция приводит к увеличению количества капацитированных клеток, тогда как рост числа сперматозоидов на стадии акросомной реакции отмечали при воздействии на мужские гаметы пролактина и ГТФ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки (Госзадание № АААА-А18-118021590132-9).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы В.Ю. Денисенко и Т.И. Кузьмина внесли одинаковый вклад в данное исследование и подготовку статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Эффект гуаниновых нуклеотидов и протеинкиназы С на стимулированное пролактином освобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо ооцитов свиней. Онтогенез. 2005. Т. 36. № 3. С. 1–6. (Denisenko V.Yu., Kuzmina T.I. Effects of guanine nucleotides and protein kinase C on prolactin-stimulated release of Ca²⁺ from intracellular stores of pig oocytes // Rus. J. Devel. Biol. 2005. V. 36. № 3. P. 161–165.)
- Денисенко В.Ю., Бойцева Е.Н., Кузьмина Т.И. Освобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо сперматозоидов *Bos Taurus* в зависимости от их функционального состояния // Цитология. 2015. Т. 57. № 3. С. 233–239.
- Abou-Haila A., Bendahmane M., Tulsiani D.R. Significance of egg's zona pellucida glycoproteins in sperm-egg interaction and fertilization // Minerva. Ginecol. 2014. V. 66. № 4. P. 409–419.
- Almadaly E., Hoshino Y., Ueta T. et al. Desalted and lyophilized bovine seminal plasma delays induction of the reaction in frozen-thawed bovine spermatozoa in response to calcium ionophore // Theriogen. 2015. V. 83. № 2. P. 175–185.
- Battistone M.A., Da Ros V.G., Salicioni A.M. et al. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases // Mol. Hum. Reprod. 2013. V. 19. № 9. P. 570–580.
- Berridge M.J. The negative feedback by protein kinase C // J. Biol. Chem. 2002. V. 268. P. 8425–8428.
- Brouwers J.F., Boerke A., Silva P.F. et al. Mass spectrometric detection of cholesterol oxidation in bovine sperm // Biol. Reprod. 2011. V. 85. № 1. P. 128–136.
- Buffone M.G., Wertheimer E.V., Visconti P.E. et al. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1842. № 12. P. 2610–2620.
- Caswell A.H., Hutchinson J.D. Selectivity of cation chelation to tetracyclines: Evidence for special conformation of calcium chelate // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1971. V. 43. № 3. P. 625–630.
- Cerella C., Mearelli C., DeNicola M., Dalessio M., Magrini A., bergamaschi A., Ghibelli L. Analysis of calcium changes in endoplasmic reticulum during apoptosis by the fluorescent indicator chlortetracycline // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007. V. 1099. P. 490–493.
- Costello S., Michelangeli F., Nash K. et al. Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions // Reprod. 2009. V. 138. № 3. P. 425–437.
- Darszon A., Nishigaki T., Wood C. et al. Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology // Int. Rev. Cytol. 2005. V. 243. P. 79–172.
- Engel K.M., Springsguth C.H., Grunewald S. What happens to the unsuccessful spermatozoa // Androl. 2018. V. 6. № 2. P. 1–10.

- Florman H.M., Jungnickel M.K., Sutton K.A. Regulating the acrosome reaction // *Int. J. Dev. Biol.* 2008. V. 52. № 5–6. P. 503–510.
- Fraser L.R., Abeydeera L.R., Niwa K. Ca^{2+} -regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis // *Mol. Reprod. Dev.* 1995. V. 40. № 2. P. 233–241.
- Gadella B.M., Boerke A. An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization // *Theriogen.* 2016. V. 85. № 1. P. 113–124.
- Ghosh T.K., Mullaney J.M., Tarazy F.I. *et al.* GTP-activated communication between distinct inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and -insensitive calcium pools // *Nature.* 1989. V. 340. P. 236–239.
- Gill D.L., Mullaney J.M., Ghosh T.K. Intracellular calcium translocation: mechanism of activation by guanine nucleotides and inositol phosphates // *J. Exp. Biol.* 1988. V. 139. P. 105–133.
- Halet G. Monitoring calcium oscillations in fertilized mouse eggs // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1457. P. 231–240.
- Harayama H. Roles of intracellular cyclic AMP signal transduction in the capacitation and subsequent hyperactivation of mouse and boar spermatozoa // *J. Reprod. Dev.* 2013. V. 59. № 5. P. 421–430.
- Harrison R.A.P., Gadella B.M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation // *Theriogen.* 2005. V. 63. № 2. P. 342–351.
- Herrick S.B., Schweissinger D.L., Kim S.W. *et al.* The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store // *J. Cell. Physiol.* 2005. V. 202. № 3. P. 663–671.
- Jimenez-Gonzalez C., Michelangeli F., Harper C.V. *et al.* Calcium signaling in human spermatozoa: a specialized toolkit of channels, transporters and stores // *Hum. Reprod. Update.* 2006. V. 12. № 3. P. 253–267.
- Lawson C., Goupil S., Leclerc P. Increased activity of the human sperm tyrosine kinase SRC by the cAMP-dependent pathway in the presence of calcium // *Biol. Reprod.* 2008. V. 79. № 4. P. 657–666.
- Lopez-Torres A.S., Gonzalez-Gonzalez M.E., Mata-Martinez E. *et al.* Luteinizing hormone modulates intracellular calcium, protein tyrosine phosphorylation and motility during human sperm capacitation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 483. № 2. P. 834–839.
- Martinez-Abad S., Castillo-Martin M., Gadani B. *et al.* Voltage-dependent anion channel 2 is involved in in vitro capacitation of boar sperm // *Reprod. Domest. Anim.* 2017. V. 52. № 4. P. 65–68.
- Mullaney J.M., Chueh S.H., Ghosh T.K. *et al.* Intracellular calcium uptake activated by GTP. Evidence for a possible guanine nucleotide-induced transmembrane conveyance of intracellular calcium // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 28. P. 13865–13872.
- Parrish J.J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin // *Theriogen.* 2014. V. 81. № 1. P. 67–73.
- Pons-Rejraji H., Bailey J.L., Leclerc P. Modulation of bovine sperm signalling pathways: correlation between intracellular parameters and sperm capacitation and acrosome exocytosis // *Reprod. Fertil. Dev.* 2009. V. 21. № 4. P. 511–524.
- Rodriguez P.C., Satorre M.M., Beconi M.T. Effect of two intracellular calcium modulators on sperm motility and heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa // *Anim. Reprod. Sci.* 2012. V. 131. № 3–4. P. 135–142.
- Sosa C.M., Zanetti M.N., Pocognoni C.A. *et al.* Acrosomal swelling is triggered by cAMP downstream of the opening of store-operated calcium channels during acrosomal exocytosis in human sperm // *Biol. Reprod.* 2016. V. 94. № 3. P. 57–61.
- Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.J. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator // *J. Cell Biol.* 1982. V. 94. № 2. P. 325–334.
- Ueda T., Chueh S.H., Noel M.W. *et al.* Influence of inositol 1,4,5-trisphosphate and guanine nucleotides on intracellular calcium release within the N1E-115 neuronal cell line // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 3184–3192.
- Vijayaraghavan S., Hoskins D. Quantitation of bovine sperm cytoplasmic calcium with Quin-2 and Fura-2: evidence that external calcium does not have direct access to the sperm cytoplasm // *Cell Calcium.* 1989. V. 10. № 4. P. 241–253.
- Ward C.R., Storey B.T. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay // *Dev. Biol.* 1984. V. 104. № 2. P. 287–296.

Intracytoplasmic Calcium Transduction in *Bos taurus* Spermatozoa at Capacitation and Acrosome Reaction

V. Yu. Denisenko¹ and T. I. Kuzmina^{1, *}

¹All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst,
Moskovskoye shosse, 55a, St. Petersburg – Pushkin, Moscow, 196601 Russia

*e-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Fluorescence intensity indicators of the membrane-calcium-chlortetracycline complex in bovine spermatozoa in the process of capacitation and acrosome reaction using an inhibitor analysis were monitored. It was revealed that the addition of separately prolactin, dbcAMP, GTP, or GDP stimulated the release of Ca^{2+} from

intracellular stores (ICS) in spermatozoa. With the combined action of prolactin and GTP, as well as dbcAMP and GDP, an additional release of Ca^{2+} from ICS was detected. Pre-incubation in the presence of non-hydrolyzable $\text{GDP}\beta\text{S}$ or $\text{GTP}\gamma\text{S}$ inhibited Ca^{2+} release from intracellular depots stimulated by GTP or GDP but did not affect prolactin or dbcAMP-activated Ca^{2+} release from ICS. At the same time, with the combined action of prolactin and GTP, as well as dbcAMP and GDP, an additional Ca^{2+} output from ICS previously incubated in the presence of $\text{GDP}\beta\text{S}$ or $\text{GTP}\gamma\text{S}$ is still present. An analysis of the localization of chlortetracycline fluorescence in spermatozoa revealed that after incubation of spermatozoa in the presence of dbcAMP, GDP or their combined effect the largest number of capacitated cells was recorded under the combined action of these two compounds. Incubation of cells with the addition of prolactin, GTP, or their combined action led to an increase in the number of acrosomal cells, with the greatest number being recorded after the combined action of prolactin and GTP. Thus, it is reasonable to assume that the mobilization of calcium from intracellular stores determines the increase in the number of capacitated bull sperm, the effect is most pronounced with the combined action of dbcAMP and GDP, and the increase in the number of acrosomal cells, the maximum number of which was revealed by the combined action of prolactin and GTP.

Keywords: capacitation, acrosome reaction, calcium, bull sperm

МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

УДК 577.152.34

ОСОБЕННОСТИ ПУЛА ПРОТЕАСОМ В СПОНТАННО ВОЗНИКАЮЩИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШЕЙ

© 2020 г. Т. М. Астахова^а, Е. В. Моисеева^б, Н. П. Шарова^{а, *}

^аФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

^бФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997 Россия

*e-mail: npsharova@bk.ru

Поступила в редакцию 19.04.2020 г.

После доработки 28.04.2020 г.

Принята к публикации 30.04.2020 г.

Цель настоящей работы — исследовать особенности пула протеасом злокачественных опухолей молочной железы на уникальной модели инбредных мышей BLRB/BYRB, характеризующихся высокой вероятностью спонтанного развития этого типа рака. Обнаружено, что пул протеасом молочных желез относительно устойчив и не изменяется у мышей различного физиологического состояния: здоровых самок разных возрастов и самки-опухоленосителя. Однако при образовании злокачественных опухолей эта устойчивость нарушается, и пул протеасом подвергается комплексным изменениям. В целом, он увеличивается по количеству протеолитических субчастиц. При этом непропорционально сильнее возрастает его химотрипсинподобная активность, что указывает на дополнительные механизмы ее регуляции. К таким механизмам можно отнести выявленную повышенную экспрессию активаторов PA28 $\alpha\beta$ и 19S RC, а также изменение субъединичного состава протеасом, обусловленное увеличением экспрессии иммунных субъединиц LMP2 и LMP7. Количество каждого из исследованных компонентов пула протеасом возрастало в опухоли по-разному. Наиболее значительно увеличивалось количество двух компонентов — активатора 19S RC и субъединицы LMP2, что указывает на перспективность их использования в качестве мишеней для терапии рака молочной железы. Вместе с тем, нельзя забывать, что эти компоненты важны и для жизнедеятельности нормальных клеток. Поэтому при создании новых лекарственных препаратов следует попутно разрабатывать приемы их адресной доставки к опухоли или иные способы безопасного применения.

Ключевые слова: иммунные протеасомы, регуляторы протеасом, активность протеасом, рак молочной железы, модель мышей BLRB/BYRB

DOI: 10.31857/S047514502005002X

ВВЕДЕНИЕ

Выявление молекулярных механизмов возникновения и роста злокачественных опухолей различной этиологии является одной из наиболее актуальных задач современной биологии развития. В этой связи представляется перспективным исследование протеасом — “вездесущих” мультисубъединичных протеаз, осуществляющих важнейший метаболический путь и теоретически способных расщепить любой клеточный белок (Kondakova et al., 2020). Клетки млекопитающих обладают самым многочисленным набором множественных форм протеасом, различающихся структурой и способами распознавания и гидролиза тех или иных белковых субстратов. Особое место в пуле протеасом млекопитающих принадлежит иммунным протеасомам, содержащим протеолитические субъединицы LMP2 (β 1i), LMP10 (MECL1, β 2i) и LMP7 (β 5i) соответственно вместо субъединиц β 1, β 2 и β 5 конститутивных про-

теасом (Tanaka, Kasahara, 1998). Иммунные протеасомы эффективно образуют антигенные эпитопы для молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I и благодаря этому являются важными участниками развития иммунных реакций. Однако функции иммунных протеасом в иммунных процессах не ограничиваются образованием антигенных эпитопов. Недавно обнаружено, что форма иммунных протеасом с субъединицей LMP2 (но не LMP7), экспрессирующаяся в клетках аллотрансплантата у крыс, связана с развитием иммунологической толерантности независимо от донор-реципиентных различий (Astakhova et al., 2019). Множественные формы протеасом отличаются не только набором протеолитических субъединиц, но и присутствием или отсутствием различных регуляторов (Tanaka, 2009). Так, регуляторный комплекс 19S (19S RC или активатор PA700) распознает убиквитинированные полно-размерные белки и осуществляет их продвижение

Таблица 1. Описание самок мышей, взятых в эксперимент

Номер мыши	Линия	Возраст, месяцы	Размеры опухоли молочной железы, мм × мм × мм
1	BLRB	3	Нет
2	BLRB	18	Нет
3	BLRB	19	12 × 16 × 9
4	BLRB	14	12 × 16 × 8
5	BYRB	18	18 × 24 × 10

в протеолитическую камеру протеасомы. Напротив, активаторы PA28 $\alpha\beta$ и PA200 способствуют утилизации небольших полипептидов независимо от убиквитина. Для нормального функционирования организма необходимо поддержание соотношения множественных форм протеасом, строго определенного для каждого типа клеток.

Неудивительно, что в целом ряде опухолей человека обнаружены изменения в пуле протеасом по сравнению с контролем (Sharova et al., 2011; Kondakova et al., 2014). В большинстве исследованных опухолей выявлены повышенные активность и экспрессия тотального пула протеасом. Для некоторых типов рака человека показано изменение субъединичного состава протеасом. Вместе с тем, следует учитывать, что исследование злокачественных опухолей человека имеет серьезное ограничение — отсутствие корректного контроля. В качестве контроля, как правило, используется прилежащая к опухоли ткань, которую можно рассматривать только как условно нормальную. Поэтому в дополнение к образцам злокачественных тканей пациентов полезно изучение модельных опухолей животных, позволяющих использовать более адекватный контроль. Подобные исследования важны для детального анализа и сравнения тонких различий в экспрессии отдельных субъединиц и/или субкомплексов протеасом в злокачественных опухолях животных и человека, что может быть перспективно для разработки новых способов терапии и диагностики онкологических заболеваний.

Цель настоящей работы — исследовать особенности пула протеасом злокачественных опухолей молочной железы на уникальной модели инбредных мышей BLRB/BYRB, характеризующихся высокой вероятностью спонтанного развития этого типа рака (Moiseeva, 2009; Aronov et al., 2019).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Работу выполняли на опухолях молочной железы самок инбредных мышей близкородственных линий BLRB-Rb(8.17)1em и BYRB-Rb(8.17)1em (далее BLRB и BYRB соответственно) (Festing, 1998; Moiseeva, 2009), характеризующихся высокой частотой спонтанно проявляющегося рака молочной железы у рожавших самок (Aronov et al., 2019). Мыши поддерживались в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук в стандартных тщательно контролируемых условиях вивария, еженедельно в колонии стареющих самок выявляли вновь появляющиеся опухоли молочной железы. Экспериментальные манипуляции с животными проводили в соответствии с международными нормами (US Department of Health and Human Services, National Institute of Health Publication No. 93–23, revised 1985), протокол исследования № 155/2014 был одобрен Комиссией по биоэтике Института биоорганической химии (http://www.ibch.ru/downloads/documents/553/Institutional_Policy_on_the_Use_of_Laboratory_Animals.pdf). Использовали опухоли молочной железы самок мышей в возрасте 14–19 месяцев (табл. 1 и 2). Контролем служили интактные ткани молочных желез самок мышей в возрасте 3 и 18 месяцев, не имеющих опухоли, а также непораженные опухолью молочные железы самки-опухоленосителя (табл. 1 и 2). Каждый образец был разделен на четыре порции/фрагмента, которые исследовали в независимых экспериментах.

Антитела. Для Вестерн-блоттинга использовали моноклональные антитела мыши к субъединицам $\alpha 1, 2, 3, 5, 6, 7$ протеасом, субъединице Rpt6 регулятора 19S RC, поликлональные антитела кролика к иммунным субъединицам LMP2 и LMP7 протеасом, субъединице PA28 α активатора PA28 $\alpha\beta$

Таблица 2. Описание образцов, взятых в эксперимент

Обозначение образца	Номер мыши	Ткань
I	1	Молочные железы нерожавшей самки
II	2	Молочные железы нерожавшей самки
III	5	Молочные железы без признаков рака самки-опухоленосителя
IV	3	Рак молочной железы
V	4	Рак молочной железы
VI	5	Рак молочной железы

(Enzo Life Sciences, США), моноклональные антитела мыши к β -актину (Santa Cruz Biotechnology, США), антитела козы к IgG мыши и кролика, конъюгированные с пероксидазой (Amersham Biosciences, Великобритания).

Определение химотрипсинподобной активности протеасом. Осветленные гомогенаты тканей получали в соответствии с опубликованным протоколом (Kagrova et al., 2012). Химотрипсинподобную (ХТП) активность протеасом определяли в 1, 1.5 и 2 мкл осветленных гомогенатов тканей по гидролизу флуорогенного субстрата Suc-LLVY-AMC (Sigma, США) в соответствии с методикой, описанной П.А. Ероховым с соавторами (Erokhov et al., 2017). Реакцию проводили в течение 20 минут при 37°C. В этих условиях значения ХТП активности соответствовали прямолинейному отрезку графика зависимости количества гидролизованного субстрата от времени реакции (Erokhov et al., 2017), что позволило сравнивать активность в разных пробах. Специфичность подтверждали с помощью ингибитора ХТП активности протеасом Z-leucyl-leucyl-leucinal (MG-132) (Sigma, США). Остаточная ХТП активность в пробах в присутствии 5 мкМ MG-132 составляла не более 10%. Увеличение концентрации ингибитора не изменяло значений остаточной активности. ХТП активность протеасом определяли как разницу между полной активностью в отсутствие MG-132 и остаточной активностью в присутствии 5 мкМ MG-132, выражали в количестве гидролизованного субстрата и нормализовали на 100 мкл осветленных гомогенатов.

Вестерн-блоттинг. После электрофореза осветленных гомогенатов в 13%-ном ПААГ в присутствии SDS (5 мкл на дорожку) полипептиды переносили с помощью мокрого блоттинга на нитроцеллюлозную мембрану. Обработку мембраны антителами к β -актину (1 : 1000), субъединицам протеасом (1 : 1000) и активаторов протеасом (1 : 1500) осуществляли стандартным методом (Erokhov et al., 2017). Для выявления неспецифического мечения белков проводили дополнительно обработку мембраны после переноса полипептидов антителами к IgG мыши. Оптическую плотность полос на рентгеновской пленке анализировали с помощью стандартной программы ImageJ.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного приложения Excel. Результаты представлены как среднее значений, полученных в четырех аналогичных экспериментах и измеренных в трех параллельных пробах $\pm$ стандартная ошибка. Статистическую достоверность оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, достоверными считали различия при $p < 0.05$.

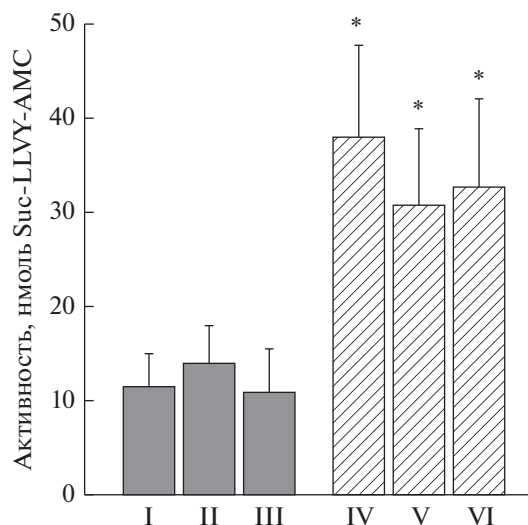


Рис. 1. Химотрипсинподобная активность протеасом в контрольных (I–III) и опухолевых тканях (IV–VI) молочных желез мышей. Активность приведена для 100 мкл осветленных гомогенатов тканей как среднее $\pm$ стандартная ошибка. * Достоверное отличие от образцов I, II и III ($p < 0.05$, $n = 4$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность протеасом в злокачественных опухолях молочной железы мышей. В табл. 1 и 2 приведено описание мышей и тканей, взятых в эксперимент. ХТП активность пула протеасом опухолей молочной железы достоверно не отличалась у исследованных самок мышей BLRB/BYRB, но в три раза превышала ХТП активность контрольных тканей молочной железы (рис. 1). Примечательно, что активность протеасом была одинакова в молочных железах, взятых в качестве контрольных, несмотря на то, что в это исследование вошли, во-первых, мыши разных возрастов и, во-вторых, мыши, не имеющие опухолей, и самка-опухоленоситель. Таким образом, ХТП активность пула протеасом поддерживается в устойчивом состоянии в молочных железах у мышей с указанными физиологическими различиями, но значительно нарушается при образовании патологической опухолевой ткани. Трехкратное повышение активности в опухоли могло быть связано как с аномально высокой экспрессией протеолитических субчастиц протеасом и/или изменением их субъединичного состава, так и с увеличением экспрессии регуляторов активности протеасом. Следующая часть настоящей работы посвящена выяснению этого вопроса.

Особенности экспрессии субъединиц протеасом и регуляторов активности протеасом в злокачественных опухолях молочной железы мышей. Тотальный пул протеасом изучали Вестерн-блоттингом с использованием антител к субъединицам $\alpha 1, 2, 3, 5, 6, 7$, входящим в состав всех форм

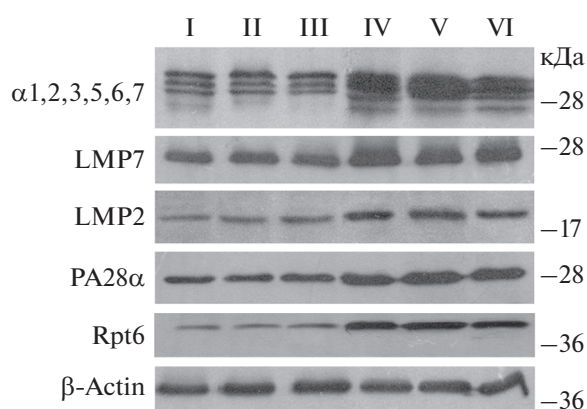


Рис. 2. Вестерн-блоты субъединиц протеасом и активаторов протеасом осветленных гомогенатов контрольных (I–III) и опухолевых тканей (IV–VI) молочных желез мышей с использованием соответствующих антител. Указаны молекулярные массы белков-маркеров.

протеасом. Тем же методом с использованием соответствующих антител исследовали экспрессию протеолитических иммунных субъединиц LMP2 и LMP7, вызывающих наибольший интерес в связи с их функцией образования регуляторных пептидов. Кроме того, анализировали содержание активатора 19S RC с помощью антител к одной из его субъединиц — белку Rpt6, а также активатора PA28αβ с помощью антител к субъединице PA28α (рис. 2). Предварительное исследование неспецифического связывания белков на мембране антигелами к IgG мыши выявило наличие меченых полипептидов с молекулярной массой более 50 кДа, локализация которых не совпадала с локализацией изучаемых субъединиц.

Обнаружено, что не только ХТП активность, но и содержание каждого из указанных компо-

нентов пула протеасом одинаково в контрольных тканях молочной железы независимо от физиологического состояния мышей (рис. 2, табл. 3), что свидетельствует об устойчивости пула протеасом в целом. В опухолевых образцах все исследуемые параметры протеасом были достоверно увеличены, но по-разному. Так, тотальный пул протеасом оказался увеличенным только в 1.6 раз при трехкратном повышении его ХТП активности, что свидетельствует о сложной регуляции активности протеасом дополнительными факторами при образовании злокачественных опухолей молочной железы.

Большой интерес представляет существенная разница в изменении экспрессии иммунных субъединиц LMP2 и LMP7. Если экспрессия субъединицы LMP2 увеличена в 2.6 раз, то субъединицы LMP7 — всего лишь в 1.5 раза. Этот результат указывает на разные функции субтипов протеасом, содержащих субъединицы LMP2 и LMP7. Похожая закономерность была выявлена нами ранее при исследовании злокачественной трансформации клеток печени под действием дипина у мышей (Astakhova et al., 2010) и процесса роста папиллярной карциномы щитовидной железы человека (Sharova et al., 2011). Понять разницу в функциях данных субтипов иммунных протеасом удалось лишь при изучении процесса развития толерантности к аллотрансплантату на модели индукции донорспецифической толерантности у крыс. Оказалось, что увеличение экспрессии протеасом с иммунной субъединицей LMP2 в клетках трансплантата сопровождается развитием толерантности, а высокое содержание протеасом с субъединицей LMP7 в лимфоцитарно-макрофагальном инфильтрате связано с процессом отторжения трансплантата (Karpova et al., 2012; Astakhova et al., 2019). Мы полагаем, что в опухолевых клетках так же, как и в клетках трансплантата, проте-

Таблица 3. Содержание субъединиц протеасом и регуляторов активности протеасом в осветленных гомогенатах контрольных и опухолевых тканей молочных желез

Субъединицы	Относительное содержание субъединиц в образцах, % ^(a)				
	молочные железы		рак молочной железы		
	II	III	IV	V	VI
α1,2,3,5,6,7	96 ± 20	89 ± 19	153 ± 24*	159 ± 18*	151 ± 22*
LMP7	107 ± 11	104 ± 20	174 ± 32*	139 ± 12*	155 ± 15*
LMP2	98 ± 27	101 ± 11	265 ± 64*	295 ± 75*	230 ± 26*
PA28α	102 ± 14	106 ± 12	166 ± 30*	197 ± 43*	167 ± 36*
Rpt6	94 ± 31	117 ± 23	426 ± 42*	491 ± 99*	414 ± 87*

^(a) За 100% принято содержание субъединиц в контрольном образце I. Содержание субъединиц нормализовано на содержание β-актина. Приведена стандартная ошибка среднего. * Достоверное отличие от соответствующих значений в образцах I, II и III ($p < 0.05$, $n = 4$).

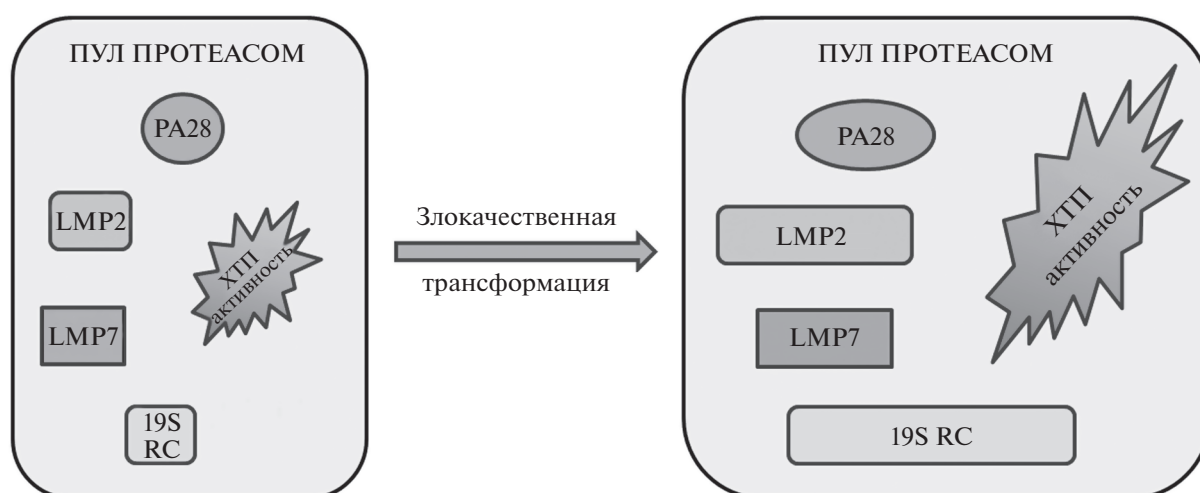


Рис. 3. Схема изменений, происходящих в пуле протеасом в спонтанных опухолях по сравнению с интактной тканью молочной железы у мышей.

асомы с субъединицей LMP2 продуцируют пептиды, которые, минуя молекулы МНС класса I, выделяются в межклеточное пространство и подавляют активность инфильтрованных цитотоксических лимфоцитов. По-видимому, данную функцию протеасомы, содержащие субъединицу LMP2, выполняют совместно с активатором PA28 $\alpha\beta$, экспрессия которого также повышена в опухолях молочных желез (рис. 2, табл. 3). Подтверждением этому предположению служат результаты, указывающие на преимущественное “нарезание” пептидов малой длины, не пригодных для молекул МНС класса I, под действием активатора PA28 $\alpha\beta$ по сравнению с 19S RC (Raule et al., 2014).

Следует подчеркнуть, что во всех исследованных опухолевых тканях экспрессия 19S RC увеличена наиболее значительно по сравнению с другими компонентами (рис. 2, табл. 3). Это объяснимо, поскольку активно делящиеся злокачественные клетки требуют интенсивного белкового обмена, в осуществлении которого важную роль играет 19S RC, обеспечивая распознавание и утилизацию убиквитинированных белков. В той или иной степени, экспрессия этого регулятора увеличена в разных опухолевых клетках (Astakhova et al., 2010; Sharova et al., 2011; Kondakova et al., 2014). Неудивительно, что соединения, повреждающие функции 19S RC, проявляют противоопухолевую активность, в том числе по отношению к злокачественным клеткам молочной железы мыши (Astakhova et al., 2018).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые проведено детальное исследование пула протеасом злокачественных

опухолей молочной железы по сравнению с контрольными образцами на уникальной модели мышей BLRB/BYRB. Обнаружен ряд важных фактов. Во-первых, пул протеасом ткани молочной железы характеризуется относительной устойчивостью и не изменяется у мышей различного физиологического состояния. Во-вторых, при спонтанном образовании злокачественных опухолей молочной железы пул протеасом “выбивается” из равновесия и становится подчиненным нуждам раковых клеток, что сопровождается его комплексным изменением. В целом, пул протеасом увеличивается по количеству протеолитических субчастиц. При этом непропорционально сильнее возрастает его ХТП активность, что указывает на дополнительные механизмы ее регуляции. К таким механизмам можно отнести выявленную повышенную экспрессию активаторов PA28 $\alpha\beta$ и 19S RC, а также изменение субъединичного состава протеасом, обусловленное увеличением экспрессии иммунных субъединиц LMP2 и LMP7.

Необходимо отметить, что количество каждого из исследованных компонентов пула протеасом увеличивается до необходимого для опухоли уровня (рис. 3). Наиболее сильно увеличено количество двух компонентов — активатора 19S RC и иммунной субъединицы LMP2, что указывает на перспективность их использования в качестве мишеней для терапии рака молочной железы. Вместе с тем, нельзя забывать о том, что это важные компоненты и здоровых клеток. Например, активность субъединицы LMP2 связана с передачей сигнала между нейронами (Erokhov et al., 2017). Поэтому при создании новых лекарственных препаратов следует учитывать необходимость разработки приемов их адресной доставки к опухоли или иных способов безопасного применения.

БАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЦКП ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН за предоставление DTX 880 Beckman Coulter и Multimode Analysis Software.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания на 2020 г. в ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными до и после экспериментальных вмешательств соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Н.П. Шарова и Т.М. Астахова разработали эксперимент. Е.В. Моисеева занималась разведением инбредных мышей линий BLRB/BYRB вплоть до выявления опухолей, подтвердила их принадлежность к раку молочной железы гистологически, подготовила образцы тканей мышей BLRB/BYRB. Т.М. Астахова провела экспериментальную работу по исследованию протеасом в образцах. Н.П. Шарова подготовила иллюстративный материал и драфт статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и корректировке статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aronov D.A., Zhukov V.V., Semushina S.G., Moiseeva E.V. Imbalances in cellular immunological parameters in blood predetermine tumor onset in a natural mouse model of breast cancer // *Cancer Immunol. Immunother.* 2019. V. 68. № 5. P. 721–729.
- Astakhova T.M., Bozhok G.A., Alabed'al'karim N.M., Karpova Y.D., Lyupina Yu.V., Ushakova E.M., Legach E.I., Bondarenko T.P., Sharova N.P. Proteasome expression in ovarian heterotopic allografts of Wistar and August rats under induction of donor specific tolerance // *Russ. J. Dev. Biol.* 2019. V. 50. № 5. P. 261–267.
- Astakhova T.M., Delone G.V., Lyupina Yu.V., Abramova E.B., Uryvaeva I.V., Sharova N.P. Changes in the proteasome pool during malignant transformation of mouse liver cells // *Acta Naturae*. 2010. V. 2. № 1. P. 68–73.
- Astakhova T.M., Morozov A.V., Erokhov P.A., Mikhailovskaya M.I., Akopov S.B., Chupikova N.I., Safarov R.R., Sharova N.P. Combined effect of bortezomib and menadione sodium bisulfite on proteasomes of tumor cells: the dramatic decrease of bortezomib toxicity in a pre-clinical trial // *Cancers*. 2018. V. 10. № 10. pii: E351.
- Erokhov P.A., Lyupina Yu.V., Radchenko A.S., Kolacheva A.A., Nikishina Yu.O., Sharova N.P. Detection of active proteasome structures in brain extracts: Proteasome features of August rat brain with violations in monoamine metabolism // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 41. P. 70941–70957.
- Festing M. Inbred strains of mice: BLRB // *Mouse Genome Informatics*. 1998. <http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/BLRB.shtml>.
- Karpova Ya.D., Bozhok G.A., Lyupina Yu.V., Legach E.I., Astakhova T.M., Stepanova A.A., Bondarenko T.P., Sharova N.P. Changes in the proteasome function after induction of donor-specific tolerance in rats with ovarian allograft // *Biol. Bull. (Moscow)*. 2012. V. 39. № 3. P. 244–249.
- Kondakova I.V., Shashova E.E., Sidenko E.A., Astakhova T.M., Zakharova L.A., Sharova N.P. Estrogen receptors and ubiquitin proteasome system: mutual regulation // *Biomolecules*. 2020. V. 10. № 4. pii: E500.
- Kondakova I.V., Spirina L.V., Koval V.D., Shashova E.E., Choinzonov E.L., Ivanova E.V., Kolomiets L.A., Chernyshova A.L., Slonimskaya E.M., Usynin E.A., Afanasyev S.G. Chymotrypsin-like activity and subunit composition of proteasomes in human cancers // *Mol. Biol.* 2014. V. 48. № 3. P. 384–389.
- Moiseeva E. Anti-Breast Cancer Drug Testing. Original Approaches. Novel Set of Mouse Models. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2009. 225 p.
- Raule M., Cerruti F., Benaroudj N., Migotti R., Kikuchi J., Bachi A., Navon A., Dittmar G., Cascio P. PA28 $\alpha\beta$ reduces size and increases hydrophilicity of 20S immunoproteasome peptide products // *Chem. Biol.* 2014. V. 21. № 4. P. 470–480.
- Sharova N.P., Astakhova T.M., Karpova Ya.D., Lyupina Yu.V., Alekhin A.I., Goncharov N.G., Sumedi I.R., Cherner V.A., Rodoman G.V., Kuznetsov N.A., Erokhov P.A. Changes in proteasome pool in human papillary thyroid carcinoma development // *Cent. Eur. J. Biol.* 2011. V. 6. № 4. P. 486–496.
- Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and function // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*. 2009. V. 85. № 1. P. 12–36.
- Tanaka K., Kasahara M. The MHC class I ligand-generating system: Roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28 // *Immunol. Rev.* 1998. V. 163. P. 161–176.

Features of Proteasome Pool in Spontaneously Occurring Malignant Tumors of the Mammary Gland in Mice

T. M. Astakhova¹, E. V. Moiseeva², and N. P. Sharova^{1, *}

¹*Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia*

²*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia*

**e-mail: npsharova@bk.ru*

The purpose of this work is to investigate the features of the proteasome pool in malignant tumors of mammary glands on a unique model of inbred BLRB/BYRB mice characterized by a high probability of spontaneous development of this type of cancer. It was found that the proteasome pool of mammary glands was relatively stable and it did not change in mice of various physiological state: normal females of different age and tumor carrier. However, with the formation of malignant tumors, this stability is violated, and the proteasome pool undergoes complex changes. In general, it increases in the number of proteolytic subparticles. At the same time, its chymotrypsin-like activity increases disproportionately stronger, which indicates additional mechanisms for its regulation. These mechanisms include the detected increased expression of activators PA28 $\alpha\beta$ and 19S RC, as well as changes in the subunit composition of proteasomes due to increased expression of the immune subunits LMP2 and LMP7. The amount of each of the studied components in the proteasome pool increased in the tumor in different ways. The most significant increase was observed in the amount of two components – 19S RC activator and LMP2 subunit, which indicates the prospects of their use as targets for breast cancer therapy. However, we must not forget that these components are also important for the vital functions of normal cells. Therefore, when creating new drugs, we should simultaneously develop methods for their targeted delivery to the tumor or other ways of safe use.

Keywords: immune proteasomes, proteasome regulators, proteasome activity, mammary cancer, BLRB/BYRB mouse model

МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

УДК 57.052:58.01:58.02

IN SILICO АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИС-ЭЛЕМЕНТОВ В ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ АПОПЛАСТНУЮ ИНВЕРТАЗУ И САХАРОЗОСИНТАЗУ У БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ¹

© 2020 г. Т. В. Тарелкина^а, *, Н. А. Галибина^а, Ю. Л. Мощенская^а, Л. Л. Новицкая^а

^аИнститут леса — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”,
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910 Россия

*e-mail: karelina.t.v@gmail.com

Поступила в редакцию 23.02.2020 г.

После доработки 15.05.2020 г.

Принята к публикации 17.05.2020 г.

Работа является продолжением исследований по выявлению роли сахарозы в процессе формирования узорчатой древесины карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Merckl.) Hämet-Ahti). Ранее было установлено, что при данном типе ксилогенеза в тканях ствола березы существенно изменяется активность ферментов метаболизма сахарозы — сахарозосинтазы и инвертазы. Результаты молекулярно-генетического анализа свидетельствуют о том, что активность указанных ферментов регулируется преимущественно на уровне транскрипции кодирующих их генов (*SUS* и *CWInv*). В геноме березы повислой мы идентифицировали гены, кодирующие сахарозосинтазу и апопластную инвертазу. *In silico* анализ регуляторных цис-элементов, присутствующих в 2 Кб промоторной области этих генов, позволил выявить ряд мотивов, участвующих в регуляции их экспрессии. Наибольшей как по числу отдельных элементов, так и по их встречаемости была группа элементов, связанная с влиянием абиотических факторов, в основном, света и недостатка влаги. Идентифицирован ряд тканеспецифичных мотивов, функция которых связана с экспрессией генов в проводящих тканях. Анализ гормон-зависимых элементов показал, что формирование узорчатой древесины карельской березы, происходящее на фоне высокой активности апопластной инвертазы, очевидно, не связано с активацией генов *CWInv* высоким уровнем ауксина. В исследованных последовательностях промоторов обнаружены различные элементы, указывающие на непосредственное влияние сигналинга сахаров. Выявлены два наиболее вероятных кандидата на участие в регуляции углеводного метаболизма в тканях ствола березы — транскрипционные факторы (ТФ) DOF5.6 (HCA2) и DOF5.8. Идентификация и функциональная характеристика ТФ семейства DOF у березы повислой представляют интерес с точки зрения регуляции альтернативных сценариев ксилогенеза.

Ключевые слова: сахарозосинтаза, апопластная инвертаза, абиотический стресс, сигналинг сахаров, ауксин-зависимая экспрессия генов, береза повислая

DOI: 10.31857/S0475145020050080

ВВЕДЕНИЕ

Узорчатая древесина (ксилема) карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Merckl.) Hämet-Ahti) по рисунку напоминает мрамор и является одной из самых дорогостоящих в Северной Европе (Hagqvist, Mikkola, 2008). Признак узорчатости древесины наследуется, однако его проявление находится под контролем факторов среды (Hintikka, 1941; Соколов, 1970; Любавская, 1978; Ермаков, 1986; Евдокимов, 1989; Новицкая, 2008; Novitskaya et al., 2016b; Galibina et al., 2019a). Кроме того, узорчатость может сильно варьировать в

пределах одного ствола (Novitskaya et al., 2016a, 2016b) (рис. 1). Высокий уровень изменчивости делает карельскую березу уникальным объектом для исследования механизмов регуляции ксилогенеза.

Формирование узорчатой древесины карельской березы происходит на фоне высокой концентрации сахарозы в камбиальной зоне (Novitskaya, Kushnir, 2006; Novitskaya et al., 2016a) и сопровождается изменением активности расщепляющих сахарозу ферментов. У обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) и у безузорчатых деревьев карельской березы расщепление сахарозы в зоне роста и дифференциации структурных элементов ксилемы в основном происходит с участием цитоплазматического фермента сахарозосинтазы

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0475145020050080 для авторизованных пользователей.



Рис. 1. Поперечный спил ствола карельской березы (кора удалена). Узорчатая древесина сформировалась вокруг древесины обычного строения после прорезживания древостоя (резкое улучшение освещенности кроны). Хорошо видна асимметричность узора. Масштабная линейка 2 см.

(СС) (Galibina et al., 2015b; Moshchenskaya et al., 2016; Novitskaya et al., 2020). Образование узорчатой древесины карельской березы связано с расщеплением сахарозы апопластной инвертазой (АпИInv) и поступлением в клетку большого количества гексоз (Galibina et al., 2015a, 2019b; Moshchenskaya et al., 2016; Novitskaya et al., 2020). Установлено, что активность СС в проводящих тканях ствола березы коррелирует с уровнем экспрессии кодирующих данный фермент генов *BpSUS1* и *BpSUS2* (Moshchenskaya et al., 2017). Активность АпИInv регулируется как на уровне экспрессии генов (*CWInv1.0*, *CWInv1.1*, *CWInv4*), так и на посттрансляционном уровне с участием ингибитора АпИInv, кодируемого геном *BpCif* (Galibina et al., 2019b).

К настоящему моменту накоплен значительный объем данных об участии сахарозосинтазы и инвертазы в различных физиологических процессах в растительном организме (Roitsch, 1999; Koch, 2004; Ruan, 2014; Moshchenskaya et al., 2019; Stein, Granot, 2019), проведены исследования по выявлению их роли в ксилогенезе и флоэмогенезе древесных растений (Sung et al., 1993, 1996; Nauch, Magel, 1998; Sauter, 2000; Coleman et al., 2009; Li et al., 2012; Roach et al., 2017). В то же время, молекулярно-генетические механизмы, участвующие в регуляции метаболизма сахаров, изучены слабо (Li et al., 2017; Stein, Granot, 2019). Наибольшее количество публикаций по данной теме посвящено результатам изучения регуляции экспрессии генов, кодирующих СС и АпИInv, на уровне тран-

скрипции. В этом случае регуляция осуществляется через взаимодействие сигнальных молекул (сахаров, гормонов и др.) или транскрипционных факторов (ТФ) с регуляторными *цис*-элементами, расположенными в 5'-фланкирующей области генов. Механизмы такого взаимодействия в настоящее время изучены слабо, однако экспериментальным путем было идентифицировано большое количество *цис*-элементов, участвующих в регуляции экспрессии генов в связи с действием эндогенных и экзогенных факторов (Galkin et al., 2004; Priest et al., 2009; Viřas et al., 2016). Ряд *цис*-элементов был идентифицирован в промоторах генов, кодирующих ферменты углеводного обмена. Так, показано, что *цис*-элементы в промоторе гена СС риса *RSus1* необходимы для его сахарозо-индуцируемой экспрессии (Chang et al., 2011). Установлено, что содержащиеся в промоторах генов АпИInv томата *Lin5* и *Lin7* элементы сигналинга гиббереллина, ауксина и абсцизовой кислоты обуславливают индукцию экспрессии этих генов соответствующими гормонами (Proels et al., 2003). В промоторе гена АпИInv томата *Lin6* были идентифицированы мотивы, связанные с раневым сигналингом и суточными ритмами, и экспериментально показана индукция экспрессии данного гена соответствующими стимулами (Proels, Roitsch, 2009). Сравнительный анализ последовательностей промотора гена АпИInv табака *Nicotiana benthamiana* и промоторов 30 других его генов, демонстрирующих аналогичный профиль экспрессии при воздействии различных стрессовых факторов, позволил устано-

Таблица 1. Число регуляторных *цис*-элементов в 2 Кб промоторной области генов *BpSUS1–4* и *BpCWInv1–3*

Группа элементов	<i>BpSUS1</i>	<i>BpSUS2</i>	<i>BpSUS3</i>	<i>BpSUS4</i>	<i>BpCWInv1</i>	<i>BpCWInv2</i>	<i>BpCWInv3</i>
Чувствительные к влиянию абиотических факторов	38	28	26	31	26	36	30
Тканеспецифичные	20	20	25	25	18	22	20
Гормончувствительные	12	13	17	15	15	9	12
Сахарочувствительные	8	7	8	5	8	2	5
Прочие	30	23	22	22	24	24	24
Всего элементов	108	91	98	99	91	93	91

вить важную роль *цис*-элементов, участвующих в стрессовом сигналинге, в регуляции координированной экспрессии генов (Sheshadri et al., 2018).

На основании вышесказанного можно заключить, что изучение регуляторных механизмов экспрессии генов, участвующих в углеводном обмене при различных сценариях ксилогенеза, представляет большой интерес с точки зрения познания механизмов нормального и аномального роста у древесных растений. В геноме березы повислой мы идентифицировали гены, кодирующие сахарозосинтазу и апопластную инвертазу, и изучили регуляторные элементы, присутствующие в их промоторных областях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск генов, кодирующих СС и АпИнв, проводили в геноме березы повислой (*Betula pendula* Roth), опубликованном на портале CoGe (Salojärvi et al., 2017). С этой целью нуклеотидные последовательности CDS и соответствующие им белковые последовательности генов *SUS* и *CWIN* *Arabidopsis thaliana* и *Populus trichocarpa* (базы данных The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (release 13, <https://www.arabidopsis.org>) и Phytozome (release 3.0, <http://www.phytozome.net/poplar>)) использовали в качестве поискового запроса BLAST по геному *B. pendula* (release 1.2, <https://genomevolution.org/coge>) для выявления гомологичных последовательностей.

Предсказание структуры белков березы повислой выполняли с использованием ресурса National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) (Marchler-Bauer, Bryant, 2004), предсказание физических свойств — с помощью ресурса Expert Protein Analysis System (ExPASy) (<https://www.expasy.org/>) (Artimo et al., 2012).

Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Множественное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью алгоритма ClustalW. Фи-

логенетическое древо было построено с использованием метода присоединения ближайшего соседа (Neighbor-Joining method), оценку достоверности кластеризации проводили методом bootstrap с 1000 повторами (Felsenstein, 1985; Saitou, Nei, 1987; Tamura et al., 2004). Определение степени идентичности/сходства последовательностей выполнено с помощью ресурса EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

Для анализа методами биоинформатики были использованы промоторные области генов длиной 2000 пар нуклеотидов до старта транскрипции. Поиск *цис*-регуляторных элементов, расположенных в промоторах исследуемых генов, выполняли с помощью ресурсов New-PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>) (Higo et al., 1999) и PlantPAN 3.0 (<http://plantpan.itsps.ncku.edu.tw/>) (Chow et al., 2019). Помимо инструментов для выявления *цис*-элементов, указанные ресурсы содержат информацию об экспериментально проверенных функциях *цис*-элементов и ассоциированных с ними транскрипционных факторах (ТФ). Для выявления потенциальных сайтов связывания с ТФ проводили анализ частоты встречаемости *цис*-элементов и ее статистическое оценивание на основании встречаемости *цис*-элементов в промоторах модельных организмов *A. thaliana* и *P. trichocarpa* с помощью инструмента Regulation Prediction ресурса PlantRegMap (<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/>) (Tian et al., 2020).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация генов *SUS* и *CWINv* в геноме березы повислой

Гены семейств *SUS* и *CWINv* были идентифицированы и охарактеризованы у ряда древесных растений. У *Vitis vinifera* было выявлено 5 генов *SUS* (Zhu et al., 2017), по 6 генов — у *Citrus unshiu* (Islam et al., 2014) и *Prunus persica* (Zhang et al., 2015), 11 генов — у *Malus domestica* (Tong et al., 2018) и 15 генов у *Populus trichocarpa* (An et al., 2014). По 3 гена *CWINv* было идентифицировано у *Malus do-*

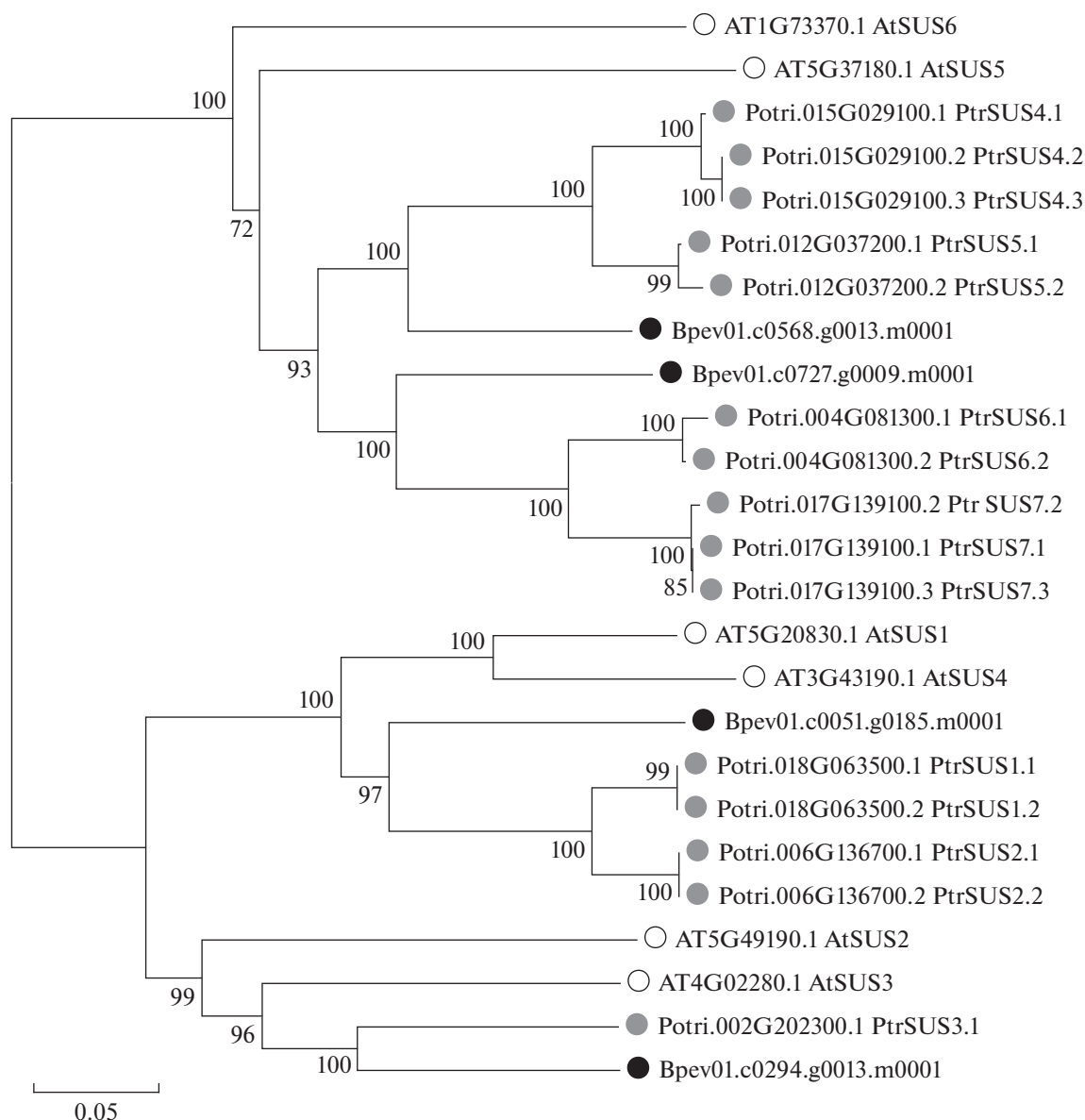


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей (CDS) потенциальных генов *SUS Betula pendula* и известных генов *SUS Arabidopsis* и *Populus*. Гены *Betula pendula* обозначены черным цветом, *Arabidopsis thaliana* – белым цветом, *Populus trichocarpa* – серым цветом. Длина ветвей пропорциональна генетической дистанции (число замещений на сайт). Существенные значения bootstrap (процент деревьев, в которых ассоциированные таксоны кластеризуются вместе) для 1000 выборок показаны в основании ветви.

mestica (Hyun et al., 2011), *Camellia sinensis* (Qian et al., 2016) и *Populus trichocarpa* (Chen et al., 2015).

В геноме березы повислой было выявлено 4 гена *SUS*, кодирующих белки, гомологичные СС *Arabidopsis* и *Populus* (рис. 2). Генам *Bpev01.c0294.g0013.m0001*, *Bpev01.c0051.g0185.m0001* и *Bpev01.c0727.g0009.m0001* были присвоены названия *BpSUS1*, *BpSUS2* и *BpSUS3* соответственно, т.к. последовательности CDS этих генов продемонстрировали высокий уровень сходства с CDS генов *SUS1–SUS3 Betula luminifera* (номера доступа NCBI KC204973.1, KC204974.1, KC204975.1).

Гену *Bpev01.c0568.g0013.m0001* было присвоено название *BpSUS4*. Структура и физические свойства предсказанных белков соответствовали сахарозосинтазам, выявленным у других высших растений (Дополнительные материалы, табл. Д1).

Филогенетический анализ показал, что из 5 генов березы повислой, принадлежащих к подсемейству кислых инвертаз, 3 гена гомологичны апопластным инвертазам *Arabidopsis* и *Populus*, в то время как последовательности двух других генов ближе к вакуолярным инвертазам (рис. 3). По результатам филогенетического анализа ге-

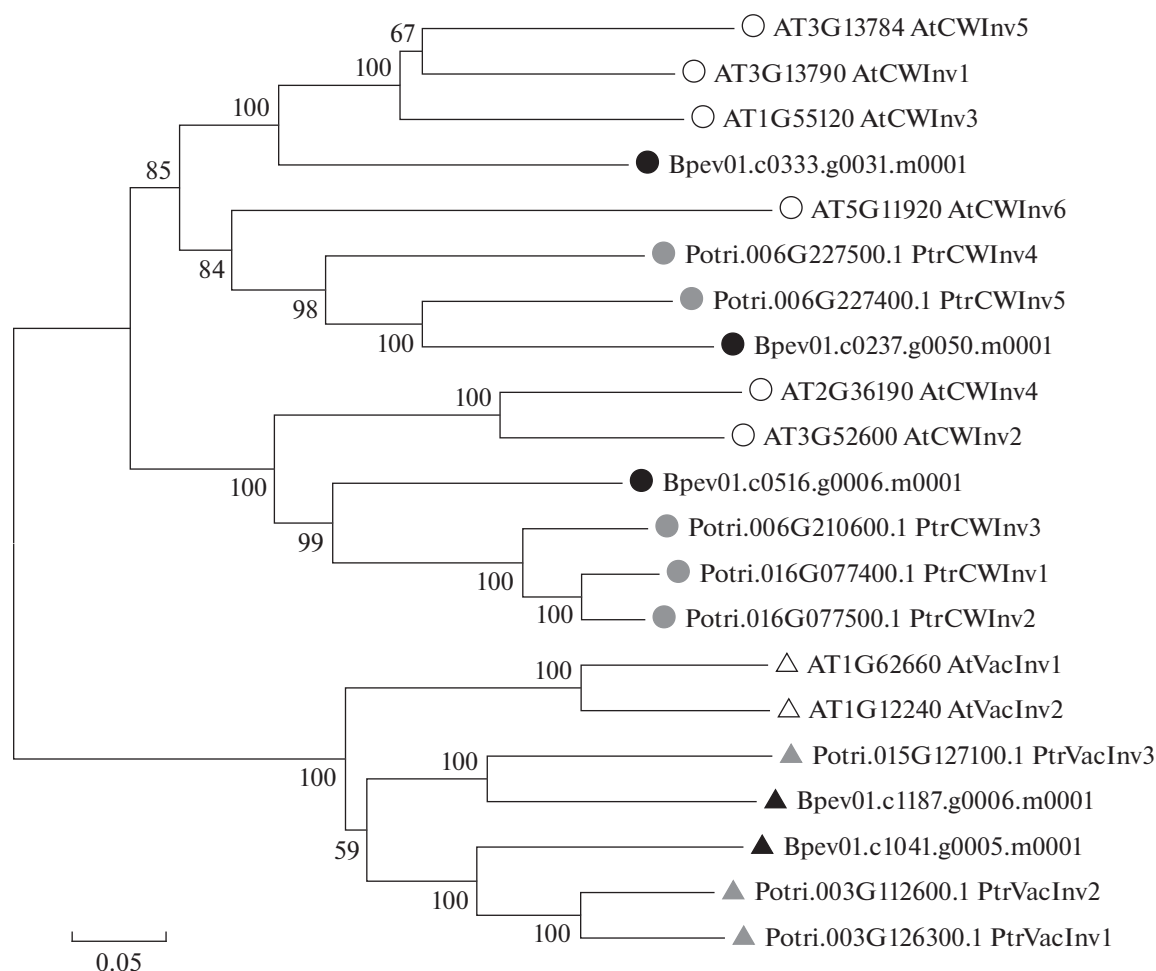


Рис. 3. Филогенетическое древо, построенное на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей (CDS) потенциальных генов *CWInv* *Betula pendula* и известных генов *CWInv* и *VacInv* *Arabidopsis* и *Populus*. Гены *Betula pendula* обозначены черным цветом, *Arabidopsis thaliana* – белым цветом, *Populus trichocarpa* – серым цветом. Длина ветвей пропорциональна генетической дистанции (число замещений на сайт). Существенные значения bootstrap (процент деревьев, в которых ассоциированные таксоны кластеризуются вместе) для 1000 выборок показаны в основании ветви.

нам *Bpev01.c0333.g0031*, *Bpev01.c0516.g0006* и *Bpev01.c0237.g0050*, кодирующим потенциальные АПИнв, были присвоены названия *BpCWInv1*, *BpCWInv2* и *BpCWInv3* соответственно (соответствуют *CWIN1.1*, *CWIN4*, *CWIN1* по Galibina et al., 2019b). По своей структуре и физическим свойствам предсказанные апопластные инвертазы березы повислой соответствовали апопластным инвертазам других растений (Дополнительные материалы, табл. Д2).

In silico анализ цис-элементов в промоторных областях генов

Исследование промоторных областей генов *SUS* и *CWInv* позволило выявить в их последовательностях ряд регуляторных элементов, как общих для нескольких промоторов, так и уникаль-

ных, т.е. встречающихся только в одной последовательности. В промоторах четырех генов *SUS* было выявлено 54 общих цис-элемента, в промоторах трех генов *CWInv* – 58 общих цис-элементов (рис. 4). Промотор гена *SUS1* содержал наибольшее количество уникальных элементов – 18. В промоторе *SUS3* было выявлено 14 уникальных мотивов, в промоторах *SUS2* и *SUS4* – по 4 уникальных цис-элемента (рис. 5). В промоторах генов *CWInv1*, *CWInv2* и *CWInv3* было выявлено 13, 15 и 13 уникальных элементов, соответственно (рис. 6).

С учетом опубликованных данных, содержащихся в базах данных NewPLACE (Higo et al., 1999) и PlantPAN 3.0 (Chow et al., 2019), все элементы были разделены на основании их функции на следующие группы: 1) тканеспецифичные элементы, 2) элементы, участвующие в гормональной регуляции, 3) элементы, участвующие в саха-

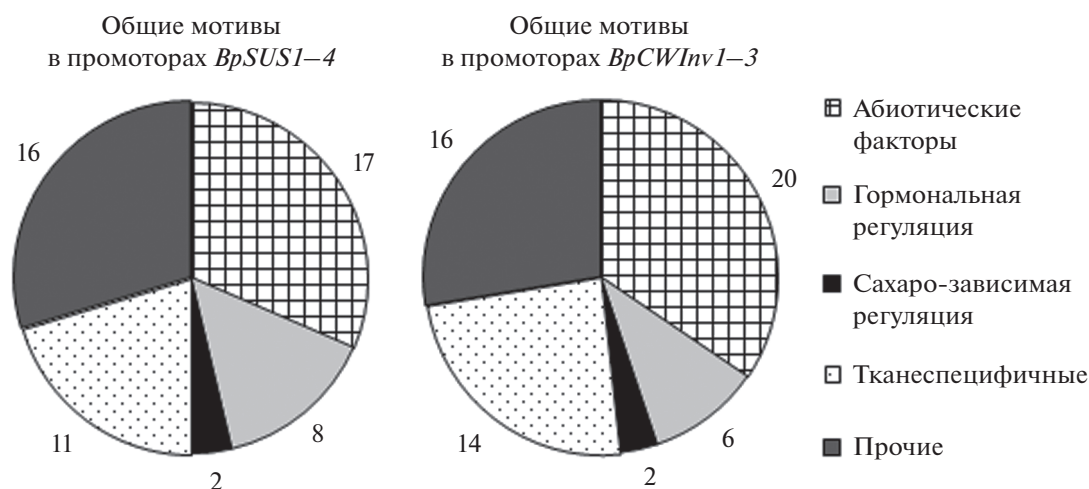


Рис. 4. Распределение общих мотивов в промоторах *BpSUS1–4* и *BpCWInv1–3* по группам в зависимости от функции. Числа обозначают количество цис-элементов в каждой группе.

ро-зависимой регуляции, 4) элементы, связанные с влиянием абиотических факторов, 5) прочие элементы (табл. 1).

Цис-элементы, связанные с влиянием абиотических факторов

In silico анализ регуляторных цис-элементов в 2 Кб промотора выявленных генов *SUS* и *CWInv* показал, что наиболее значительная группа (как по числу отдельных мотивов, так и по их встречаемости) была связана с действием различных абиотических факторов (табл. 1, рис. 4).

По количеству копий в промоторной области длиной 2 Кб у всех генов *SUS* и *CWInv*, в этой группе доминировали мотивы, связанные с реакцией на свет и недостаток влаги (GT1CONSENSUS, GATABOX, MYCCONSENSUSAT, ACGTATERD1 и др). Помимо них присутствовали элементы, связанные с регуляцией экспрессии повышенной и пониженной температурой, а также аноксией (RAV1AAT, LTRE1HVBLT49, CCAATBOX1, CURECORECR). В отличие от генов *SUS* в промоторах всех генов *CWInv* был выявлен элемент, участвующий в сигналинге фосфора (WBBOXPCWRKY1). Кроме того, в промоторах *CWInv* встречалось большее количество элементов, связанных с реакцией на аноксию (CURECORECR, ANAERO2CONSENSUS, ANAERO1CONSENSUS).

Наличие большого числа цис-элементов, участвующих в реакциях на различные абиотические стрессовые факторы в промоторах генов *SUS* и *CWInv*, согласуется с данными об участии сахаров в поддержании функций тканей древесных растений в условиях различных стрессов (Tomasella et al., 2019). Большое число идентичных мотивов,

связанных с воздействием света, водного и анаэробного стрессов и пониженной температуры, и близкие значения их встречаемости в промоторах генов из обеих групп позволяет предположить однонаправленное изменение уровня их экспрессии в ответ на действие этих факторов. Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о подавлении формирования узорчатой древесины у карельской березы при ее произрастании в условиях плохой освещенности, низкой температуры и недостатка влаги (Евдокимов, 1989; Новицкая, 2008).

Промоторы *SUS1* и *SUS3* содержали уникальные элементы, связанные с сигналингом фосфора (P1BS) и иона аммония (AMMORESIVDCRNIA1) (рис. 5). Мотив P1BS является сайтом связывания с ТФ phosphorus starvation response 1 (Psr1) и присутствует в промоторах генов, экспрессия которых специфически активируется дефицитом фосфора у различных растений (Sobkowiak et al., 2012). Выявленные ранее изменения активности СС у растений карельской березы, произрастающих на почвах, отличающихся по уровням доступного азота и фосфора, может быть обусловлено наличием данных цис-элементов в промоторах соответствующих генов (Galibina et al., 2016, 2019a; Moshchenskaya et al., 2016).

Цис-элементы, участвующие в тканеспецифичной экспрессии генов

Анализ экспрессии генов *SUS* у различных растений свидетельствует о том, что, несмотря на структурную и функциональную близость кодируемых ими белков, отдельные гены *SUS* демонстрируют выраженную тканеспецифичную экспрессию (Xu et al., 2019). Гены *CWInv* специфично

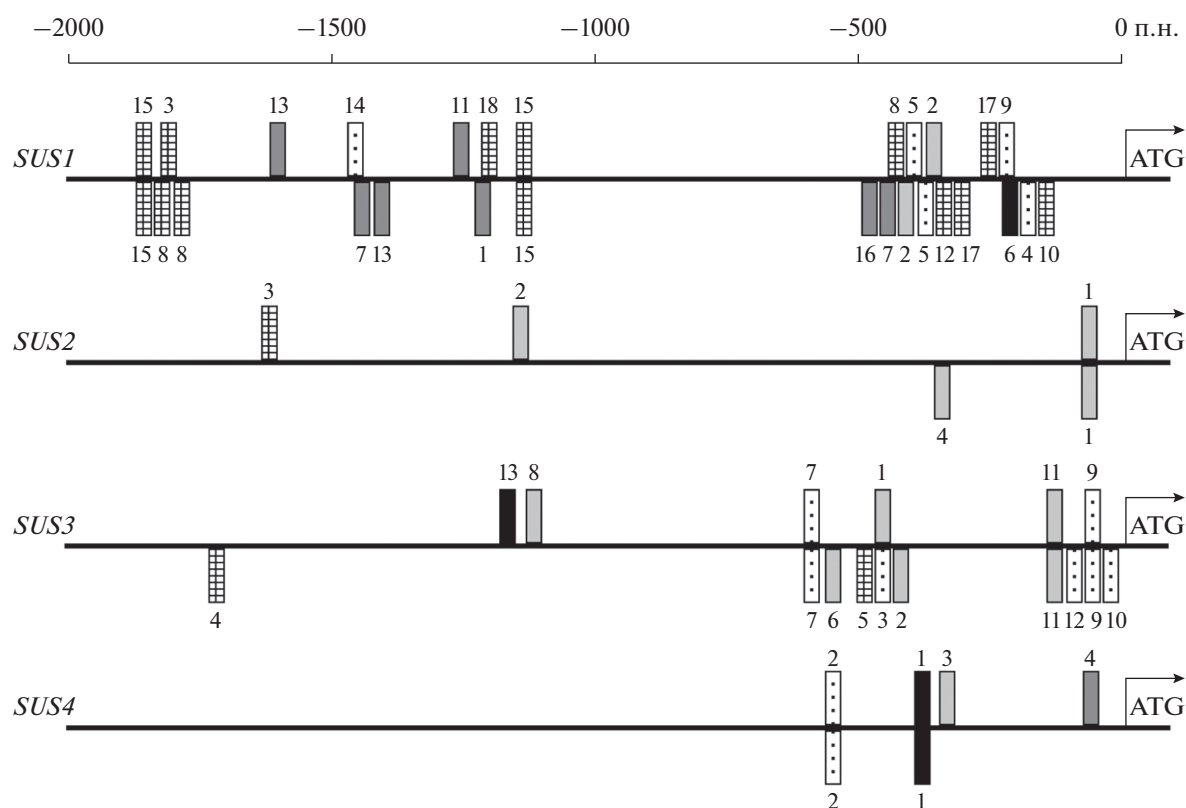


Рис. 5. Схема расположения уникальных *цис*-элементов в промоторах *BpSUS1–4*. Цветовые обозначения аналогичны рис. 3. Цифрами обозначены следующие элементы: *SUS1* 1 – 300CORE, 2 – ABRERATCAL, 3 – AT1BOX, 4 – BS1EGCCR, 5 – CACGTGMOTIF, 6 – CGACGOSAMY3, 7 – CTRMCAMV35S, 8 – HDZIP2ATATHB2, 9 – HEXAMERATH4, 10 – IBOXCORENT, 11 – INTRONLOWER, 12 – IRO2OS, 13 – MARARS, 14 – NAPINMOTIFBN, 15 – P1BS, 16 – QARBNEXTA, 17 – RAV1BAT, 18 – REBETALGLHCB21. *SUS2* 1 – CGCGBOXAT, 2 – PROXBBNAPA, 3 – SORLREP3AT, 4 – TATCCACHVAL21. *SUS3* 1 – ABRE3HVA22, 2 – ABREATCONSENSUS, 3 – ACGTOSGLUB1, 4 – AMMORESIVDCRNA1, 5 – BOXIIPCCHS, 6 – C2GMAUX28, 7 – CARGNCAT, 8 – GAREIOSREP1, 9 – RYREPEATGMGY2, 10 – RYREPEATLEGUMINBOX, 11 – RYREPEATVFLEB4, 12 – SPHCOREZMC1, 13 – SURE1STPAT21. *SUS4* 1 – ACGTABOX, 2 – ACGTCBOX, 3 – AGCBOXNPGLB, 4 – TATABOX1.

экспрессируются во флоэме акцепторных органов, в связи с чем высказывается мнение, что их появление связано с развитием транспортной системы высших сосудистых растений (Wan et al., 2018).

В промоторах обеих групп исследованных нами генов было выявлено большое количество различных *цис*-элементов, участвующих в тканеспецифичной экспрессии генов в семенах, корнях, мезофилле листа и пыльце (CAATBOX1, ROOTMOTIFTAPOX1, CACTFTPPCA1, GTGANTG10, POLLEN1LELAT52 и др.). Помимо общих для всех генов элементов, в промоторах отдельных генов *SUS* и *CWInv* встречались уникальные тканеспецифичные мотивы (рис. 5, рис. 6).

Большой интерес представляют уникальные мотивы, идентифицированные в промоторах генов *SUS1* и *CWInv3*, которые, согласно имеющимся данным, отличаются наибольшей актив-

ностью в дифференцирующей ксилеме березы (Moshchenskaya et al., 2017; Galibina et al., 2019b). В промоторе *SUS1* были выявлены два уникальных элемента HEXAMERATH4 и BS1EGCCR (рис. 5). HEXAMERATH4 присутствует в промоторе гена, кодирующего H4 гистон у *Arabidopsis*; этот мотив участвует в меристемоспецифической экспрессии данного гена (Chaubet et al., 1996). Элемент BS1EGCCR обнаружен в промоторе гена *CCR* и участвует в его специфической экспрессии в проводящих тканях ствола и корня эвкалипта (Lacombe et al., 2000). Можно предположить, что высокий уровень экспрессии *SUS1* в камбиальной зоне и дифференцирующихся проводящих тканях при реализации нормального сценария ксилогенеза березы повислой обусловлен наличием этих мотивов.

Промотор *CWInv3*, в отличие от двух других генов *CWInv*, не содержал уникальных элементов, связанных со специфической экспрессией в проводящих тканях ствола (рис. 6). Высокие по

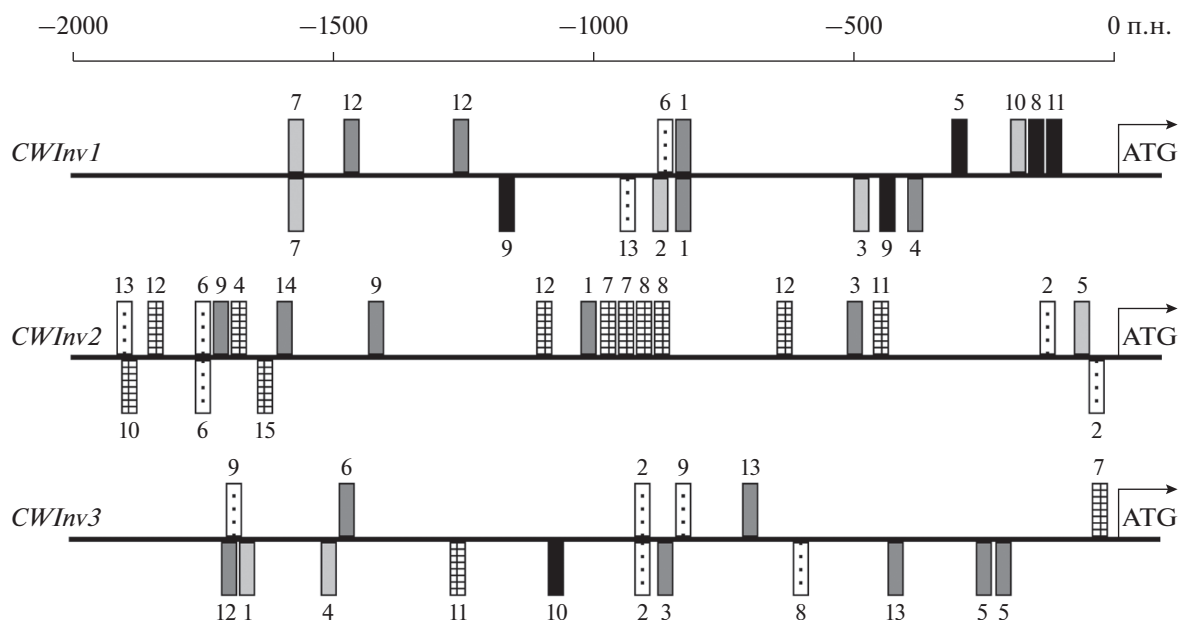


Рис. 6. Схема расположения уникальных *цис*-элементов в промоторах *BpCWInv1–3*. Цветовые обозначения аналогичны рис. 3. Цифрами обозначены следующие элементы: *CWInv1* 1 – ACGTTBOX, 2 – ARFAT, 3 – AUXREPSIAA4, 4 – BOXLCOREDCPAL, 5 – CGACGOSAMY3, 6 – MYBPLANT, 7 – RYREPEATVFLEB4, 8 – SREATMSD, 9 – SURE1STPAT21, 10 – TATCCACHVAL21, 11 – TATCCAYMOTIFOSRAMY3D, 12 – WBOXNTCHN48, 13 – XYLAT. *CWInv2* 1 – 300CORE, 2 – AACACOREOSGLUB1, 3 – AGMOTIFNTMYB2, 4 – ANAERO4CONSENSUS, 5 – ASF1MOTIFCAMV, 6 – CARGNCAT, 7 – CBFHV, 8 – DRECRTCOREAT, 9 – LECPLEACS2, 10 – PREATPRODH, 11 – RBCSCONSUSUS, 12 – REBETALGLHCB21, 13 – RGATAOS, 14 – SEBFCONSSTPR10A, 15 – SORLIP2AT. *CWInv3* 1 – ABRELATERD1, 2 – CARGATCONSENSUS, 3 – CTRMCAMV35S, 4 – GAREIOSREP1, 5 – MARABOX1, 6 – MRNASTA2CRPSBD, 7 – MYBATRD22, 8 – NAPINMOTIFBN, 9 – RHERPATEXPA7, 10 – SP8BFIBSP8BIB, 11 – SV40COREENHAN, 12 – T/GBOXATPIN2, 13 – TATABOX3.

сравнению с другими генами *CWInv* значения экспрессии данного гена в зоне дифференциации ксилемы березы могут быть вызваны наличием мотивов, участвующих в стабилизации мРНК (MRNASTA2CRPSBD) и усилении транскрипции (CTRMCAV35S), о чем свидетельствуют данные литературы (Nickelsen et al., 1999; Pauli et al., 2004). Высокая экспрессия гена *CWInv1* в дифференцирующей ксилеме березы может быть связана с наличием мотива XYLAT, идентифицированного в промоторах 52 генов *Arabidopsis*, демонстрирующих специфическую экспрессию во вторичной ксилеме (Ko et al., 2006). Промотор гена *CWInv2* содержал уникальный элемент, встречающийся у генов, экспрессия которых наблюдается преимущественно во флоэме (RGATAOS) (рис. 6).

Цис-элементы, участвующие в сигналинге гормонов

В группе элементов, принимающих участие в гормон-зависимой экспрессии, в промоторах *SUS* и *CWInv* по количеству копий доминировали мотив ARR1AT, являющийся сайтом связывания с цитокинин-зависимым ТФ ARR1 (Taniguchi et al., 2007), и мотив WRKY71OS, необходимый для по-

давления сигналинга гиббереллина (Zhang et al., 2004). Наличие этих двух *цис*-элементов характерно для промоторов генов, специфически активных в проводящих тканях (Zhang et al., 2014). Помимо этого, в промоторах всех генов *SUS* и *CWInv* были выявлены элементы, участвующие в трансдукции сигналов этилена (WBOXNTERF3). В отличие от промоторов генов *CWInv* промоторы *SUS* содержали большее количество мотивов, участвующих в сигналинге абсцизовой кислоты. Среди всех изученных генов, промоторы *SUS3* и *CWInv1* содержали наибольшее число уникальных *цис*-элементов, участвующих в сигналинге различных гормонов, что указывает на важную роль гормонов в их активации (рис. 5, рис. 6).

Ранее была высказана гипотеза, согласно которой формирование узорчатой древесины карельской березы индуцируется повышенным уровнем ауксина в тканях ствола (Щетинкин 1987). Поэтому среди элементов, связанных с гормон-зависимой регуляцией, особое внимание мы уделяли мотивам, участвующим в сигналинге ауксина. Мотив ARFAT, обнаруженный в промоторах всех *SUS*, присутствует в промоторах ранних ауксин-зависимых генов и является сайтом связывания с ТФ семейства ARF (Hagen,

Таблица 2. Список перепредставленных сайтов связывания с ТФ в промоторах генов *Bp SUS1–SUS2* и *Bp CWInv1–CWInv3*

Семейство ТФ	Проторы <i>SUS1–SUS2</i>	Промоторы <i>CWInv1–CWInv3</i>
DOF	DOF1.5 (AT1G29160) DOF1.7 (AT1G51700) DOF1.10 (AT1G69570) DOF2.2 (AT2G28810) DOF3.2 (AT3G45610) DOF3.6 (AT3G55370) DOF5.1 (AT5G02460)	DOF1.5 (AT1G29160) DOF1.7 (AT1G51700) DOF1.8 (AT1G64620) DOF1.10 (AT1G69570) DOF2.2 (AT2G28810) DOF3.2 (AT3G45610) DOF3.4 (AT3G50410) DOF3.6 (AT3G55370) DOF4.2 (AT4G21030) DOF4.7 (AT4G38000) DOF5.1 (AT5G02460) DOF5.6 (AT5G62940) DOF5.8 (AT5G66940)
MYB	MYB15 (AT3G23250) MYB17 (AT3G61250) MYB31 (AT1G74650) MYB55 (AT4G01680) MYB84 (AT3G49690) MYB96 (AT5G62470)	
BBR-BPC	BPC1 (AT2G01930) BPC5 (AT4G38910) BPC6 (AT5G42520)	
MIKC MADS	SVP (AT2G22540) SOC1 (AT4G18960) AGL20 (AT2G45660)	AGL20 (AT2G45660)
TCP	TCP1 (AT1G67260) TCP20 (AT3G27010)	
CPP		TSO1 (AT3G22780) TCX6 (AT2G20110)
ERF	ERF005 (AT5G25390)	ERF122 (AT5G67000)
bHLH	bHLH34 (AT3G23210)	
C2H2	TFIIIA (AT1G72050)	
AP2	BBM (AT5G17430)	BBM (AT5G17430)
B3	RTV1 (AT1G49480)	RTV1 (AT1G49480)
GRAS	RGA1 (AT2G01570)	RGA1 (AT2G01570)
GATA		GATA1 (AT3G24050)
NAC	NAC094 (AT5G39820)	

Guilfoyle 2002; Tiwari et al., 2003). При низком уровне ауксина в клетке ARF формируют гетеродимер с белками-репрессорами Aux/IAA, что блокирует экспрессию ауксин-зависимых генов. При повышении уровня ауксина в клетке происходит протеолиз Aux/IAA, и после снятия репрессии ARF обеспечивают транскрипцию ауксин-зависимых генов (Li et al., 2016). Помимо элемента ARFAT в промоторах *SUS* были выявлены и другие элементы, участвующие в ауксин-индуцируемой экспрессии (ASF1MOTIFCAMV, C2GMAUX28, CATATGGMSAUR, NTBBF1ARROLB). Из сказанного следует, что повышение концентрации ауксина в камбиальной зоне березы должно способствовать увеличению уровня экспрессии *SUS* и, следовательно, формированию обычной по строению древесины.

В свою очередь, в промоторах генов *CWInv* (за исключением *CWInv1*) элементы, участвующие в трансдукции ауксинового сигнала, были обнаружены в незначительном количестве, что свидетельствует об ограничении участия гормона в регуляции транскрипции этих генов. Это находится в соответствии с результатами наших исследований, согласно которым развитие структурных аномалий древесины карельской березы происходит при высоких уровнях экспрессии *CWInv* на фоне интенсивной инактивации ауксина (Novitskaya et al., 2020).

Регуляторные цис-элементы, участвующие в сигналинге сахаров

В настоящий момент установлено, что сахара играют роль сигнальных молекул и воздействуют на экспрессию сахарочувствительных генов (Koch, 2004; Horacio, Martinez-Noel, 2013; Lastdrager et al., 2014). Высказываются предположения о том, что ферменты метаболизации сахарозы участвуют в переключении между сахарозным и глюкозным сигналингом (Ruan et al., 2010; Ruan, 2012, 2014). Так, например, высокая активность АпИнв во флоэме может через глюкозный сигналинг стимулировать деление клеток и подавлять программируемую клеточную смерть (Wang, Ruan, 2013). В свою очередь, экспрессия генов сахарозсинтазы и инвертазы также регулируется в зависимости от уровня сахаров (Li et al., 2017).

В промоторах всех исследованных генов присутствовал ряд цис-элементов, связанных с сигналингом сахаров. Общим для всех последовательностей был мотив WBOXHVISO1, являющийся сайтом связывания с ТФ семейства WRKY SUSIBA2. Мотив WBOXHVISO1 был идентифицирован в промоторах генов сахарозсинтазы, инвертазы и переносчиков сахаров у различных организмов, в том числе древесных (Afoufa-Bastien et al., 2010;

Rabot et al., 2014; Li et al., 2015; Qian et al., 2018). На примере овса показано, что при высоком уровне сахаров SUSIBA2 связывается с мотивом WBOXHVISO1 и работает как усилитель транскрипции сахарочувствительных генов (Sun et al., 2003). Экспериментально установлено, что присутствие элемента WBOXHVISO1 критично для индукции экспрессии генов вакуолярной инвертазы розы *Rosa hybrida* (*RhV1*) и чая *Camellia sinensis* (*CsINV5*) в присутствии сахарозы (Rabot et al., 2014; Qian et al., 2018). Сравнительный анализ промоторов гена, кодирующего переносчик сахаров *CITST2*, у 124 культиваров арбуза и колоцинта показал, что однонуклеотидная замена А/С в мотиве WBOXHVISO1 приводит к нарушению связывания ТФ SUSIWM1 (гомолог SUSIBA2) с промотором исследованного гена, результатом чего является более слабая экспрессия *CITST2* и более низкое содержание сахаров в плодах несладких культиваров (Ren et al., 2018). Примечательно, что у березы встречаемость данного элемента была выше в промоторах генов *CWInv* (2–6 шт. на 2 Кб) по сравнению с генами *SUS* (1–3 шт.). Кроме того, в промоторах всех генов *CWInv* присутствовал элемент TATCCAOSAMY, являющийся сайтом связывания с MYB ТФ и участвующий в активации гена альфа-амилазы риса (кодирует фермент, расщепляющий крахмал до простых сахаров) в условиях недостатка сахаров, особенно глюкозы (Lu et al., 2002). Этот мотив мы выявили в промоторах 3 из 4 генов *SUS* (*BpSUS1*, *BpSUS2*, *BpSUS3*).

Помимо различных цис-элементов, участвующих в позитивной регуляции экспрессии генов в ответ на сахара, были выявлены также элементы негативной регуляции. В промоторах всех генов *SUS* березы присутствовал мотив SREATMSD, идентифицированный у 272 из 1592 генов *Arabidopsis*, экспрессия которых подавляется в присутствии больших количеств глюкозы (Tatematsu et al., 2005). Из всех генов *CWInv* этот элемент присутствовал только в промоторе *CWInv1* (рис. 6). Встречаемость этого элемента в промоторах исследованных генов была низкой — от 1 до 3 копий. Промотор гена вакуолярной инвертазы картофеля *StvacINV1*, экспрессия которого существенно снижается в присутствии высоких концентраций глюкозы и фруктозы, содержит 9 копий элемента SREATMSD, из них 7 копий расположены на участке от –360 до –524 п.н. (Ou et al., 2013). Кроме того, в промоторах всех исследованных генов березы, за исключением *SUS3* и *CWInv2*, были идентифицированы мотивы PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A и MYBGANV. Известно, что наличие этих двух мотивов критично для подавления экспрессии гена альфа-амилазы риса при высоких концентрациях сахарозы (Morita et al., 1998).

Полученные результаты согласуются с полученными нами данными, согласно которым формирование узорчатой древесины карельской березы обусловлено локальным повышением уровня сахарозы в камбиальной зоне (Novitskaya, Kushnir, 2006; Novitskaya et al., 2016a, 2016b). У карельской березы узорчатые и безузорчатые участки одного и того же ствола существенно различаются по уровню экспрессии *SUS* и *CWInv* (Moshchenskaya et al., 2017; Galibina et al., 2019b). Мы полагаем, что позитивные и негативные элементы сигналинга сахаров участвуют в тонкой регуляции экспрессии генов *SUS* и *CWInv* березы в условиях локального повышения уровня сахарозы и/или отношения уровня сахарозы к уровню моносахаров. Однако для установления роли элементов сигналинга сахаров в процессе формирования узорчатой древесины карельской березы необходимы дальнейшие исследования.

In silico анализ перепредставленных сайтов связывания с транскрипционными факторами

С целью выявления ТФ, потенциально участвующих в регуляции углеводного обмена при нормальном и аномальном сценариях ксилогенеза березы, мы проанализировали перепредставленные сайты связывания ТФ в промоторах генов *SUS1–SUS2* и *CWInv1–CWInv3*, экспрессия которых существенно изменяется в процессе формирования узорчатой древесины у карельской березы (Moshchenskaya et al., 2017; Galibina et al., 2019b). В промоторах двух генов *SUS* и трех генов *CWInv* были идентифицированы перепредставленные сайты связывания с 28 и 21 ТФ соответственно (табл. 2). Наибольшее число выявленных ТФ принадлежало к семействам DOF (13 шт.) и MYB (6 шт.). При этом сайты связывания с ТФ семейства MYB были выявлены только в промоторах генов *SUS*, тогда как для промоторов *CWInv* было характерно большое число сайтов связывания с различными ТФ семейства DOF.

Исходя из данных литературы, среди выявленных ТФ наибольший интерес с точки зрения участия в регуляции альтернативных сценариев ксилогенеза представляют DOF5.6 (HCA2) и DOF5.8. Установлено, что ТФ HCA2 играет важную роль в регуляции камбиальной активности и дифференциации камбиальных производных. Сверхэкспрессия *HCA2* у *A. thaliana* приводит к увеличению камбиальной активности, усилению экспрессии флоэмоспецифичных генов и подавлению ксилемоспецифичных генов (Guo et al., 2009). ТФ DOF5.8 участвует в регуляции морфогенеза проводящих тканей листа *A. thaliana*; экспрессия кодирующего его гена модулируется ауксином (Konishi, Yanagisawa, 2015). До настоящего времени ТФ

семейства DOF у березы повислой не исследовались.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В геноме березы повислой были идентифицированы 4 гена *SUS* и 3 гена *CWInv*. *In silico* анализ регуляторных *cis*-элементов в промоторах генов, кодирующих ферменты метаболизации сахарозы, позволил выявить ряд мотивов, участвующих в регуляции экспрессии исследованных генов. Наибольшей как по числу отдельных элементов, так и по их встречаемости в 2 Кб промоторной области генов была группа элементов, связанная с влиянием различных абиотических факторов, в основном, света и недостатка влаги. Также промоторы исследованных генов содержали большое количество тканеспецифичных мотивов. Анализ гормон-зависимых элементов показал, что экспрессия генов *CWInv*, играющих важную роль в формировании узорчатой древесины карельской березы, слабо регулируется уровнем ауксина, что согласуется с нашими данными об активной конъюгации гормона в присутствии высоких концентраций сахарозы. В исследованных последовательностях промоторов были выявлены различные элементы, указывающие на непосредственное влияние сигналинга сахаров.

На основе анализа перепредставленных сайтов связывания с ТФ и сопоставления полученных результатов с литературными данными были выявлены два наиболее вероятных кандидата, потенциально участвующих в регуляции углеводного метаболизма в тканях ствола березы — ТФ DOF5.6 (HCA2) и DOF5.8. ТФ семейства DOF не описаны у березы повислой; их идентификация и функциональная характеристика представляют интерес с точки зрения регуляции альтернативных сценариев ксилогенеза у форм березы повислой, отличающихся по текстуре древесины.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (Институт леса КарНЦ РАН) и при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-04-00622_а).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Автор Т.В. Тарелкина провела исследования методами биоинформатики. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и в написании текста статьи.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Таблица Д1. Характеристика потенциальных белков SUS березы повислой.

Таблица Д2. Характеристика потенциальных белков CWI_{inv} березы повислой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Евдокимов А.П. Биология и культура карельской березы. Ленинград: Изд-во Ленинградского университета, 1989. 228 с.
- Ермаков В.И. Механизмы адаптации березы к условиям Севера. Ленинград: Наука, 1986. 144 с.
- Любавская А.Я. Карельская береза. М.: Лесная промышленность, 1978. 158 с.
- Новицкая Л.Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.
- Соколов Н.О. Отбор и выращивание березы карельской в Ленинградской области с использованием самосева / Лесная генетика, селекция и семеноводство. Петрозаводск: Карелия, 1970. с. 277–281.
- Щетинкин С.В. Гистогенез узорчатой древесины березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl. и *Betula pendula* Roth): Дис. ... канд. биол. наук. Воронеж: ВГУ, 1987. 169 с.
- Afoufa-Bastien D., Medici A., Jeauffre J. et al. The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and microarray expression profiling // BMC Plant Biol. 2010. V. 10. P. 245–266.
- An X., Chen Z., Wang J. et al. Identification and characterization of the *Populus* sucrose synthase gene family // Gene. 2014. V. 539. P. 58–67.
- Artimo P., Jonnalagedda M., Arnold K. et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. P. W597–W603.
- Biłas R., Szafran K., Hnatuszko-Konka K. et al. Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2016. V. 127. P. 269–287.
- Chang J.-C., Liao Y.-C., Yang C.-C. et al. The purine-rich DNA-binding protein OsPurα participates in the regulation of the rice *sucrose synthase 1* gene expression // Physiol. Plant. 2011. V. 143. P. 219–234.
- Chaubet N., Flenet M., Clement B. et al. Identification of cis-elements regulating the expression of an *Arabidopsis* histone H4 gene // The Plant Journal. 1996. V. 10. P. 425–435.
- Chen Z., Gao K., Su X. et al. Genome-wide identification of the invertase gene family in *Populus* // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0138540.
- Chow C.-N., Lee T.-Y., Hung Y.-C. et al. PlantPAN3.0: a new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from ChIP-seq experiments in plants // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. P. D1155–D1163.
- Coleman H.D., Yan J., Mansfield S.D. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure // PNAS. 2009. V. 106. P. 13118–13123.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
- Galibina N.A., Novitskaya L.L., Krasavina M.S. et al. Invertase activity in trunk tissues of Karelian birch // Russ. J. Plant Physiol. 2015a. V. 62. P. 753–760.
- Galibina N.A., Novitskaya L.L., Krasavina M.S. et al. Activity of sucrose synthase in trunk tissues of Karelian birch during cambial growth // Russ. J. Plant Physiol. 2015b. V. 62. P. 381–389.
- Galibina N.A., Novitskaya L.L., Nikerova K.M. et al. Labile nitrogen availability in soil influences the expression of wood pattern in Karelian birch // Ботанический журнал. 2019a. Т. 104. С. 1598–1609.
- Galibina N.A., Novitskaya L.L., Nikerova K.M. et al. Apoplastic invertase activity regulation in the cambial zone of Karelian Birch // Russ. J. Dev. Biol. 2019b. V. 50. P. 20–29.
- Galibina N.A., Novitskaya L.L., Nikerova K.M. Excess of exogenous nitrates inhibits formation of abnormal wood in the Karelian birch // Russ. J. Dev. Biol. 2016. V. 47. P. 69–76.
- Galkin A.P., Lioshina L.G., Medvedeva T.V. et al. Regulatory regions of plant genes promoters and proteins-regulators of promotive activity // Biopolymers and Cell. 2004. V. 20. P. 363–379.
- Guo Y., Qin G., Gu H. et al. Dof5.6/HCA2, a Dof transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 3518–3534.
- Hagen G., Guilfoyle T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors // Plant Mol. Biol. 2002. V. 49. P. 373–385.
- Haggqvist R., Mikkola A. Visakoivun kasvatus ja käyttö. Hämeenlinna: Metsäkustannus & Visaseurary, 2008. 168 p.
- Hauch S., Magel E. Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of *Robinia pseudoacacia* L. are related to cambial wood production and heartwood formation // Planta. 1998. V. 207. P. 266–274.
- Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M. et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. P. 297–300.
- Hintikka T.J. Visakoivusta ja niiden anatomista. Helsinki: Suomalaisen kirjallisuuden seuran kirjapainon Oy, 1941. 346 p.
- Horacio P., Martinez-Noel G. Sucrose signaling in plants: A world yet to be explored // Plant Signal Behav. 2013. V. 8. P. e23316.
- Hyun T.K., Eom S.H., Kim J.S. Genomic analysis and gene structure of the two invertase families in the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) // Plant Omics. 2011. V. 4. P. 391–399.

- Islam M.Z., Hu X.-M., Jin L.-F. et al. Genome-wide identification and expression profile analysis of *Citrus* sucrose synthase genes: investigation of possible roles in the regulation of sugar accumulation // PLoS One. 2014. V. 9. P. e113623.
- Ko J.-H., Beers E.P., Han K.-H. Global comparative transcriptome analysis identifies gene network regulating secondary xylem development in *Arabidopsis thaliana* // Molecular Genetics and Genomics. 2006. V. 276. P. 517–531.
- Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // Curr. Opin. Plant Biol. 2004. V. 7. P. 235–246.
- Konishi M., Yanagisawa S. Transcriptional repression caused by Dof5.8 is involved in proper vein network formation in *Arabidopsis thaliana* leaves // J. Plant Res. 2015. V. 128. P. 643–652.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Lacombe E., Van Doorselaere J., Boerjan W. et al. Characterization of cis-elements required for vascular expression of the Cinnamoyl CoA Reductase gene and for protein-DNA complex formation // The Plant Journal. 2000. V. 23. P. 663–676.
- Lastdrager J., Hanson J., Smeekens S. Sugar signals and the control of plant growth and development // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 799–807.
- Li F., Hao C., Yan L. et al. Gene structure, phylogeny and expression profile of the sucrose synthase gene family in cacao (*Theobroma cacao* L.) // Journal of Genetics. 2015. V. 94. P. 461–472.
- Li J., Wu L., Foster R. et al. Molecular regulation of sucrose catabolism and sugar transport for development, defence and phloem function // J. Integr. Plant Biol. 2017. V. 59. P. 322–335.
- Li S.-B., Xie Z.-Z., Hu C.-G. et al. A review of auxin response factors (ARFs) in plants // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 47.
- Li X., Wu H.X., Southerton S.G. Identification of putative candidate genes for juvenile wood density in *Pinus radiata* // Tree Physiol. 2012. V. 32. P. 1046–1057.
- Lu C.-A., Ho T.D., Ho S.-L. et al. Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of α -amylase gene expression // The Plant Cell. 2002. V. 14. P. 1963–1980.
- Marchler-Bauer A., Bryant S.H. CD-Search: protein domain annotations on the fly // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. W327–W331.
- Morita A., Umemura T., Kuroyanagi M. et al. Functional dissection of a sugar-repressed α -amylase gene (*RAmy1A*) promoter in rice embryos // FEBS Letters. 1998. V. 423. P. 81–85.
- Moshchenskaya Y., Galibina N., Nikerova K. et al. Activity of sucrose dissimilating enzymes in early ontogeny in different forms of silver birch // Transactions of the KarRC RAS. 2016. № 11. P. 78–87.
- Moshchenskaya Yu.L., Galibina N.A., Novitskaya L.L. et al. The role of sucrose synthase in sink organs of woody plants // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 10–21.
- Moshchenskaya Yu.L., Galibina N.A., Topchieva L.V. et al. Expression of genes encoding sucrose synthase isoforms during anomalous xylogenesis in Karelian birch // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 616–624.
- Nickelsen J., Fleischmann M., Boudreau E. et al. Identification of cis-acting RNA leader elements required for chloroplast *psbD* gene expression in *Chlamydomonas* // The Plant Cell. 1999. V. 11. P. 957–970.
- Novitskaya L., Nikolaeva N., Galibina N. et al. The greatest density of parenchyma inclusions in Karelian birch wood occurs at confluences of phloem flows // Silva Fenn. 2016a. V. 50. P. 1461–1478.
- Novitskaya L., Nikolaeva N., Tarelkina T. Endogenous variability of the figured wood of Karelian birch // Wulfenia. 2016b. V. 23. P. 175–188.
- Novitskaya L.L., Kushnir F.V. The role of sucrose in regulation of trunk tissue development in *Betula pendula* Roth // J. Plant Growth Regul. 2006. V. 25. P. 18–29.
- Novitskaya L.L., Tarelkina T.V., Galibina N.A. et al. The formation of structural abnormalities in Karelian birch wood is associated with auxin inactivation and disrupted basipetal auxin transport // J. Plant Growth Regul. 2020. V. 39. P. 378–394.
- Ou Y., Song B., Liu X. et al. Promoter regions of potato vacuolar invertase gene in response to sugars and hormones // Plant Physiol. Biochem. 2013. V. 69. P. 9–16.
- Pauli S., Rothnie H.M., Chen G. et al. The cauliflower mosaic virus 35S promoter extends into the transcribed region // Journal of Virology. 2004. V. 78. P. 12120–12128.
- Priest H.D., Filichkin S.A., Mockler T.C. cis-Regulatory elements in plant cell signaling // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 643–649.
- Proels R.K., Hause B., Berger S. et al. Novel mode of hormone induction of tandem tomato invertase genes in floral tissues // Plant Molecular Biology. 2003. V. 52. P. 191–201.
- Proels R.K., Roitsch T. Extracellular invertase LIN6 of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 1555–1567.
- Qian W., Yue C., Wang Y. et al. Identification of the invertase gene family (*INVs*) in tea plant and their expression analysis under abiotic stress // Plant Cell Reports. 2016. V. 35. P. 2269–2283.
- Qian W., Xiao B., Wang L. et al. *CsINV5*, a tea vacuolar invertase gene enhances cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* // BMC Plant Biology. 2018. V. 18. P. 228–248.
- Rabot A., Portemer V., Péron T. et al. Interplay of sugar, light and gibberellins in expression of *Rosa hybrida* vacuolar invertase 1 regulation // Plant and Cell Physiology. 2014. V. 55. P. 1734–1748.
- Ren Y., Guo Sh., Zhang J. et al. A tonoplast sugar transporter underlies a sugar accumulation QTL in watermelon // Plant Physiol. 2018. V. 176. P. 836–850.
- Roach M., Arrivault S., Mahboubi A. et al. Spatially resolved metabolic analysis reveals a central role for transcriptional control in carbon allocation to wood // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. P. 3529–3539.

- Roitsch T. Source-sink regulation by sugar and stress // Curr. Opin. Plant Biol. 1999. V. 2. P. 198–206.
- Ruan Y.-L. Signaling role of sucrose metabolism in development // Molecular Plant. 2012. V. 5. P. 763–765.
- Ruan Y.-L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling // Annu. Rev. Plant Biol. 2014. V. 65. P. 33–67.
- Ruan Y.-L., Jin Y., Yang Y.-J. et al. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat // Molecular Plant. 2010. V. 3. P. 942–955.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406–425.
- Salojärvi J., Smolander O.-P., Nieminen K. et al. Genome sequencing and population genomic analyses provide insights into the adaptive landscape of silver birch // Nature Genetics. 2017. V. 49. P. 904–912.
- Sauter J.J. Photosynthate allocation to the vascular cambium: facts and problems / Cell and Molecular Biology of Wood Formation. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 2000. p. 71–83.
- Sheshadri S.A., Nishanth M.J., Harita N. et al. Comparative genome based *cis*- elements analysis in the 5' upstream and 3' downstream region of cell wall invertase and Phenylalanine ammonia lyase in *Nicotiana benthamiana* // Comput. Biol. Chem. 2018. V. 72. P. 181–191.
- Sobkowiak L., Bielewicz D., Malecka E.M. et al. The role of the P1BS element containing promoter-driven genes in Pi transport and homeostasis in plants // Front. Plant Sci. 2012. V. 3. P. 58.
- Stein O., Granot D. An overview of sucrose synthases in plants // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 95.
- Sun C., Palmqvist S., Olsson H. et al. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter // The Plant Cell. 2003. V. 15. P. 2076–2092.
- Sung S.S., Kormanik P.P., Black C.C. Vascular cambial sucrose metabolism and growth in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) in relation to transplanting stress // Tree Physiol. 1993. V. 12. P. 243–258.
- Sung S.S., Kormanik P.P., Black C.C. Temporal and spatial aspects of root and stem sucrose metabolism in loblolly pine trees // Tree Physiol. 1996. V. 16. P. 1003–1008.
- Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // PNAS. 2004. V. 101. P. 11030–11035.
- Taniguchi M., Sasaki N., Tsuge T. et al. ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions // Plant and Cell Physiol. 2007. V. 48. P. 263–277.
- Tatematsu K., Ward S., Leyser O. et al. Identification of *cis*-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2005. V. 138. P. 757–766.
- Tian F., Yang D.C., Meng Y.Q. et al. PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants // Nucleic Acids Res. 2020. V. 48. P. D1104–D1113.
- Tiwari S.B., Hagen G., Guilfoyle T. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription // The Plant Cell. 2003. V. 15. P. 533–543.
- Tomasella M., Petrussa E., Petruzzellis F. et al. The possible role of non-structural carbohydrates in the regulation of tree hydraulics // IJMS. 2019. V. 21. P. 144–165.
- Tong X.L., Wang Z.Y., Ma B.Q. et al. Structure and expression analysis of the sucrose synthase gene family in apple // J. Integrat. Agric. 2018. V. 17. P. 847–856.
- Wan H., Wu L., Yang Y. et al. Evolution of sucrose metabolism: the dichotomy of invertases and beyond // Trends Plant Sci. 2018. V. 23. P. 163–177.
- Wang L., Ruan Y.-L. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 163.
- Xu X., Yang Y., Liu C. et al. The evolutionary history of the sucrose synthase gene family in higher plants // BMC Plant Biology. 2019. V. 19. P. 566–579.
- Zhang C., Yu M., Ma R. et al. Structure, expression profile, and evolution of the sucrose synthase gene family in peach (*Prunus persica*) // Acta Physiol. Plant. 2015. V. 37. P. 81–96.
- Zhang L., Yang T., Li X. et al. Cloning and characterization of a novel Athspr promoter specifically active in vascular tissue // Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 78. P. 88–96.
- Zhang Z.-L., Xie Z., Zou X. et al. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 1500–1513.
- Zhu X., Wang M., Li X. et al. Genome-wide analysis of the sucrose synthase gene family in grape (*Vitis vinifera*): structure, evolution, and expression profiles // Genes. 2017. V. 8. P. 111–135.

***In silico* Analysis of Regulatory *cis*-Elements in the Promoters of Genes Coding Apoplastic Invertase and Sucrose Synthase in Silver Birch**

T. V. Tarelkina^{1,*}, N. A. Galibina¹, Yu. L. Moshchenskaya¹, and L. L. Novitskaya¹

¹Forest Research Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia

*e-mail: karelina.t.v@gmail.com

This work is a continuation of studies on the role of sucrose in the formation of figured wood of Karelian birch (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Merckl.) Hämet-Ahti). It was previously established that this type of xy-

logenesis is accompanied by significant changes in activity of sucrose metabolizing enzymes, sucrose synthase and invertase, in the birch trunk tissues. The results of molecular genetic analysis indicate that the activity of these enzymes is regulated mainly at the level of transcription of the genes encoding them (*SUS* and *CWInv*). We identified genes encoding sucrose synthase and cell wall invertase in the genome of silver birch. *In silico* analysis of the regulatory *cis*-elements present in the 2 kb promoter region of these genes revealed a number of motifs involved in the regulation of their expression. The largest both in the number of individual elements and in their occurrence was a group of elements associated with the influence of abiotic factors, mainly light and drought. A number of tissue-specific motifs were identified, the function of which is associated with gene expression in conducting tissues. Analysis of hormone-dependent elements showed that the formation of figured wood of Karelian birch, which occurs against the background of high apoplastic invertase activity, is obviously not associated with the activation of *CWInv* genes by a high level of auxin. In the studied promoter sequences, various elements were found indicating a direct effect of sugar signaling. The two most likely candidates for participation in the regulation of carbohydrate metabolism in the birch trunk tissues were identified – transcription factors (TF) DOF5.6 (HCA2) and DOF5.8. The identification and functional characteristics of the DOF family TFs of silver birch are of interest from the point of view of the regulation of alternative xylogenesis scenarios.

Keywords: sucrose synthase, cell wall invertase, abiotic stress, sugar signaling, auxin-dependent gene expression, silver birch