

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

УДК 611.013.1/2.

№ НИОКР 01201351276

№ ИС ГЗ 0108-2014-0005



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
Член-корреспондент РАН
А.В. Васильев

«27» января 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ТЕМА 5. РЕГУЛЯЦИЯ ООГЕНЕЗА, СПЕРМАТОГЕНЕЗА, ОПЛОДОТВОРЕНИЯ И РАННИХ
ЭТАПОВ РАЗВИТИЯ У ПОЗВОНОЧНЫХ

(заключительный отчет)




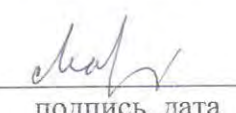
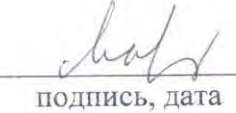




Руководитель темы, д.б.н., г.н.с.

С.Г. Васецкий

подпись, дата

Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, д-р биологических наук	 _____	С.Г. Васецкий (введение, раздел 4 заключение)
Ведущие исполнители темы: Доктор биол. наук	 _____	Н.Ф. Гончаров (раздел 1)
Кандидат биол. наук	 _____	А.А. Минин (раздел 2)
Кандидат биол. наук	 _____	Т.Л. Маршак (раздел 3)
Кандидат биол. наук	 _____	Т.Л. Маршак (раздел 4)
Кандидат биол. наук	 _____	А.Ю. Кулибин (раздел 5)
Кандидат биол. наук	 _____	А.С. Грунина (раздел 6)
Доктор биол. наук	 _____	О.Ф. Гордеева (раздел 7)
Кандидат биол. наук	 _____	М.Н. Семенова (раздел 8)

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	5
Определения, обозначения и сокращения	6
Введение	7
Раздел 1. Регуляторные механизмы формирования половых клеток и ранних стадий зародышевого развития у позвоночных животных	11
1.1. Введение	11
1.2. Материалы и методы	14
1.3. Результаты	15
1.3.1. Опыты по искусственному размножению атлантического осетра	15
1.3.2. Индукция овуляции ооцитов атлантического осетра <i>in vitro</i> под влиянием прогестерона	20
1.3.3. Влияние концентрации бикарбоната натрия на скорость созревания ооцитов <i>in vitro</i> под влиянием прогестерона.	20
1.3.4. Определение зависимости продолжительности деления дробления (τ_0) от температуры у адриатического осетра	21
1.4. Публикации по теме	22
1.5. Цитируемая литература	22
Раздел 2. Изучение сигнальных процессов созревания, овуляции и активации яйца рыб	25
2.1. Введение	25
2.2. Исследования на вьюне	26
2.2.1. Материалы и методы	26
2.2.2. Результаты	27
2.3. Исследования на Данио рерио	28
2.3.1. Материалы и методы	28
2.3.2. Результаты	30
2.4. Публикации по теме	32
2.5. Список цитированной литературы	32
Раздел 3-4. Сравнительное и экспериментальное изучение сперматогенеза: цитогенетика, возрастные изменения, межклеточные взаимодействия. Изучение механизмов регенерации сперматогенного эпителия	35
3-4.1. Результаты	35
3-4.2. Публикации по теме	37
Раздел 5. Изучение регенерационных свойств клеток Сертоли взрослых животных	40
5.1. Введение	40

5.2. Материалы и методы	41
5.3. Результаты	43
5.3.1. Восстановление сперматогенной ткани с помощью трансплантации КС на модели нарушения сперматогенеза в ходе вирусной инфекции	43
5.3.2. Восстановление сперматогенной ткани с помощью трансплантации КС на модели нарушения сперматогенеза в ходе экспериментального крипторхизма	47
5.3.3. Изучение КС, полученных из семенников половозрелых мышей и выведенных в культуру	48
5.4. Публикации по теме	51
5.5. Список цитируемой литературы	52
Раздел 6. Разработка подходов для сохранения и воссоздания исчезающих видов осетровых рыб.	54
6.1. Материалы и методы	54
6.2. Результаты	54
6.3. Публикации по разделу	55
Раздел 7. Механизмы детерминации соматических и половых клеток в раннем развитии млекопитающих и человека	57
7.1. Введение	57
7.2. Материалы и методы	59
7.3. Результаты	61
7.4. Публикации по теме	65
7.5. Список используемых источников	65
Раздел 8. Использование зародышей морского ежа для поиска веществ с антимиотическим действием, обусловленным дестабилизацией микротрубочек	69
8.1. Введение	69
8.2. Материалы и методы	71
8.3. Результаты	72
8.4. Публикации по разделу	74
8.5. Список цитированной литературы	76

Реферат

Отчет 76 с., 8 ч., 20 рис., 3 табл., 146 источника (48 публикаций по теме, 98 цитированной литературы).

Ключевые слова: овуляция, активация, яйца рыб, сперматогенез, клетки Сертоли, наночастицы золота, живые системы, искусственное размножение, осетровые рыбы, определение пола, плюрипотентные стволовые клетки, тератокарциномные клетки, антимитотическая активность, микротрубочки, овариальные фолликулы, семенные каналцы, гормональная инверсия пола, морской еж *Paracentrotus lividus*, гены семейства *Mage*, тубулин, комбретастин, флавоноиды, изостевиол, цитотоксичность, апоптоз, регенерация, дедифференцировка, орхит, крипторхизм, трансплантация, мужские половые клетки, факторы семейства $TGF\beta$, сигнальные пути, меланомные антигены *Mage*, экспрессия генов, эмбриогенез, канцерогенез, τ_0 .

Определены параметры культивирования овариальных фолликулов сибирского осетра, при которых достигается наивысший результат для большинства самок. Найдены два эффективных способа гормональной индукции овуляции. Выявлена способность наночастиц золота проявлять парадоксальные прямые и сочетанные мутагенные эффекты, что указывает на необходимость тщательного тестирования условий их возможного медицинского (или фармакологического) использования. Определены условия культивирования клеток Сертоли в 3D-культуре, позволяющие им сохранять способность к морфогенезу семенных каналцев в течение 12 суток. Среди клеток Сертоли половозрелых животных существует небольшая популяция клеток, способная пролиферировать в культуре, при этом сохраняя экспрессию маркеров клеток Сертоли. Достигнут положительный эффект в исследованиях по гормональной инверсии пола в женском направлении у стерляди (совместная работа с ВНИИПРХ). Установлено участие генов семейства *Mage* в регуляции клеточных процессов, как опухолевых клеток, так и плюрипотентных стволовых и эмбриональных соматических клеток. На модели зародышей морского ежа *Paracentrotus lividus* испытано 141 вещество из библиотеки химических соединений Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Соединения класса бензимидазолов (альбендазол, фенбендазол и карбендазим) обладают выраженной способностью угнетать дробление яйцеклеток морского ежа за счет дестабилизации микротрубочек митотического веретена. Испытания производных изостевиола показали, что присоединение трифенилфосфониевого фрагмента, обеспечивающего избирательное накопление изостевиола в митохондриях, приводит к появлению aberrантных мультиполярных митотических веретен и остановке клеточного деления предположительно за счет воздействия на ДНК митохондрий.

Обозначения и сокращения:

КС - клетки Сертоли

НЧЗ - наночастицы золота

ПГ - простагландин

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПМК – перетубулярно мышечные клетки

ВПГ – вирус простого герпеса

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

PBS – фосфатно-солевой буфер

ST-КС – клетки Сертоли извитых семенных канальцев

TZ-КС – клетки Сертоли транзитной зоны

Л- среда Лейбовитца,

СКРС – сыворотка кроки крупного рогатого скота

ХГ – хорионический гонадотропин человека

ФС – фетальная сыворотка

ПЖ – полостная жидкость

аГнРГ - аналог гонадотропин-рилизинг гормона

ИПО - индекс поляризации ооцита

ОСИ – оосоматический индекс

РМО - раствор Рингера, модифицированный для осетровых рыб

T50 – время созревания 50% ооцитов *in vitro* под влиянием прогестерона

ЭГК - экстракт гипофизов карпа

L – среда Лейбовитца (число рядом отражает концентрацию добавленного бикарбоната натрия в г/л)

τ_0 – продолжительность одного митотического деления в период синхронных делений дробления

Введение

Исследование предзародышевого и зародышевого развития позвоночных животных – оогенеза, сперматогенеза, оплодотворения и ранних этапов развития - имеет большое значение не только для фундаментальной науки, но и для понимания причин возникновения различных аномалий и, как следствие, для применения полученных знаний в прикладной биологии, в частности для реализации программ по сохранению и воспроизводству редких и исчезающих видов животных (разделы 1, 2, 6), для понимания механизмов тератогенеза и регенерации (разделы 3, 4, 5), для разработки новых тест-систем с целью оценки эмбриотоксичности новых лекарственных средств (раздел 7) и для поиска новых синтетических и природных веществ с антипролиферативной активностью с перспективой их использования в химиотерапии онкологических заболеваний (раздел 8).

Для разработки этих вопросов изучается потенциал развития ооцитов и яйцеклеток осетровых и других видов рыб в условиях *in vitro* и *in vivo* и, в частности, регуляции созревания и овуляции яйцеклеток, исследование андрогенеза на примере осетровых рыб, активации и оплодотворения у позвоночных животных и человека, сперматогенеза и регенерации сперматогенного эпителия, детерминации соматических и половых клеток в раннем развитии млекопитающих и человека.

В этих направлениях уже получены весьма важные результаты, позволяющие надеяться на успешное решение поставленных задач. Так был разработан и усовершенствован метод отбора самок осетровых рыб, пригодных для искусственного размножения, на основе определения скорости созревания ооцитов *in vitro* под действием прогестерона. Этот метод уже с успехом используется в осетроводстве во Франции, Испании и других странах. Достигнуты первые успехи в разработке среды, препятствующей спонтанной активации яйцеклеток рыб с помощью полостной жидкости, содержащей ингибиторы протеаз. С помощью диспермного андрогенеза было впервые получено жизнеспособное андрогенетическое потомство у осетровых рыб, а также жизнеспособные андрогенетические ядерно-цитоплазматические гибриды, в том числе, с использованием криоконсервированной спермы. Был разработан простой и эффективный фенотипический метод скрининга на модели зародышей морского ежа. Метод не требует дорогостоящего оборудования и реактивов и позволяет быстро обнаружить молекулы, блокирующие деление клеток вследствие нарушения структуры и функции митотического веретена (Семенова). В сравнительных исследованиях функциональной активности сигнальных путей в плюрипотентных стволовых клетках и тератоканцеромных клетках мыши и человека впервые установлено, что нарушение дифференцировки опухолевых клеток тератоканцером связано со снижением функциональной активности сигнальных путей факторов ActivinA/Nodal.

О новизне проводимых исследований говорят результаты исследования механизмов созревания, овуляции, оплодотворения и раннего развития позвоночных животных, получившие международное признание и опубликованные в ведущих профильных журналах. Работы по индукции созревания и овуляции ооцитов осетровых рыб *in vitro* являются приоритетными и не имеет аналогов в мире. Оригинальным направлением исследований является изучение спонтанной активации яиц костистых рыб. Показано, что при спонтанной активации, как и при оплодотворении, включаются сигнальные каскады повышения концентрации ионов кальция в цитоплазме яйца, происходит кортикальная реакция и некоторые другие процессы раннего развития.

При изучении сперматогенеза у мышей впервые была обнаружена способность дифференцированных клеток Сертоли взрослых животных к пролиферации, что продиктовало необходимость вернуться к изучению роли этих клеток в становлении и регенерации сперматогенеза. Клетки Сертоли (КС) – поддерживающие клетки сперматогенной системы, без которых невозможно прохождение сперматогенеза млекопитающих. Недифференцированные, активно пролиферирующие КС неонатальных организмов обладают высокими регенерационными способностями и способны восстанавливать сперматогенную ткань при трансплантации. Дифференцированные, не пролиферирующие КС взрослых организмов, в том числе человека, такими способностями не обладают, поэтому любое нарушение функционирования КС или их гибель приводят к необратимым деструктивным изменениям ткани яичек и снижению фертильности. В настоящей работе изучены свойства недифференцированных КС восстанавливать сперматогенную ткань на моделях нарушения сперматогенеза лабораторных животных, имитирующих патологии человека: орхита инфекционной природы и крипторхизма, а также исследованы возможности дедифференцировки и активации регенерационных свойств у КС взрослых животных. Установлено, что недифференцированные КС животных-доноров способны восстанавливать сперматогенную ткань при трансплантации в семенники реципиентов, нарушенные в ходе вирусного орхита или экспериментального крипторхизма, причем восстановление ткани идет либо за счет формирования КС донора семенных канальцев *de novo*, либо за счет КС и половых клеток реципиента, подвергшихся паракринной стимуляции со стороны КС донора. Также продемонстрировано, что небольшая популяция КС половозрелых мышей, находящаяся в транзитной зоне семенных канальцев, при выведении в культуру дедифференцируется и активно пролиферирует. Показано, что такие КС обладают способностью к регенерации: они образуют канальцевые структуры *de novo* в 3D-условиях и способны, наравне с недифференцированными неонатальными КС формировать стенку семенных канальцев в смешанной 3D-культуре.

Полученные данные о регенерационных свойствах КС неонатальных и взрослых животных позволяют по-новому взглянуть на процесс дифференцировки КС в постнатальном развитии и свидетельствуют о возможности их дедифференцировки у взрослых организмов. Кроме того, эти результаты могут быть использованы для разработки способ клеточной терапии мужского бесплодия и воссоздания сперматогенеза *in vitro*.

Разработан, применительно к осетровым рыбам, метод диспермного андрогенеза, позволивший избежать гомозиготности и получать андрогенетическое потомство с обычным уровнем генетической изменчивости. Работы в области диспермного андрогенеза у осетровых рыб также мировых аналогов не имеют.

Весьма актуальным представляется комплексное изучение функционирования генных регуляторных сетей в плюрипотентных стволовых клетках млекопитающих и их малигнизированных клеточных аналогах и, в частности, исследование механизмов взаимодействия сигнальных путей факторов семейства TGF beta, PI3K/Akt, ERK/MEK и Wnt в регуляции пролиферации и дифференцировки плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток. В исследованиях механизмов детерминации соматических и половых клеток в раннем развитии млекопитающих получены приоритетные данные о паттернах экспрессии 17 раково-тестикулярных антигенов семейства Mage в раннем развитии мыши, которые аннотированы в международную базу данных Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org/>). Впервые выявлены корреляции в экспрессии генов семейств *Mage* и регуляторами пролиферации (*C-myc*, *E-ras*) дифференцировки (*Mvh*, *Afp*, *Gata4*, *Pax6*). Обнаружены существенные различия в экспрессии генов *Mage-a2* и *Mage-a6* в плюрипотентных стволовых и злокачественных тератокарциномных клетках мыши. По результатам кластерного анализа паттернов экспрессии генов Mage, впервые определены роли кластеров генов *Mage-a4* и группы *Mage-a8*, *Mage-d1*, *Mage-d2*, *Mage-e1*, *Mage-l2* как потенциальных функциональных антагонистов в регуляции пролиферации и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток мыши.

Степень внедрения: результатов работы предлагается использовать при разработке 3D-модели раннего развития млекопитающих для фундаментальных, фармакологических и токсикологических исследований, а данные об экспрессии и функционировании сигнальных систем и раково-тестикулярных антигенов при разработке новых подходов в лечении раковых опухолей эмбрионального происхождения.

Поиск веществ-цитостатиков для разработки новых противоопухолевых лекарственных средств является актуальной проблемой медицинской химии. Для первичного скрининга первостепенное значение имеет выбор адекватной тест-системы. В данной работе испытания химических соединений проводили на зародышах морского ежа, внесенных в список модельных организмов для медико-биологических исследований. Использовали оригинальный фенотипический метод,

позволяющий выявлять вещества с антипролиферативной активностью, обусловленной избирательным воздействием на тубулин и дестабилизацией микротрубочек. В 2013–2016 гг. были протестированы 514 органических веществ разнообразной химической структуры. Обнаружено 120 соединений-антимитотиков, селективно воздействующих на тубулин и нарушающих сборку микротрубочек. Из них 62 вещества угнетали дробление зародышей морского ежа в концентрации ≤ 50 нМ. Последующие испытания этих молекул на 60 линиях опухолевых клеток человека в Национальном институте рака США (NCI NIH, USA) по Программе поиска новых противоопухолевых лекарственных средств (Developmental Therapeutic Program, NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen) выявили их выраженную цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам, включая клеточные линии с множественной лекарственной устойчивостью. Исследование зависимости биологической активности от молекулярной структуры показало, что многие мощные антимитотики - дестабилизаторы микротрубочек содержат полиалкоксибензольный фармакофорный фрагмент. Проведение синтеза таких соединений возможно на основе легкодоступного экологически чистого растительного сырья – CO₂ - экстракта семян укропа и петрушки.

Наряду с антитубулиновыми агентами выявлены вещества с кардиопротекторными свойствами. Трифенилфосфониевые производные изостевиола вызывали появление абберантных мультиполярных митотических веретен при первом делении дробления яйцеклеток морского ежа предположительно за счет воздействия на ДНК митохондрий. Показано, что эти вещества селективно накапливались в митохондриях, деполяризовали их мембрану и снижали захват ионов кальция.

Раздел 1. Регуляторные механизмы формирования половых клеток и ранних стадий зародышевого развития у позвоночных животных

1.1. Введение

Целью работы было совершенствование методов искусственного размножения осетровых рыб, в частности, метода отбора самок, способных после гормональной стимуляции давать икру с высоким потенциалом развития, и методов гормональной обработки. Также предполагалось апробировать разработанные методы на атлантическом осетре - виде, практически исчезнувшем из природы и оказавшемся чрезвычайно трудным для размножения в искусственных условиях. Параллельно разрабатывался запасной вариант получения потомства, основанный на осеменении яйцеклеток, созревших и овулировавших *in vitro*.

Попытка применения разработанного нами ранее метода оценки физиологического состояния фолликулов по скорости созревания ооцитов *in vitro* (Т50) для оценки производителей атлантического осетра первоначально была не слишком удачной, так как у большей части самок ооциты начинали повреждаться при культивировании еще до завершения процесса созревания. В ходе исследований было выяснено, что это связано не с особенностями вида, а скорее условиями температурного содержания и кормления самок, не позволявшими овариальным фолликулам достигать к нерестовому сезону нужного состояния. Были внесены соответствующие изменения в условия выращивания производителей в межнерестовый период. Оценивая состояние овариальных фолликулов по морфометрическим и физиологическим показателям, проводя мониторинг этих показателей в течение нерестового периода и используя различные препараты и схемы гормональной стимуляции, удалось доказать возможность получения массового потомства от атлантического осетра. За три года были получены около двух миллионов личинок, что многократно превышает результаты, полученные французскими исследователями за предыдущие тридцать лет.

Ранее нами были определены условия, обеспечивающие овуляцию максимального числа ооцитов *in vitro* под влиянием прогестерона. В частности было показано, что наилучшие результаты могут быть получены при уменьшении концентрации бикарбоната натрия в РМО до 0,7 г/л. При этом существовали экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что это изменение не влияет на Т50. Проведенное на фолликулах 10 самок сибирского осетра исследование показало, что это не так. При уменьшении концентрации бикарбоната натрия происходит увеличение Т50, но значительным и достоверным оно становится только у тех самок, у которых Т50 приближается к $18\tau_0$. Учитывая, что эта величина является пороговой для отбора самок для размножения у трех видов осетровых рыб (севрюги, сибирского осетра и стерляди), обнаружение этой закономерности является важной для стандартизации этого метода.

Для того чтобы понять, действительно ли величина $T50$ равная $18\tau_0$ является универсальной, необходимо расширять круг объектов. В рамках этой задачи совместно с исследователями из ИЭМЭЖ РАН и испанскими учеными была проведена работа по определению зависимости τ_0 от температуры для адриатического осетра. В опытах были получены соответствующие данные и построен график. Помимо этого завершены и оформлены в виде публикации исследования механизма открытого нами явления негормональной стимуляции созревания ооцитов осетровых рыб.

В связи с катастрофическим снижением численности самой крупной популяции осетровых рыб в Каспийском море возникла угроза прекращения деятельности пастбищного осетроводства, когда ежегодно на протяжении десятилетий в море выпускали около 100 млн полученной и выращенной на осетровых рыбоводных заводах (ОРЗ) молоди осетровых рыб. Недостаток отлавливаемых в природе производителей даже для искусственного воспроизводства привел к необходимости создания поддерживаемых в неволе маточных стади многократного прижизненного получения икры от одних и тех же производителей. Нехватка продукции осетровых рыб на мировом рынке стимулировала рост числа хозяйств, специализирующихся на получении личинок, товарном выращивании и производстве икры, причем, не только у нас в стране, но и во многих странах мира, включая те, в которых осетровые не представлены в местной ихтиофауне. Параллельно с промышленным разведением и выращиванием во всем мире возрос интерес, и начались работы по восстановлению редких и исчезающих видов осетровых рыб.

Искусственное размножение осетровых рыб, начиная с 40-х годов прошлого столетия, базируется на использовании метода гипофизарных инъекций (Гербильский, 1941). Позднее препарат гипофизов осетровых рыб был заменен аГнРГ (Гончаров, 1984). Ключевым моментом в работе с производителями является выбор момента для гормональной стимуляции, когда самки способны ответить на это воздействие полноценным созреванием и овуляцией икры, способной к дальнейшему нормальному развитию. Указанная выше необходимость работать не с природными производителями, а с самками, формирование гонад которых проходит в искусственных условиях, существенно усложнило задачу, так как в неволе происходит существенная рассинхронизация оогенеза. Ошибки в выборе момента инъекции приводят к производственным потерям, а иногда, при неполной овуляции, и к гибели производителей. Эта проблема особенно остро встает при работе с редкими видами или при работе с редкими в генетическом плане экземплярами рыб.

За время существования осетроводства было предпринято немало попыток найти надежный критерий отбора самок, пригодных для размножения (см. Dettlaff et al., 1993; Chebanov et al., 2011). Наиболее используемыми из них являются ИПО (Казанский и др., 1978) и $T50$ (Гончаров, 1981). Первые результаты, указывающие на возможность использования $T50$ для выбраковки

самок, не способных давать икру высокого рыбоводного качества, были проведены на самках севрюги из природной популяции, и было показано, что пороговой величиной T50 является $18\tau_0$. Позднее подобное исследование было проведено на выращенных в искусственных условиях самках сибирского осетра (Гончаров и др., 1999). После появления в литературе данных о зависимости τ_0 от температуры для этого вида (Gispert, Williot, 2002) и пересчета наших данных выяснилось, что и для этого вида порог T50 находится около $18\tau_0$. И, наконец, по нашим неопубликованным данным та же величина отсечения была определена у стерляди. Этот метод стал применяться довольно широко во всем мире (Lutes et al., 1987; Williot et al., 1991; Doroshov et al., 1997; Omoto et al., 2005; De Lonay et al., 2007; Taneh, 2012; Ishihara, 2014), однако без предварительного выяснения условий для его корректного применения для выбранного вида осетровых рыб. Важнейшими из них являются температура и время фиксации, но именно они устанавливаются произвольно в этих работах.

В задачу нашей работы, проводившейся совместно с французскими учеными, входило разобраться в причинах многолетних неудачных попыток искусственного размножения атлантического осетра (Williot, Chevre, 2011). Предстояло также выяснить, почему условия стимуляции созревания ооцитов *in vitro* под влиянием прогестерона, применявшиеся для других видов, не подходили для овариальных фолликулов атлантического осетра, и за редким исключением приводили к быстрому повреждению ооцитов. Конечной же целью этой работы была разработка методов содержания производителей в межнерестовый период, способа оптимальной подготовки самок к нересту, разработка наилучшего метода или методов определения готовности самки к нересту и наиболее эффективной схемы гормональной стимуляции, приводящих к получению многочисленного и полноценного потомства.

Параллельно для атлантического осетра мы разрабатывали «запасной» способ сохранения генотипа наиболее ценных в генетическом плане особей, основанный на получении созревших и овулировавших *in vitro* яйцеклеток, которые после осеменения были бы способны развиваться в нормальных животных. Эффективность такого подхода ранее (Goncharov et al., 2009; Скоблина, Гончаров, 2012) нами была продемонстрирована для модельных объектов. Было желательным найти среду, которая бы одинаково хорошо подходила для наших двух целей – определение T50 и получение потомства из созревших и овулировавших *in vitro* яйцеклеток.

Кроме того, мы провели опыты по определению зависимости τ_0 от температуры для другого редкого вида – адриатического осетра, что в дальнейшем позволит использовать T50 для отбора самок и увеличить материал, свидетельствующий в пользу или против величины в $18\tau_0$ как универсальной пороговой, а также добавить к опубликованной (Cabrera et al., 2015) таблице нормального развития этого вида хронологическую таблицу в безразмерных единицах (τ_n/τ_0).

1.2. Материалы и методы

Объектами исследования были осетровые рыбы. В качестве модельных видов использовали сибирского осетра и стерлядь, широко используемых в осетровых хозяйствах. Помимо этого работы проводились на атлантическом и адриатическом осетрах – видах, включенных в Международную красную книгу в категорию «находящиеся в критическом состоянии» (CR – critically endangered).

Работа проводилась совместно с французскими исследователями на экспериментальной базе Научно-исследовательского института по инженерии сельского хозяйства и окружающей среды, а также совместно с испанскими учеными на базе осетровой фермы «Риофрио». Для оценки физиологического состояния овариальные фолликулы извлекали из полости тела самки при помощи металлического щупа и помещали либо в раствор Рингера, модифицированный для осетровых рыб (РМО) (Гончаров, 1978), содержащий выбранную в зависимости от задачи опыта концентрацию бикарбоната натрия, либо в 75% среду Лейбовитца (L-15). После этого их многократно промывали той же средой и раскладывали для инкубации в чашки Петри (диаметром 60 мм) обычно по 30-35 фолликулов на 7,5 мл среды. Инкубацию проводили при выбранной постоянной температуре. По ходу инкубации фолликулы фиксировали для определения времени созревания 50% ооцитов (T50). Критерием созревания служило растворение оболочки ядра ооцита. Кроме того после завершения инкубации подсчитывали процент созревших и овулировавших ооцитов. Об овуляции судили по высвобождению ооцитов из окружающих оболочек. Дополнительно к этому определяли морфометрические характеристики - диаметр и индекс поляризации ооцита (ИПО). Для измерения диаметра извлеченные из тела самки фолликулы фиксировали кипячением, сканировали, а затем полученное изображение обрабатывали на компьютере с помощью специально созданной для этого программы «Ооцит». Для определения ИПО ооциты разрезали под биноклем по анимально-вегетативной оси и с помощью окуляр-микрометра измеряли кратчайшее расстояние от поверхности зародышевого пузырька (ЗП) до поверхности ооцита. ИПО выражали как процентное отношение измеряемого расстояния к диаметру ооцита.

При работе с производителями самцов и самок инъецировали гормональными препаратами – либо суперактивным синтетическим аналогом гонадотропин-рилизинг гормона млекопитающих (аГнРГ), либо экстрактом ацетонированных гипофизов карпа (ЭГК) в различных дозах. Овулировавшую икру получали прижизненно путем сцеживания через небольшой разрез в нижней части брюшной стенки. Все рыбоводные процедуры были стандартными (Dettlaff et al., 1993). О полноте овуляции судили по оосоматическому индексу, а о качестве икры - в зависимости от задачи опыта либо по выходу личинок.

Определение зависимости продолжительности деления дробления (τ_0 – Детлаф, Детлаф, 1960) в период синхронных делений от температуры проводили в специально сконструированной установке, представляющей собой массивный металлический брус с 9-ю углублениями, в которые помещались чашки Петри с оплодотворенной икрой. За счет поддержания постоянной низкой и высокой температуры вода в полостях, находящихся на концах бруса, по его длине устанавливался градиент температуры от 10-12 до 24-25⁰С. Бруса крепился к платформе, перемещение которой позволяло быстро подводить чашку в поле бинокля. Икра одной самки помещали в одну линию в желобках, сделанных в слое парафина, залитого на дно чашки. Это позволяло регистрировать время последовательного появления борозд у одних и тех же зародышей. От одной самки в чашку помещали по 11-13 икринок. В момент появления борозды регистрировали температуру в данном секторе бруса.

1.3. Результаты

1.3.1. Опыты по искусственному размножению атлантического осетра.

В табл. 1.1 представлены сводные данные по определению морфометрических и физиологических характеристик овариальных фолликулов атлантического осетра. Эти самки были отобраны по результатам ультразвукового исследования, которое показало, что у них имеются хорошо развитые гонады. Действительно, при измерении диаметра ооцитов было показано, что он достиг или был близок к дефинитивному размеру (2,4 – 2,8 мм). Напротив, измерение ИПО указывало скорее на то, что по этому показателю ооциты еще не совсем приблизились к преднерестовому состоянию. О том же свидетельствовали и физиологические характеристики: Т50, и процент ооцитов, созревших под влиянием прогестерона при финальной варке. Определения состояния фолликулов были повторены через разные промежутки времени в зависимости от продвинутого их исходного состояния, однако, радикальных изменений не происходило. Так как возможности поддерживать пониженную температуру у производителей были ограничены, было решено начать гормональную стимуляцию. В том случае, если реакции на гормональное воздействие не было, проводили повторное определение состояния фолликулов и повторную гормональную обработку. При этом мы экспериментировали, меняя дозы и в ряде случаев используя комбинированное воздействие аГнРГ и ЭГК. Результаты стимуляции самок представлены в таблице 1.2.

Таблица 1.1. Морфометрические и физиологические характеристики ооцитов *A.sturio*

N самки	Дата биопсии	Диаметр ооцита, мм	ИПО, %	T50, часы			Созревшие ооциты, % (финальная фиксация)			
				РМО- 0.75	РМО- 1.5	L-1.5	РМО- 0.75	РМО- 1.5	L-1.5	
2F5D	03/05	2.7	12	19			77			
	24/05	2.7	13	21			72		100	
	06/06	2.7	13.	22	19	15	77	100	100	
	После первой гормональной обработки									
	09/06	2.8	6							
	После второй гормональной обработки									
279C	03/05	2.7	14	>22			66			
	24/05	2.7	13	20			89		100	
21D5	03/05	2.7	14	>19			56			
	24/05	2.7	13	>33			28		100	
	14/06	2.7	14	14		14	100		100	
31AB	03/05	2.6	15	23			41			
	24/05	2.7	16	21			88		96	
	06/06	2.7	14	23	19	18	95	100	100	
CACF	03/05	2.4	20	>30			0			
	16/06	2.7	13	25		>28*	100		84*	
	После гормональной обработки									
	28/06	2.7	6		<12**	<12**		100**	100**	
3480	03/05	2.4	22	>30			0			
	16/06	2.6	16	23		>40*	100		80*	
	После гормональной обработки									
	28/06	2.7	5		<12**	<12**		100**	100**	
E82D	24/05	2.6	11	>26			80		100	
	14/06	2.7	10	17		>18	96		100	
E7E8	24/05	2.7	14	21			93		100	
E4A5	24/05	2.4	21	>33			0		0	
	16/06	2.5	18	47			59		0*	

* NaHCO₃ не добавляли

** в среду инкубации добавлено 2 г/л NaHCO₃

> - точное значение T50 не могло быть определено либо из-за нехватки ооцитов, либо из-за их повреждения к указанному времени

Таблица 1.2. Результаты опытов по искусственному размножению *A.sturio*

№ самки(год рождения)	Масса рыбы, кг	Дата инъекции	Гормональная обработка	Получено яиц, тыс	ОСИ, %	Получено личинок, тыс	Число личинок (% от числа яиц)
2F5D (1995)	20,1	08/06	аГнРГ (40 + 80 мкг/кг)	Отсутствие реакции			
		13/06	аГнРГ (50 + 90 мкг/кг)	Отсутствие реакции			
		16/06	ЭГК (0.5 + 5 мг/кг)	53	6	24	45.0
279С (1994)	23,9	14/06	аГнРГ (40 + 80 мкг/кг)	Яйца не оплодотворились			
21D5 (1995)	31,9	16/06	ЭГК (0.5 + 5 мг/кг)	Перезрела			
31AB (1994)	22,1	08/06	аГнРГ (40 + 80 мкг/кг)	170	10	130	76.5
САСF (1994)	17,5	28/06	ЭГК (0.5 мг/кг) + аГнРГ (100 мкг/кг)	Отсутствие реакции			
		02/07	ЭГК (5 мг/кг)	157	13	23	14.6
3480 (1994)	18,5	28/06	ЭГК (0.5 + 5 мг/кг)	Яйца не оплодотворились			
E82D (1994)	11,7	16/06	аГнРГ (70 + 100 мкг/кг)	88	9	20	22.7
E7E8 (1994)	10,7	14/06	аГнРГ (40 + 80 мкг/кг)	80	13	76	95.0
E4A5 (1994)	6,3	02/07	аГнРГ (40 + 80 мкг/кг)	Отсутствие реакции			
		04/07	ЭГК (5 мг/кг)	39	8	0	0

Полученные результаты показали, что условия содержания и кормления, по крайней мере, у части самок, обеспечивают нормальное развитие гонад. От четырех из девяти самок с помощью гормональной обработки была получена икра хорошего рыбоводного качества. Процент оплодотворения у этих самок составил от 63,5 до 97,6 %. Отход зародышей за время инкубации не превышал 10 %. В результате было получено свыше 200 000 личинок. Еще от пяти самок также была получена икра, однако, у двух самок процент оплодотворения был небольшим - 13,5 и 43,9%, еще у двух самок икра была не способной к оплодотворению, а икру одной самки не осеменяли, так она была перезревшей.

В ходе работы было также показано, что в отсутствие природных синхронизирующих факторов состояние овариальных фолликулов исследованных самок было довольно разнородным. Это следует из сравнения и их морфометрических характеристик, и физиологического состояния, определяемого по реакции ооцитов на прогестерон *in vitro*. У некоторых самок к моменту начала наблюдений ооциты даже еще не достигли дефинитивного размера. Так, например, у самок САСФ и 3480 средний объем ооцита за время наблюдения увеличился, соответственно, на 38 и 46%.

Следует отметить, что для определения времени наступления преднерестового состояния мы использовали две основные характеристики – ИПО и T50. Предполагалось также изучить возможность использовать с этой целью и третью характеристику, а именно, процент ооцитов, способных овулировать *in vitro* под влиянием прогестерона. В качестве среды культивирования был выбран РМО, содержащий 0.7 г/л бикарбоната натрия. Эта среда была выбрана, потому что в предварительном исследовании, проведенном на фолликулах сибирского осетра, было показано, что она является оптимальной для индукции овуляции для большинства самок. С другой стороны существовало мнение, основанное на опытах, поставленных ранее на фолликулах разных видов осетровых рыб, что состав среды культивирования мало влияет на такой показатель, как T50. Первые же опыты показали несоответствие морфометрических и физиологических характеристик. В этой связи мы начали испытывать другие среды и выяснили, что у ряда самок T50 существенно различается в разных средах (Таблица 1.1).

Несмотря на то, что работа была проведена на небольшом материале (9 самок) можно сделать некоторые выводы. Вопреки распространенному мнению о том, что для получения икры высокого рыбоводного качества, ИПО должен быть меньше 7%, икра с очень высоким процентом оплодотворения была получена от самки 31АВ с ИПО равным 14,3%. Для трех ранее исследованных видов осетровых рыб было показано, что практически никогда не удастся получить икру высокого качества от самок, T50 ооцитов которых больше 18 τ_0 . Так как для атлантического осетра нет данных о величине τ_0 , мы можем пока говорить только о T50, выраженном в часах при определенной температуре (18⁰С). Для четырех лучших самок T50 был в

пределах 17-23 часов при культивировании ооцитов в РМО, содержащем 0.7 г/л бикарбоната натрия. В других средах, содержащих увеличенную концентрацию соды, Т50 был обычно несколько меньше.

Приведенные выше данные показывают, при каких показателях ооцитов самки способны давать после инъекции икру высокого рыбоводного качества. Это, однако, означает, только то, что от самок с такими показателями может быть, но не обязательно будет получена икра высокого рыбоводного качества. Из приведенных в таблицах данных видно, что самки, давшие икру с процентом оплодотворения меньше 50, или давшие икру, совсем не способную к оплодотворению, имели такие же, а в ряде случаев и лучшие показатели. Неудача может быть связана с разными причинами. Во-первых, он может быть связан с гормональной обработкой, которая, в принципе, не может быть одинаковой для самок, находящихся в разном физиологическом состоянии. Он может также быть обусловленным неудовлетворительному состоянию организма в целом, которое не находит отражения в показателях физиологического состояния овариальных фолликулов.

Три самки, показавшие наилучший результат, были инъекцированы аГнРГ (две инъекции с 12-часовым интервалом). В то же время самка 2F5D не ответила даже на две серии по две инъекции этого препарата, но отреагировала затем на две инъекции ЭГК. Это, однако, не означает, что овуляция могла бы быть индуцирована, если бы с самого начала ей была бы предложена последняя обработка. Несмотря на то, что инъекции аГнРГ у этой самки не привели к желаемому результату, они изменили состояние ооцитов, возможно, подготовив их к инъекции препарата гипофизов карпа. Попытка использовать для двух самок (Таблица 2) препарат гипофизов карпа вместо аГнРГ не привела к положительному результату. У самки 21D5 икра оказалась перезревшей и не могла быть осеменена, так как ооциты полопались еще в теле самки, а у самки 3480 икра не оплодотворилась, возможно, из-за того, что данная гормональная обработка оказалась неадекватной физиологическому состоянию фолликулов и/или самки. Такая неадекватная обработка может приводить к нарушению синхронности процессов созревания и овуляции ооцитов с очевидными негативными последствиями. Нельзя скидывать со счетов и возможность получения у ряда самок отрицательного результата из-за вмешательства таких факторов, как врожденные генетические аномалии, нарушения реакции самок, которые у особо чувствительных особей могут быть связаны со стрессовыми воздействиями, а также технические ошибки и ошибки при определении момента овуляции (возможная причина перезревания ооцитов у самки 21D5).

Ориентируясь на эти данные, были даны рекомендации по температурным условиям содержания самок в межнерестовый период, выбраны характеристики ооцитов, при которых следует начинать гормональную стимуляцию, и определены наиболее оптимальные схемы такой стимуляции. Используя эти рекомендации, в следующем году удалось существенно улучшить

результат. Потомство было получено от девяти из четырнадцати самок, а общее число выращенных личинок достигло 834 тысяч. Примерно такой же результат был получен и в следующем году.

1.3.2. Индукция овуляции ооцитов атлантического осетра *in vitro* под влиянием прогестерона.

Опыты с фолликулами *in vitro* показали две принципиальные вещи. Во-первых, среды, разработанные для других видов осетровых рыб для получения большого процента овулировавших ооцитов под влиянием прогестерона (Goncharov et al., 2008; Скоблина, Гончаров, 2012), оказались неподходящими для атлантического осетра. В дальнейшем предстоит выяснить, связано ли это с видовыми особенностями, с условиями содержания или с физиологическим состоянием фолликулов. Во-вторых, несмотря на скромный успех, показана принципиальная возможность получения потомства атлантического осетра из ооцитов, созревших и овулировавших *in vitro*. При этом чисто случайно была воспроизведена ситуация, ради которой и была проведена работа по разработке такого подхода. Именно от самки, от которой при гормональной стимуляции *in vivo* не удалось получить ни одного оплодотворенного яйца, из ооцитов, созревших и овулировавших *in vitro*, было получено четыре личинки.

1.3.3. Влияние концентрации бикарбоната натрия на скорость созревания ооцитов *in vitro* под влиянием прогестерона.

При разработке метода отбора самок, пригодных для размножения, по скорости созревания ооцитов *in vitro* под влиянием прогестерона мы исходили из того, что определение пороговой величины T50 должно осуществляться в стандартных условиях, и, прежде всего, температурных. Проведенные нами ранее на разных видах осетровых рыб опыты, напротив, показывали, что эта величина мало или совсем не зависит от состава среды культивирования. При работе с фолликулами атлантического осетра мы столкнулись с фактами, которые противоречили этим представлениям. Для того чтобы прояснить картину, мы поставили опыт на фолликулах десяти самок сибирского осетра, в котором определяли T50 в двух средах РМО, содержащих разное количество бикарбоната натрия (0,7 и 2 г/л). Результаты этого опыта показывают (рис. 1.1), что для самок с небольшим T50 в РМО-2 уменьшение концентрации бикарбоната натрия до 0,7 г/л не влияет, или влияет незначительно на скорость созревания. Напротив, у менее продвинутых самок эта разница становится вполне ощутимой, что, несомненно, надо учитывать при использовании этого критерия, там более, что разные исследователи в настоящее время используют сильно различающиеся по составу среды для инкубации фолликулов осетровых рыб.

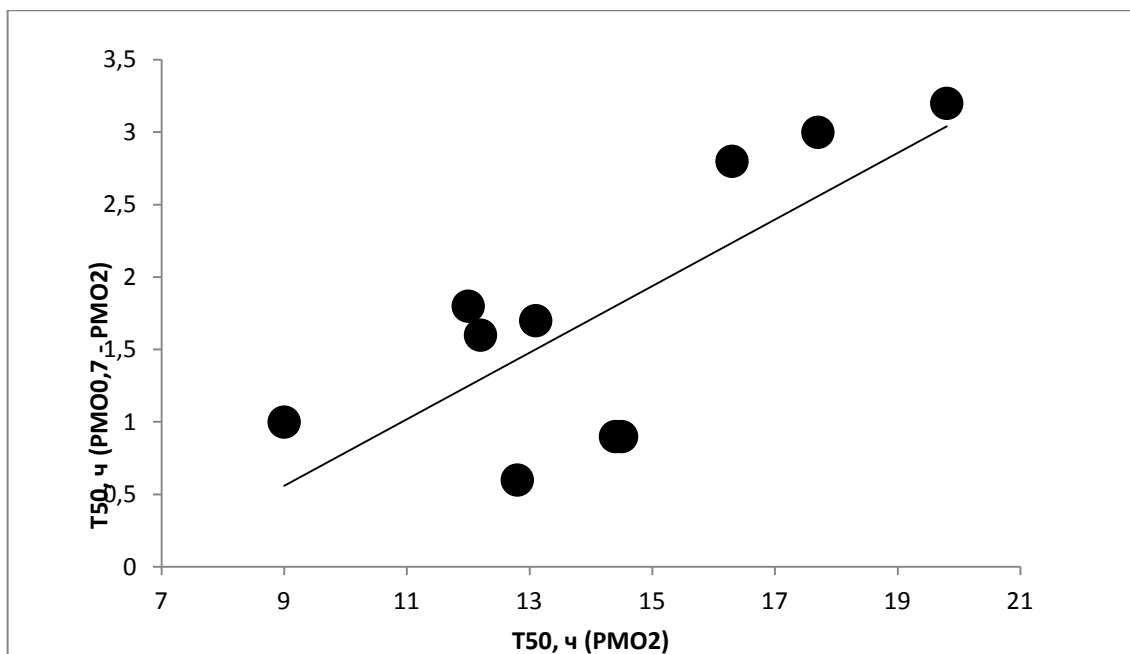


Рис. 1.1. Изменение времени созревания 50% ооцитов *in vitro* под влиянием прогестерона (T50) при изменении концентрации бикарбоната натрия в растворе Рингера.

Таким образом, для решения двух задач, направленных на повышение эффективности искусственного размножения осетровых рыб, и особенно, редких и исчезающих видов, а именно – определение наиболее благоприятного времени для гормональной стимуляции самок с использованием в качестве критерия времени созревания ооцитов *in vitro* и получение «резервного» потомства путем осеменения созревших и овулировавших *in vitro* яйцеклеток, видимо придется использовать разные по составу среды.

1.3.4. Определение зависимости продолжительности деления дробления (τ_0) от температуры у адриатического осетра.

На рис. 1.2 представлена кривая зависимости τ_0 от температуры для адриатического осетра. Определение проводились на дробящихся яйцах одной самки. В данном опыте для определения τ_0 измеряли интервал времени между закладкой борозд первого и второго делений дробления.

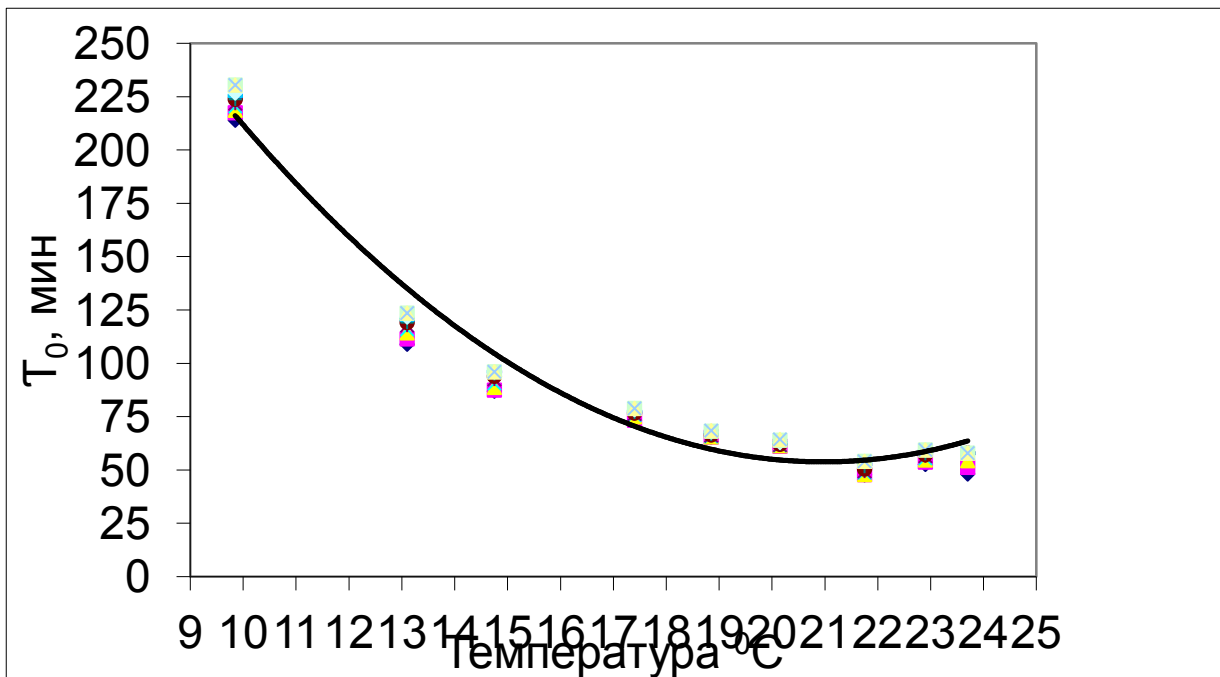


Рис. 1.2. Зависимость продолжительности деления дробления (τ_0) от температуры у адриатического осетра

Предполагается в дальнейшем использовать эти данные как для проверки гипотезы об универсальности величины в $18\tau_0$ для T50 в качестве пороговой для разных видов осетровых рыб, так и для создания таблицы нормального развития с указанием времени наступления различных стадий в безразмерных единицах.

1.4. Публикации по теме

1. Chèvre P., Goncharov B.F., Rochard E., Lambert P. Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*) mass propagation // In «International Symposium on Sturgeons», 2013. Nanaimo, Canada. 5. P. 093.
2. Гончаров Б.Ф., Скоблина М.Н. Негормональная стимуляция *in vitro* созревания ооцитов осетровых рыб // Онтогенез. 2014. Т. 45. № 2. С. 102-111. (Goncharov B.F., Skoblina M.N. Nonhormonal stimulation of oocyte maturation in sturgeons // Russian J. Devel. Biol., 2014. 45(2), 85-92)

1.5. Цитируемая литература

1. Гербильский Н. Л. 1941. Метод гипофизарных инъекций и его роль в рыбоводстве. В кн. Метод гипофизарных инъекций и его роль в воспроизводстве рыбных запасов. Л., Т. 1, С. 5-36.
2. Гончаров Б.Ф. 1978. Влияние состава среды культивирования на способность фолликулов осетровых рыб реагировать созреванием на действие гонадотропных гормонов. Вопросы раннего онтогенеза рыб. Киев, Наукова думка, С. 77-78.
3. Гончаров Б.Ф. 1981. Исследование продолжительности созревания ооцитов осетровых рыб как критерий для отбора производителей. В кн.// Детлаф Т.А., Гинзбург А.С., Шмальгаузен О.И.

- Развитие осетровых рыб (Созревание, оплодотворение, развитие зародышей и предличинок). М. Наука. Приложение. С. 189-190.
4. Гончаров, Б. Ф. 1984. Синтетический аналог люлиберина—новый перспективный стимулятор созревания половых продуктов осетровых рыб. ДАН СССР, 276(4), 1002-1006.
 5. Гончаров Б.Ф., Вийо П., ЛеМенн Ф. 1999. Морфологические и физиологические характеристики овариальных фолликулов сибирского осетра и их ценность для прогнозирования успеха искусственного размножения. Онтогенез. Т.30, С. 51-60.
 6. Детлаф, Т. А., Детлаф А.А. 1960. О безразмерных характеристиках продолжительности развития в эмбриологии. Докл. АН СССР, Т.134, С. 199-202.
 7. Казанский Б.Н., Феклов Ю.А., Подушка С.Б., Молодцов А.Н. 1978. Экспресс метод определения степени зрелости гонад у производителей осетровых рыб. Рыбное хоз-во, 2, С. 24-27.
 8. Скоблина М.Н., Гончаров Б.Ф. 2012. Стимуляция *in vitro* овуляции ооцитов осетровых рыб прогестероном и гомологичным гонадотропным гормоном гипофиза. Онтогенез, Т. 43, С. 183-192.
 9. Cabrera, R., Soriguier, M. C., Domezain, A., & Hernando, J. A. 2015. Embryonic development of adriatic sturgeon, *Acipenser naccarii* (Bonaparte 1836), in farming conditions: a guide. Acta Zoologica, 37, 334-344.
 10. Chebanov, M. S., & Galich, E. V. 2011. Sturgeon hatchery manual. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, 338 pp.
 11. DeLonay, A. J., Papoulias, D. M., Wildhaber, M. L., Annis, M. L., Bryan, J. L., Griffith, S. A., & Tillitt, D. E. 2007. Use of behavioral and physiological indicators to evaluate *Scaphirhynchus* sturgeon spawning success. J. Appl. Ichthyol., 23(4), 428-435.
 12. Dettlaff T. A., Ginsburg A. S., Schmalhausen O. I. 1993. Sturgeon fishes. Developmental biology and aquaculture. Springer Verlag, Berlin, 300 pp.
 13. Doroshov, S. I., Moberg, G. P., & Van Eenennaam, J. P. 1997. Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. In Sturgeon Biodiversity and Conservation (pp. 265-278). Springer, Netherlands.
 14. Gisbert E., Williot, P. 2002. Duration of synchronous egg cleavage cycles at different temperatures in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). J. Appl. Ichthyol., 18, 271-274.
 15. Goncharov B.F., Skoblina M.N., Trubnikova O.B., and Vassetzky S.G. 2009. Hormonal induction of ovulation *in vitro* in sturgeon fishes. Biology, Conservation and Development of Sturgeon/ Eds. Carmona R. et al., Springer, p. 175-185.

16. Ishihara, M., Tokui, B., Abe, T., Ijiri, S., & Adachi, S. 2014. Seasonal changes in oocyte maturational competence, ovulatory competence and gonadotropin sensitivity of ovarian follicles in hybrid sturgeon, bester (*Husohuso*×*Acipenserruthenus*). *J. Appl. Ichthyol.*, 30(6), 1141-1148.
17. Lutes, P. B., Doroshov, S. I., Chapman, F., Harrah, J., Fitzgerald, R., & Fitzpatrick, M. 1987. Morphophysiological predictors of ovulatory success in white sturgeon, *Acipensertransmontanus* Richardson. *Aquaculture*, 66(1), 43-52.
18. Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K., & Yamauchi, K. 2005. The influence of oocyte maturational stage on hatching and triploidy rates in hybrid (bestor) sturgeon, *Husohuso*×*Acipenserruthenus*. *Aquaculture*, 245(1), 287-294.
19. Taneh, B., Abtahi, B., & Nazari, R. 2012. In vitro assessment of final oocyte maturation index (GVBD) in Persian sturgeon and broodstock selection. *Exp. Animal Biology*, 1, 1.
20. Williot, P.; Chèvre, P., 2011. Reproduction of the cultured brood fish. In: *Biology and Conservation of the European Sturgeon Acipensersturio* L. 1758. P. Williot et al. (eds.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 439-448.
21. Williot P, Brun R, Rouault T, Rooryck O. 1991. Management of female breeders of the Siberian sturgeon, *Acipenserbaeri* Brandt: first results. In: Williot P (ed) *Acipenser*. Cemagref, Antony, pp. 365–379

Раздел 2. Изучение сигнальных процессов созревания, овуляции и активации яйца рыб

2.1. Введение

Созревание *in vitro* воспроизведено у многих видов костистых рыб, как под влиянием гонадотропных, так и стероидных гормонов (Nagahama, Yamashita, 2008). Овуляция изучена значительно меньше и плохо воспроизводится *in vitro* (Скоблина, 2009), в ряде случаев необходимые для ее воспроизведения посредники (простагландины E2 или F2альфа) не синтезируются клетками яичника *in vitro*, их приходится добавлять в среду инкубации. Созревание и овуляция и могут считаться полноценными только в том случае, если овулировавший ооцит способен к оплодотворению и зародышевому развитию. Пока описано лишь четыре случая полноценного созревания и овуляции ооцитов рыб *in vitro*: овуляция ооцитов осетровых рыб (Goncharov et al., 2009; Скоблина, Гончаров, 2012) и овуляция ооцитов японского угря (Abe et al., 2010). Зародыши осетровых рыб, полученные из ооцитов, овулировавших и осемененных *in vitro* вылуплялись и переходили на внешнее питание (Goncharov et al., 2009; Скоблина, Гончаров, 2012), зародыши угря, не переходя на внешнее питание, погибали (Abe et al., 2010). При инкубации фолликулов вьюна в среде 199, содержащей 20% СКРС, ооциты созревали и овулировали и после осеменения 55% достигали стадии формирования сомитов (Саат, 1982). Ооциты медаки, (*Oryzias latipes*) овулировавшие *in vitro* под влиянием рекомбинантного гонадотропина, после осеменения погибали на стадии бластулы (Ogiwara et al., 2013)

Трудности воспроизведения созревания и овуляции ооцитов рыб *in vitro*, вероятно, в значительной мере связаны с тем, что для осуществления этих процессов нужны различные условия. Так, показано, что для созревания окруженных фолликулярными оболочками ооцитов осетровых рыб под влиянием гонадотропных гормонов необходимо или увеличение моляльности среды (по сравнению с моляльностью растворов, в которых созревают ооциты большинства других животных) (Гончаров и др., 1997) или присутствие достаточной концентрации ионов бикарбоната (Гончаров, 1978). С этой целью разработана специальная среда – раствор Рингера, модифицированный для осетровых - РМО (Гончаров, 1978). Однако в этой среде редко наблюдается овуляция. С другой стороны, для осуществления овуляции ооцитов осетровых рыб необходимо или снизить моляльность среды (Goncharov et al., 2009) или снизить содержание в ней ионов бикарбоната (Скоблина, Гончаров, 2012). Несовпадение условий, необходимых для созревания и овуляции ооцитов, наблюдается, вероятно, и у данио. Пока авторам работ на данио не удалось, найти условия, в которых овуляция совмещается с полноценным созреванием ооцита: они создают условия для полноценного созревания цитоплазмы ооцита (90% среда Лейбовитца с рН=9) а для того, чтобы сделать возможным оплодотворение, таких ооцитов фолликулярные оболочки удаляют пинцетами (Guan et al., 2008). Учитывая размер ооцитов медаки (0.65 мм), для

получения достаточного для опытов количество материала, необходима очень большая дополнительная работа.

Трудность другого рода представляет разработка среды для индукции овуляции для тех рыб у которых при попадании зрелых ооцитов во внешнюю среду происходит их быстрая «спонтанная» активация. Однако данные о присутствии ингибиторов протеаз в сыворотке крови и полостной жидкости (Garczynski, Goetz, 1997; Coffman, Goetz, 1998; Coffman et al., 2000), подавляющие спонтанную активацию (Минин, Озерова, 2008) дает надежду на успех в разработке соответствующей среды.

В последние годы появились данные о том, что механизм овуляции ооцитов медаки не связан с увеличением количества простагландинов в полостной жидкости, а определяется увеличением рецепторов к простагландину EP4в на самых крупных фолликулах (Fujimori et al., 2011; 2012). Существует ли сходный механизм овуляции ооцитов у других рыб, представляет большой интерес, но требует разработки методов стимуляции овуляции их ооцитов *in vitro*.

2.2. Исследования на вьюне.

2.2.1. Материалы и методы

Опыты проведены в январе–мае на фолликулах (окруженных фолликулярными оболочками ооцитах) 16 самок вьюна. Отловленных поздней осенью и в начале зимы самок и самцов содержали отдельно в аквариумах с отстоянной водой в холодильнике при 4°C. Размеры самок составляли от 17 до 22 см. Яичники извлекали из самок, и переносили в охлажденную до 4°C 75% среду Лейбовитца (Л75). Все операции с рыбами проводили в соответствии с требованиями комиссии по биоэтике ИБР РАН. Каждый яичник разделяли отточенными пинцетами на фрагменты, содержащие 5–15 фолликулов, под биноклем отсчитывали обычно по 100–150 фолликулов и переносили их в чашки Петри с 5 мл среды. После того, как накапливалось число чашек, необходимое для конкретного опыта, их одновременно ставили в термостат с 16–17°C. В это время фолликулы переносили в среды, влияние которых исследовали в опыте. Мы использовали несколько сред инкубации: среду 199, среду Л75 (рН 7.7), (исходную среду Лейбовитца разводили водой 3 : 1), среду Л75 с 1 г/л NaHCO₃ (рН 7.8) (Л75б), среду Л75 с рН, доведенным до 9 добавлением 1 N раствора NaOH (Л75, рН 9), 90% среду Лейбовитца (Л90, рН 7.7) (Л90), среду Л90 с 1 г/л NaHCO₃ (рН 7.8) (Л90б), среду Л90 с рН, доведенным 1 N раствором NaOH до 9.0 (Л90, рН 9). Кроме того, в среды добавляли либо 20% сыворотки крупного рогатого скота (СКРС), либо 10 или 20% полостной жидкости (ПЖ) вьюна или 20% ПЖ карпа, а к среде Л75 с бикарбонатом натрия кроме того и фетальную сыворотку. рН сред измеряли после добавления в них) СКРС или ПЖ. Во все среды добавляли гентамицин (100 мкг/мл). Для стимуляции созревания и овуляции использовали прогестерон (П) (Sigma) и в некоторых опытах хорионический гонадотропин человека (ХГ) (Московский эндокринный завод). Прогестерон

использовали в концентрации 1 мкг/мл. ХГ - в концентрации 25 МЕ/мл. Гормональные препараты добавляли непосредственно перед помещением чашек с фолликулами в термостат. СКРС (ПанЭко), ПЖ вьюна (10–20%) или карпа (20%) обычно добавляли через 30 мин после гормональных препаратов. Изменение времени их внесения отмечено в результатах. Приготовление полостной жидкости вьюна описано ранее (Минин, Озерова, 2008). Просмотр чашек для определения начала овуляции обычно начинали через 12–15 ч после начала опыта. Овулировавшие *in vitro* ооциты переносили в чашки Петри с 7.5 мл той же среды, в которой они овулировали, пипеткой отсасывали среду инкубации и осеменяли (Костомарова, Нейфах, 1964). Осеменение проводили в несколько приемов. Первое осеменение – через 1–2 ч после появления первых овулировавших ооцитов, а затем обычно с интервалом в 2 ч. Последнее осеменение - обычно не позже, чем через сутки. Через 2.5–3 ч осемененные ооциты просматривали и удаляли неоплодотворенные (побелевшие) яйца, остальные переносили в чашки Петри с 9 мл воды и ставили в термостат ($t = 16\text{--}17^\circ\text{C}$). Воду в чашках меняли 2–3 раза в сутки, одновременно удаляя погибших зародышей. В первых опытах все развитие проходило в условиях стационарной культуры – в чашках Петри в термостате. В дальнейшем яйца, обычно на стадии гастрюляции, переносили в плавающие инкубаторы и помещали их в аквариум с продувкой. Это позволяло не менять воду в процессе инкубации яиц. Результаты опытов учитывали на стадии дробления (чаще всего на стадии 4 бластомеров, но иногда и на более поздних стадиях дробления), стадии завершения обрастания, стадии сформировавшейся предличинки и стадии вылупления. Учитывали только вылупившихся нормально развитых личинок, Вылупившихся личинок через 5–7 дней после вылупления переносили в разные камеры с продувкой и кормили декапсулированными яйцами артемии. О начале активного питания судили по появлению в кишечнике хорошо видных оранжевых яиц.

2.2.2. Результаты

Влияние разных сред культивирования на созревание и овуляцию ооцитов вьюна *in vitro*, показывает, что наилучше результаты в присутствии СКРС получаются при использовании 75% среды Лейбовитца с рН 9.0 или при добавлении 1 г/л бикарбоната натрия. Однако следует отметить, что достоверность различий невелика из-за высокой вариабельности результатов, полученных на разных самках. Доведение рН среды Лейбовитца до 9 приводит к резкому увеличению всех показателей – от процента овуляции ооцитов до процента вылупившихся личинок. Добавление к среде наряду с прогестероном хориогонина (ХГ) в большинстве случаев увеличивало процент овулировавших ооцитов, но иногда приводило к снижению процента вылупившихся личинок, поэтому в большинстве опытов ХГ не использовали. Исследование влияния сыворотки на качество яиц, созревших и овулировавших *in vivo*, показало, что инкубация в среде, содержащей 20% СКРС, примерно в два раза снижает процент вылупившихся зародышей,

созревших и овулировавших *in vivo*, что позволяет предположить, что 20% СКРС может оказывать повреждающее действие на развитие зародышей. Поскольку инкубация в СКРС оказывала повреждающее влияние на яйца до вылупления зародышей, мы попытались снизить повреждающее действие, сократив время обработки фолликулов (ооцитов) СКРС. Для этого наряду с обычной постановкой, когда сыворотку добавляли через 30 мин после гормональной обработки, ее добавляли также за 3 ч до первого осеменения, за 1 ч до первого осеменения (когда появились первые овулировавшие ооциты) и непосредственно перед первым осеменением. Далее ооциты осеменяли по мере их овуляции, поэтому дальнейшая обработка одинакова во всех случаях.

Опыты показали, что снижение продолжительности обработки СКРС в среде практически не снижает ее повреждающее влияние. В следующей серии экспериментов СКРС заменили на фетальную сыворотку (ФС) и ПЖ вьюна. В качестве среды использовали Л75 с бикарбонатом натрия. До стадии гастрюляции зародыши находились в стационарной культуре, затем были перенесены в плавающие инкубаторы. Кроме того, в этих опытах попробовали проверить способность вылупившихся личинок переходить на активное питание. Оказалось, что процент овулировавших ооцитов у каждой из двух самок сходен при всех использованных добавках. В неразведенной полостной жидкости ооциты овулируют в высоком проценте случаев, но дальнейшее развитие идет плохо. У обеих самок личинки вылупились только после инкубации с 20% ФС и 10 и 20% ПЖ вьюна, большинство из них перешли на активное питание (от 62.5 до 100% от числа вылупившихся). При использовании ооцитов, созревших *in vivo*, практически 100% личинок перешли на активное питание. В наших опытах доведение рН среды Л75 до 9 обычно резко увеличивало процент вылупившихся личинок. Мы попытались выяснить во всех ли средах, увеличивая рН до 9, можно увеличить процент вылупившихся зародышей. Для этого сравнили процент вылупившихся зародышей и зародышей, перешедших на активное питание, в Л75 с бикарбонатом и среде 199 при их исходных значениях рН и при рН, доведенном до 9. Доведение рН до 9 в среде 199 не привело к увеличению процента вылупившихся и перешедших на активное питание личинок у обеих самок.

2.3. Исследования на Данио рерио

2.3.1. Материалы и методы

В опытах использовали беспородных взрослых рыб данио рерио окраски дикого типа размером 35–40 мм. При содержании рыб и получении половых продуктов руководствовались методическими указаниями из книги Westerfield (2000), электронный вариант http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html. Брали яичники у самок, подготовленных для естественного нереста по методике, предназначенной для получения большого количества зародышей. Для этого

самок после естественного нереста содержали отдельно от самцов в течение десяти дней при оптимальных условиях содержания.

Самок данео рерио декапитировали, вырезали яичники и переносили их в 90% среду Лейбовитца со 100 мкг/мл гентомицина, нагретую до температуры 25–26°C. pH среды непосредственно перед использованием доводили 1 N раствором NaOH до 9.0 (Seki et al., 2008). Под биноклем яичники разделяли отточенными иглами на фрагменты, состоящие из 2–10 крупных (диаметром приблизительно 0.65 мм) фолликулов. Кроме них фрагменты содержали по несколько более мелких фолликулов и экстрафолликулярную ткань. В чашку Петри с 90% средой Лейбовитца (5 мл) или со средой Лейбовитца с 20% полостной жидкостью карпа (4 мл 90% среды Лейбовитца и 1 мл полостной жидкости карпа) (pH 8.9) помещали от 30 до 80 крупных фолликулов (в зависимости от размера яичника и количества вариантов опыта). Использовали приблизительно одинаковое число фолликулов в разных вариантах опыта. Все чашки Петри одновременно помещали в термостат и инкубировали при температуре 28°C. Созревание ооцитов стимулировали прогестероном в концентрации 1 мкг/мл (концентрация спирта 0.1%). В контроле добавляли 0.1% 96° спирта. Через 4.5 ч, после добавления прогестерона, когда крупные ооциты становились полностью прозрачными, в соответствующие чашки добавляли простагландин F2 α (“Sigma”) (5 мкг/мл) и чашки вновь помещали в термостат. Пробы просматривали с получасовым интервалом и отбирали овулировавшие ооциты. Из каждого варианта опыта овулировавшие ооциты помещали в отдельную чашку, пипеткой отсасывали среду и добавляли сперму и отстоянную воду (в отношении приблизительно 1 : 50). Для приготовления суспензии спермы вырезанные семенники помещали в небольшой объем охлажденного (4°C) раствора Кортланда и мацерировали с помощью препаровальных игл. В таком виде во влажной камере в холодильнике сперма сохраняла способность к оплодотворению, по крайней мере, в течение дня. Перед оплодотворением проверяли подвижность спермиев под микроскопом. Осеменение проводили по мере овуляции ооцитов, обычно с интервалом 1 ч. Через несколько минут после осеменения воду в чашках заменяли свежей и все чашки помещали в термостат (28°C). Через 1–1.5 ч чашки просматривали и удаляли неоплодотворенные (побелевшие) яйца, остальные переносили в чашку Петри с 9 мл воды и вновь ставили в термостат. Воду в чашках меняли 2–3 раза в сутки, одновременно удаляя погибших зародышей. Зародышей на стадии гастрюляции (или на несколько более поздней стадии) переносили в плавающие инкубаторы, которые помещали в аквариум с продувкой (см. Скоблина, Минин, 2015). Все операции с рыбами проводили в соответствии с требованиями комиссии по биоэтике ИБР РАН.

Доверительные интервалы для долей ооцитов были оценены с помощью on-line калькулятора GraphPad, а различия в долях между группами были протестированы точным тестом Фишера или обобщенной линейной моделью, которая предполагает биномиальное распределение

ошибок, используя статистическое программное обеспечение SAS. Для всех данных использовался двухсторонний тест, за исключением того, когда наблюдаемые доли были равны нулю или единице (в этом случае, истинные доли могут отклоняться только в одном направлении от возможных) (Agresti, Coull, 1998).

2.3.2. Результаты

Во всех опытах в отсутствии прогестерона в среде созревали (становились прозрачными) лишь единичные ооциты. Развитие оценивали, подсчитывая число нормальных зародышей и их процент от числа овулировавших ооцитов на стадии дробления (чаще всего на стадии 4 бластомеров, но иногда и на более поздних стадиях дробления), на стадии сформировавшейся личинки, на стадии вылупления и на стадии перехода личинки на активное питание. В качестве стартового корма использовали TetraMin Baby (Германия). О начале активного питания судили по появлению корма в кишечнике личинок.

Таблица 2.1. Влияние прогестерона (1 мкг/мл), простагландина F2 α (5 мкг/мл) и полостной жидкости карпа (ПЖК, 20%) в 90% среде Лейбовитца с рН 9 на овуляцию *in vitro* ооцитов данео рерио и развитие зародышей после осеменения до перехода на активное питание

№ самки	Гормональная обработка	ПЖК добавлена (+)	Общее число фолликулов	Число (%) овулировавших ооцитов	Число (%) дробящихся зародышей	Число (%) сформированных предличинок	Число (%) вылупившихся личинок	Число (%) личинок, перешедших на активное питание
1	прог	-	54	17 (31)	10 (59)	4(23)	2 (12)	1(6)
	прог+ПГ F2 α	-	41	35 (85)*	20 (57)	19 (54)*	13 (37)*	11 (31)*
	прог	+	50	20 (40)	14 (70)	8 (40)	2 (10)	0
2	прог	-	61	9 (15))	2 (22)	0	0	0
	прог+ПГ F2 α	-	62	30 (48)*	26 (87)*	9 (30)*	9 (30)*	8 (27)*
	прог	+	80	28 (35)	23 (82)	11 (39)	5)18)	3 (11)

3	прог	-	61	8 (13)	4 (50)	1 (12)	1 (12)	0
	прог+ППГ F2 α	-	51	18 (35)*	8 (44)	5 (28)	5 (28)	4 (22)
	прог	+	33	12 (36)	7 (58)	3 (25)	3 (25)	1 (8)
4	прог	-	30	15 (50)	6 (40)	0	0	0
	прог+ППГ F2 α	-	35	25 (71)*	23 (92)	12 (48)	9 (36)	5 (20)
	прог	-	28	22 (78)	19 (86)	6(27)	4 (14)	3 (14)
5	прог	-	32	7 (22)	3 (43)	0	0	0
	прог+ППГ F2 α	-	31	18(58)*	15 (83)	13 (72)	2 (17)	2 (17)
6	прог	-	72	7 (10)	4 (57)	1 (14)	0	0
	прог+ППГ F2 α	-	70	33 (47)*	19 (57)	9 (27)	9 (27)	9 (27)
7	прог	-	65	10 (15)	7 (70)	1 (10)	0	0
	прог+ППГ F2 α	-	77	52 (67)*	37 (71)	14 (27)	14 (27)*	7 (13)
8	прог	-	72	10 (14)	6 (60)	1 (10)	0	0
	прог+ППГ F2 α	-	66	18 (27)*	13 (72)	11 (61)*	11 (61)*	7 (39)*

* $p < 0/05$ по сравнению с контролем в прогестероне.

Опыты по влиянию прогестерона и простагландина F2 α на овуляцию ооцитов дано рерио и на развитие зародышей, полученных после осеменения зрелых овулировавших ооцитов проведены на восьми самках. У всех самок небольшой процент ооцитов овулировал под влиянием прогестерона, а добавление в среду 5 мкг/мл простагландина F2 α достоверно его увеличивало. Процент дробящихся зародышей у самок 1, 3, 6, 7 и 8 не зависел от гормональной обработки, использованной при стимуляции их созревания и овуляции. У самок 2, 4 и 5 процент дробящихся зародышей, полученных из ооцитов, созревших и овулировавших в отсутствии простагландина,

был достоверно ниже, а все зародыши, развившиеся после их оплодотворения, погибли на стадии бластулы.

У всех самок, ооциты которых созрели и овулировали в присутствии простагландина, зародыши достигли стадии активно питающихся личинок (от 13 до 39%). После созревания и овуляции ооцитов в прогестероне стадии перехода на активное питание достигли только 6% зародышей самки 1, 12% зародышей самки 3 в этих условиях достигли стадии вылупившейся личинки, и 10–14% зародышей самок 6–8 – стадии сформированной предличинки. Во всех случаях процент зародышей, достигших соответствующей стадии развития после созревания и овуляции ооцитов при добавлении простагландина был выше, но отличия были достоверными только у половины самок (таблица 2.1.). Влияние полостной жидкости карпа (ПЖК) на овуляцию ооцитов данио рерио и на развитие зародышей, полученных после осеменения зрелых овулировавших ооцитов, проведены на ооцитах самок 1–4 (таблица). Видно, что у всех самок добавление в среду инкубации ПЖК увеличивало процент ооцитов овулировавших под влиянием прогестерона (у самок 2, 3 и 4 – достоверно). Сравнение процента вулировавших ооцитов, стимулированных прогестероном в среде, содержащей ПЖК, с процентом овулировавших ооцитов, стимулированных прогестероном и простагландином, свидетельствует о том, что у тех же трех самок достоверной разницы нет. Добавление в среду ПЖК привело к тому, что у самок 2, 3 и 4 от 8 до 14% зародышей достигли стадии личинки, перешедшей на активное питание, напомним, что после оплодотворения ооцитов, созревших и овулировавших в среде с прогестероном, на активное питание перешло только 6% зародышей одной самки.

2.4. Публикации по теме

1. Скоблина М.Н., А.А. Минин. Гормональная индукция созревания и овуляции *in vitro* ооцитов вьюна и получение яйцеклеток, способных к оплодотворению и развитию // Онтогенез. 2015.Т.46 (3). Р. 198-206.
2. Скоблина М.Н., А.А. Минин. Гормональная индукция созревания и овуляции *in vitro* ооцитов данио рерио (*Danio rerio*) и получение яйцеклеток, способных к оплодотворению и развитию // Онтогенез. 2016.Т.47 (5). Р. 314-319./

2.5. Список цитированной литературы

1. Саат Т.В. Хронология созревания ооцитов вьюна// Онтогенез. 1982. Т. 13. № 3. С. 257–265.
2. Скоблина М.Н. Стимуляция *in vitro* овуляции ооцитов костистых рыб гонадотропными и стероидными гормонами // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 4. С. 245–253.
3. Скоблина М. Н., Б. Ф. Гончаров Стимуляция *in vitro* овуляции ооцитов осетровых рыб прогестероном и гомологичных гонадотропным гормоном гипофиза // Онтогенез. 2012. Т. 43, № 3, С. 185–192.

4. Гончаров Б.Ф. Влияние состава среды культивирования на способность фолликулов осетровых рыб реагировать созреванием на действие гонадотропных гормонов // Вопросы раннего онтогенеза у рыб / Киев: Наукова Думка, 1978. С. 77–78.
5. Гончаров Б.Ф., Полупан И.С., Вийо П., Ле Менн Ф. Влияние состава среды культивирования на созревание ооцитов осетровых рыб, индуцируемое гонадотропным гормоном и прогестероном // Онтогенез. 1997. Т. 28. С. 55–64.
6. Костомарова А.А., Нейфах А.А. Метод отделения бластодермы у зародышей вьюна и возможности его применения // Журн. общ. биол. 1964. Т. 25. № 5. 386–388.
7. Минин А.А., Озерова С.Г. Спонтанная активация яиц рыб предотвращается ингибиторами протеаз// Онтогенез. 2008. Т. 39. № 5. С.1–5.
8. Abe T., Ijiri S., Adachi S., Yamauchi K. Development of an *in vitro* culture system for producing eel larvae from immature ovarian follicles in Japanese eel *Anguilla japonica* // Fish Sci. 2010. V. 76. P. 257–265.
9. Coffman M.A., Goetz F.W., Trout ovulatory proteins are partially responsible for the antiproteolytic activity found in trout coelomic fluid // Biol. Reprod. 1998. V. 59. P. 497–502.
10. Coffman M.A., Pinter J.H., and F.W. Goetz Trout Ovulatory Proteins: Site of Synthesis, Regulation, and Possible Biological Function Biol. Reprod. 2000 62, 928–938
11. Fujimori C., Ogiwara K., Hagiwara A. et al. Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: possible involvement in ovulation // Mol. Cell Endocrinol. 2011. V. 332. P. 67–77.
12. Fujimori C, Ogiwara K, Hagiwara A, Takahashi T. 2012. New evidence for the involvement of prostaglandin receptor EP4b in ovulation of the medaka, *Oryzias latipes*. Mol Cell Endocrinol.; 362(1-2):76-84
13. Garczynski M.A., Goetz F.W.. Molecular characterization of a ribonucleic acid transcript that is highly up-regulated at the time of ovulation in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary. Biol Reprod. 1997. V. 57(4):856-864.
14. Goncharov B.F., Skoblina M.N., Trubnikova O.B, and Vassetzky S.G. 2009 Hormonal Induction of Ovulation In Vitro in Sturgeon Fishes. In Biology, Conservation and Sustainable development in sturgeon fishes. H 175-185, Springer Netherlands
15. Seki S., Kouya T., Tsuchiya R. et al. Development of a reliable *in vitro* maturation system for zebrafish oocytes // Reproduction. 2008. V. 135. P. 285–292.
16. Nagahama Y., Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish // Develop. Growth and Differ. 2008. V. 50. Suppl 1: S195–S219.

17. Ogiwara K., Fujimori C., Rajapakse S., Takahashi T. Characterization of luteinizing hormone and luteinizing hormone receptor and their indispensable role in the ovulatory process of the medaka // PLoS One. 2013. V. 8. № 1. e54482. doi: 10.1371/journal.pone.0054482
18. Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Eugene: University of Oregon Press, 2000 (4th Edition available online).

Раздел 3-4. Сравнительное и экспериментальное изучение сперматогенеза: цитогенетика, возрастные изменения, межклеточные взаимодействия. Изучение механизмов регенерации сперматогенного эпителия

3-4.1. Результаты

Анализ результатов собственных исследований и имеющихся в литературе данных позволил заключить, что популяция клеток Сертоли (КС), от которых в значительной степени зависит формирование и регенерация сперматогенного эпителия у млекопитающих, должна быть отнесена к типу растущих клеточных популяций.

Развитие, дифференцировки, созревание мужских половых клеток идут при прямом и активном участии соматических многофункциональных КС. В гонадах половозрелых млекопитающих КС не циклируют. Поэтому долгое время КС относили к стабильным клеточным популяциям, и часто использовали как своего рода константу при оценке состояния сперматогенной системы в условиях эксперимента или при патологии. По крайней мере, до тех пор, пока целый ряд современных экспериментальных исследований не показал, что при высоком уровне деструкции сперматогенной системы, огромных клеточных потерях, нарушениях плотных межклеточных контактов, при некоторых других стрессовых ситуациях, функционально зрелые КС переходят от состояния квазипокоя к активной пролиферации и размножению. Существенно, что, при этом они полностью не теряют статуса дифференцированных клеток. На разных уровнях – морфологическом, ультраструктурном и иммуноцитохимическом – показано, что терминальная организация КС не претерпевает сколько-нибудь резкой и существенной реконструкции. В целом же вся совокупность данных, касающихся способности постмитотических, функционально зрелых КС переходить к активным делениям, подтверждает известное положение о том, что необратимое блокирование размножения случай довольно-таки редкий и что только клеточные деления нейронов угрожают нарушением и разрушением архитектоники нервной системы (Рапопорт, 1993; Рапопорт и др., 1970). Для сперматогенеза «внеплановые» деления КС, очевидно, не столь фатальны. Наоборот, в гонадах с хаосом и деструкцией митозы и клеточный отбор во многих случаях служат базой для обновления и нормализации пула КС и, как следствие, возможного восстановления нормального течения сперматогенеза.

Модельная система деконденсации ядерного хроматина зрелых сперматозоидов млекопитающих *in vitro* использована для сравнительного изучения особенностей изменений хроматина нативных эпидидимальных спермиев мышей F1 гибридов СВА/С57В16 и мутантных по гену ДНК-полимеразы йота мышей линии 129/IMG в ответ на действие наночастиц золота (НЧЗ) размером 2-3 нм при разных температурах инкубации (23⁰, 37⁰ и 60⁰). Показано, что независимо от температуры инкубации, НЧЗ препятствуют процессу деконденсации хроматина нативных гамет у мышей обеих линий, что соответствует полученным нами ранее данным. В контроле отличия

между спермиями мышей F1 гибридов CBA/C57B16 и линии 129/IMG проявляются только при 60⁰, а после обработки наночастицами золота – при всех использованных температурах инкубации. Это указывает на существование различий в упаковке ДНП-комплекса в спермиях сравниваемых мышей F1 гибридов CBA/C57B16 и линии 129/IMG.

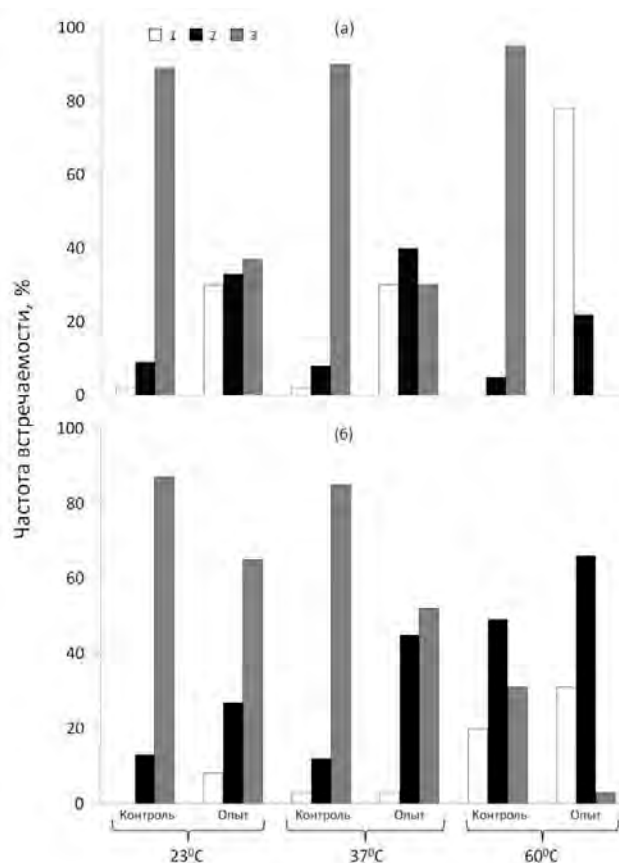


Рис. 3.1. Частота встречаемости недеконденсированных (1), частично деконденсированных (2) и полностью деконденсированных (3) ядер в популяциях эпидидимальных сперматозоидов мышей-гибридов CBA×C57BL/6 (а) и мышей линии 129/IMG (б).

Перспектива практического применения наночастиц золота (НЧЗ) в настоящее время широко обсуждается, что предполагает отсутствие у них способности к повреждениям генетического материала клеток.

Цель выполненного исследования – изучение мутагенного потенциала НЧЗ в опытах с одно- или многократным их введением в сочетании с мутагеном дипином. Использованы половозрелые самцы мышей-гибридов CBA×C57BL/6. Отрицательным контролем служили мыши, которым вводили физиологический раствор, позитивным – мыши, подвергшиеся однократному воздействию дипина. Животных забивали и регистрировали потенциальные хромосомные мутации в популяции округлых сперматид с помощью метода учета микроядер. Показано, что

через 14 сут после завершения последних инъекций в позитивном контроле частота встречаемости округлых сперматид с микроядрами составляла $3.9 \pm 1.1\%$, а в отрицательном - $1.0 \pm 0.3\%$. Однократное введение НЧЗ приводило к увеличению ($6.3 \pm 2.4\%$); а в сочетании с дипином к снижению частоты встречаемости округлых сперматид с микроядрами ($1.9 \pm 0.8\%$). Многократное введение только НЧЗ не приводило к изменению числа округлых сперматид с хромосомными аномалиями ($1.2 \pm 0.4\%$), однако в комбинации с дипином их число значительно увеличивало ($7.0 \pm 1.2\%$).

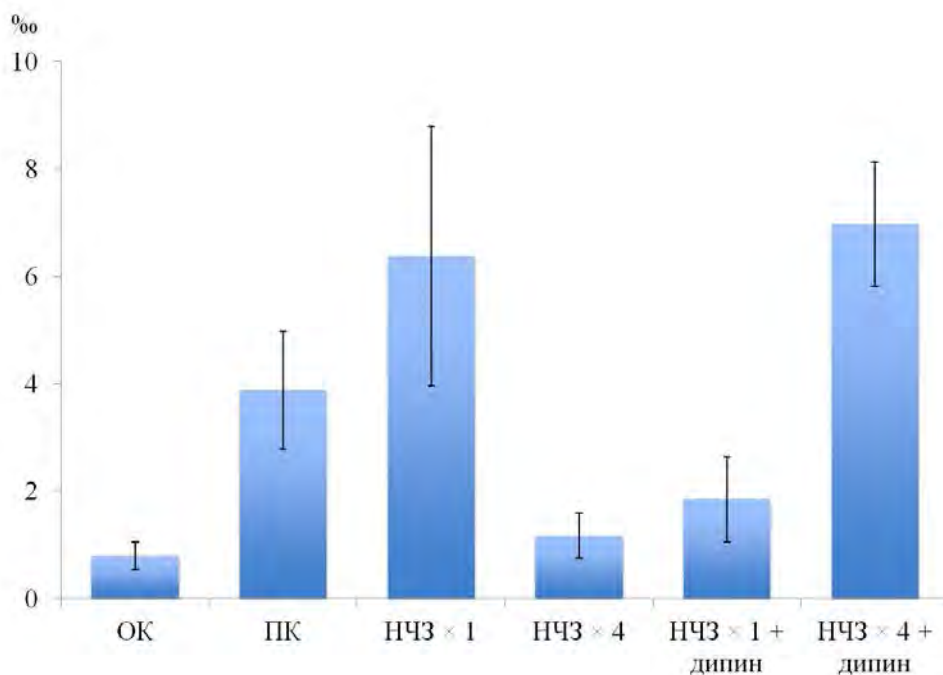


Рис. 3.2. –Мутагенный потенциал НЧЗ в опытах с одно- или многократным их введением в сочетании с мутагеном дипином

Впервые установленная способность НЧЗ проявлять парадоксальные прямые и сочетанные мутагенные эффекты указывает на необходимость тщательного тестирования условий их возможного медицинского (или фармакологического) использования. Исследовали мутагенный потенциал НЧЗ в опытах с одно- или многократным их введением в сочетании с мутагеном дипином, вызывающим хромосомные мутации в популяции округлых сперматид. Однократное введение НЧЗ совместно с дипином снижало вызванные хромосомные мутации, многократное введение НЧЗ не оказывало эффекта. Однако однократное введение НЧЗ, а также многократное введение НЧЗ совместно с дипином значительно увеличивало хромосомные аномалии.

Таким образом, выбранные условия эксперимента продемонстрировали способность ультрамалых НЧЗ проявлять парадоксальные прямые и сочетанные мутагенные эффекты, что прямо демонстрирует необходимость тщательного тестирования условий их возможного медицинского (или фармакологического) использования

Получены первые характеристики организации сперматогенного эпителия у мутантных по гену ДНК-полимеразы йота мышей линии 129/IMG в норме и в процессе восстановления после воздействия химического мутагена дипина. Как *in vivo*, так и *in vitro*, показана способность высококодифференцированных клеток Сертоли переходить из состояния покоя к пролиферации. Наиболее интересное отличие от мышей F1 гибридов состоит в обнаружении в популяции митотически инертных, высококодифференцированных клеток Сертоли этих мышей клеток с тетраплоидным содержанием ДНК.

3-4.2. Публикации по теме

- 1 Захидов С.Т., **Маршак Т.Л.** Экспериментальные доказательства пролиферации и размножения высококодифференцированных клеток Сертоли // Известия РАН. Серия биол. 2015. № 4. С. 350-360.
- 2 Захидов С.Т., Рудой В.М., Дементьева О.В., Муджири Н.М., Макарова И.В., Зеленина И.А., Андреева Л.Е., **Маршак Т.Л.** Влияние ультрамалых наночастиц золота на хроматин нативных спермиев мышей // Известия РАН. Серия биол. 2015. № 6. С. 565–572.
- 3 Захидов С.Т., Павлюченкова С.М., Самойлов А.В., Муджири Н.М., **Маршак Т.Л.**, Рудой В.М., Дементьева О.В., Зеленина И.А., Скуридин С.Г., Евдокимов Ю.М. Хроматин сперматозоидов быков не защищен от действия ультрамалых наночастиц золота // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2013. № 6. С. 645.
- 4 Захидов С.Т., **Маршак Т.Л.**, Л.Е. Андреева, В.М. Рудой, О.В. Дементьева, Н.М. Муджири, С.М. Павлюченкова, И.А., И.В. Макарова. Деконденсация ядерного хроматина зрелых сперматозоидов мышей гибридов CBAxС57Bl6 и мышей линии 129/IMG, мутантных по гену ДНК-полимеразы йота, подвергшихся влиянию наночастиц золота *in vitro* // Цитология. 2014. №9. С. 657. (Материалы Симпозиума «Структура и функции клеточного ядра»).
- 5 Захидов С.Т., Муджири Н.М., И.В. Макарова, Л.Е. Андреева, **Т.Л. Маршак.** Проллиферативные потенции высококодифференцированных функционально зрелых клеток Сертоли // VI Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины. 13-16 октября 2015 г. Ростов- на- Дону, Институт генетики и цитологии национальной академии наук Белоруссии. С. 252.
- 6 Захидов С.Т., Муджири Н.М., Рудой В.М., Зеленина И.А., Дементьева О.В., **Маршак Т.Л.** Ультрамалые наночастицы золота: оценка генетической активности. (Ultrasmall gold nanoparticles. Evaluation of genetic activity // V Съезд биофизиков России. 4-11 октября 2015 г. Ростов-на-Дону, Южный федеральный университет. С. 309.

- 7 Захидов С.Т., Рудой В.М., Дементьева О.В., Муджири Н.М., Павлюченкова С.М., Зеленина И.А., **Маршак Т.Л.**, Андреева Л.Е. Влияние наночастиц золота на процесс искусственной тиоиндуцированной дегенерации ядерного хроматина в зрелых сперматозоидах мышей - гибридов СВАхС57В16 и мышей линии 129/IMG, мутантных по гену ДНК-полимеразы йота. // IV Международная научно-практическая конференция “Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. 2014. S06-13
- 8 Павлюченкова С.М., **Т.Л. Маршак**, С.Т. Захидов. Пролиферация и размножение постмитотических, функционально зрелых клеток Сертоли. // IV Международная научно-практическая конференция “Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. 2014. S05-25.
- 9 Муджири Н.М., **Маршак Т.Л.**, Андреева Л.Е., Макарова И.В., Захидов С.Т. Цитогенетическое изучение сперматогенеза у мутантных мышей линии 129/img, подвергшихся химическому мутагенному воздействию // В сб. трудов научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». 6-7 апреля 2016 г., Москва, С. 126-127.
- 10 Mudzhiri N.M., Zakhidov S.T., Makarova I.V., Andreeva L.E., **Marshak T.L.** Proliferative potencies of highly differentiated Sertoli cells //Proceedings of the 12th International Congress of cell Biology. 21-25 july 2016, Prague, P.322/ Czech Society for cell Biology
- 11 Захидов С.Т., Муджири Н.М., Рудой В.М., Дементьева О.В., Зеленина И.А., **Маршак Т.Л.** Прямые и комбинированные действия наночастиц золота на генетические структуры мужских половых клеток мышей // Материалы III Международной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», посвященной 115-летию со дня рождения академика А.Р. Жебрака. 23-25 ноября 2016 г. С.110.

Раздел 5. Изучение регенерационных свойств клеток Сертоли взрослых животных

5.1. Введение

Клетки Сертоли(КС) –поддерживающие клетки сперматогенной системы, являются основой структуры семенных канальцев, образуют нишу для стволовых клеток, поддерживают развитие дифференцирующихся мужских половых клеток, создают гематотестикулярный барьер. Различные внешние воздействия, такие как нарушение сперматогенеза после химиотерапии, инфекционные заболевания, травмы яичка, часто являются причиной гибели или нарушения функционирования большей части КС, что в свою очередь приводит к снижению фертильности и мужскому бесплодию, которое, по данным ВОЗ, в настоящий момент составляет до 30-40% всех случаев бесплодия (Bayasgalan *et al.*, 2004). Во взрослом организме КС представляют собой невозобновляемую популяцию клеток, поэтому их повреждение всегда приводит к необратимым нарушениям сперматогенеза, которые не могут быть исправлены методами современной медицины. Однако в неонатальном и препубертатном периодах развития КС еще не дифференцированы и активно пролиферируют, а также обладают высоким регенерационным потенциалом. При трансплантации в семенник (Shinohara *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009), а также эктопически, под кожу (Dobrinski,2007) КС, полученные от неполовозрелых животных, способны агрегировать с образованием семенных канальцев, так, как это происходит в ходе эмбрионального развития, и формировать микроокружение для трансплантированных совместно с ними половых клеток. Далее донорские КС дифференцируются и поддерживают развитие половых клеток вплоть до образования жизнеспособных гамет. Эти свойства недифференцированных КС могут быть применены для восстановления ткани яичек после различных патологий, приводящих к гибели не только половых клеток, но и КС. Для проверки этого предположения нами использованы две модели комплексного нарушения семенников. Первая модель – инфицирование семенников мыши вирусом простого герпеса – имитирует патологии яичек инфекционной природы. Вторая – двусторонний абдоминальный крипторхизм неполовозрелых крыс – имитирует крипторхизм человека, когда в результате неопущения яичек в мошонку в них повышается температура, что, в частности, приводит к дефектам в дифференцировке КС и их неспособности поддерживать развитие половых клеток (Nistal *et al.*, 2013).

Однако более интересным с фундаментальной точки зрения и более важным с практической является поиск путей для повышения регенерационного потенциала КС взрослых организмов. Известно, что КС, полученные от половозрелых животных, не способны к регенерации сперматогенной ткани после трансплантации (Shinohara *et al.*, 2003), но недавние работы продемонстрировали возможность их пролиферации и дедифференцировки в некоторых экспериментальных условиях. Так, повышение температуры приводит к разборке

гематотестикулярного барьера, являющегося одним из отличительных признаков дифференцировки КС (Zhang *et al.*, 2004). Длительное изменение гормонального фона в организме (Tarulli *et al.*, 2013), а также выведение КС в культуру (Ahmed *et al.*, 2009) приводит к их вступлению в клеточный цикл, что также является признаком дедифференцировки клеток. Однако регенерационные свойства таких дедифференцированных КС до сих пор изучены не были. Для восполнения этого пробела нами проведено всестороннее изучение КС половозрелых мышей, выведенных в культуру, и исследованы их регенерационные свойства.

5.2. Материалы и методы

Объекты исследований

В работе использованы мыши линий C57Bl6/J6, C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)1Osб/J (GFP), экспрессирующих GFP под промотором гена бета-актина, B6,129-TgR(ROSA26)26Sor(ROSA26), экспрессирующих ген *Escherichia coli*X-Gal (β -галактозидаза) во всех клетках и крысы линии Вистар. Животные содержались в стандартных условиях вивария, получая воду и пищу *adlibitum*.

Инфицирование семенников ВПГ

Для инфицирования семенников мышей применяли референс штамм F ВПГ-1, полученный из Государственной коллекции вирусов при ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития РФ. Для пассирования и титрования ВПГ использовали перевиваемую культуру клеток Vero. Для инфицирования семенников мышей использовали методику введения жидкости непосредственно в сеть семенника (Ogawa *et al.*, 1997). В каждый семенник вводили по 15 мкл вирусосодержащей жидкости.

Моделирование двустороннего абдоминального крипторхизма

Для операции были использованы 15 сут неполовозрелые самцы Вистар. После наркотизации животного выполняли нижнесрединную лапаротомию. Семенник выводили в операционную рану. Проводили фиксацию семенника к париетальной брюшине передней брюшной стенки за край капсулы нитями с помощью атравматической иглы. После выполнения аналогичной фиксации семенника с другой стороны операционная рана передней брюшной стенки послойно зашивалась.

Получение суспензии клеток для культивирования или трансплантации

Для получения клеток в различных экспериментах были использованы семенники половозрелых 2-3-месячных мышей, 2-4-суточных мышат, а также 10-суточных крысят. Семенники выделяли, снимали оболочку, а затем инкубировали в растворе коллагеназы IV (0.7 мг/мл) и ДНКазы I (0.04 %) 15 мин, при 34 °С. По окончании инкубации большая часть клеток интерстициальной ткани семенника оказывалась в растворе. Семенные каналы, содержащие КС, перитубулярные мышечные клетки (ПМК) и половые клетки отмывали от клеток интерстиция. Для получения суспензии клеток каналы помещали в раствор трипсина (0.25 %) с 1 мМ ЭДТА (Sigma) на 15

мин, при 37 °С, затем отмывали и разбивали на отдельные клетки. Полученную клеточную суспензию использовали для трансплантаций или помещали в 2D и 3D-культуру.

Культуры клеток

Клетки культивировали на чашках покрытых матригелем, при 37°С в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM:F12 с 5% фетальной бычьей сыворотки FBS (HyClone, США). Через 24 ч культуры промывали, убирая не прикрепившиеся клетки, и культивировали далее на среде, содержащей 1% FBS. Для получения 3D-культур клетки из 2D-культуры снимали трипсином и помещали в коллагеновый гель одни или вместе с клетками семенников мышонка. Гели культивировали, затем, на фильтрах на разделе фаз жидкость-воздух в бессывороточной среде с 15% KSR.

Иммунофлуоресцентная окраска клеток в коллагеновом геле

Коллагеновые гели с клетками внутри фиксировали в 4%-ном ПФА в течение 12 мин, промывали PBS, помещали на 30 мин в блокирующий раствор и далее инкубировали ночь при 4°С в смеси первичных антител. После 30-минутной промывки в PBS гели инкубировали с соответствующими вторичными антителами при 37°С в течение 1.5 ч. Ядра клеток подкрашивали ТОТ03. Препараты просматривали и фотографировали на конфокальном микроскопе.

Иммунофлуоресцентная окраска срезов семенников

На криотоме Leica CM1900 готовили криосрезы (4 мкм толщиной) семенников. Срезы фиксировали в 4%-ном ПФА в течение 12 мин, промывали PBS и инкубировали в течение 30 мин при 37°С в блокирующем растворе. Далее срезы помещали в первичные антитела на 2 ч при 37°С. После промывки в PBS срезы инкубировали при 37°С в течение 30 мин с соответствующими вторичными антителами. Ядра клеток подкрашивали DAPI. Срезы просматривали и фотографировали на эпифлуоресцентном микроскопе Keyence BZ-9000.

Выявление ДНК ВПГ методом гибридизации

Семенники мышей после инокуляции ВПГ фиксировали в 4%-ном ПФА в течение суток, затем после стандартной гистологической проводки заключали в парафин и готовили гистологические срезы. Срезы депарафинировали в ксилоле, проводили через спирты в нисходящей концентрации и промывали в дистиллированной воде. Далее срезы обрабатывали 3%-ной перекисью водорода в течение 15 мин, протеиназой К – в течение 1,5 мин, раствором глицина – 5 мин, 4%-ным ПФА – 5 мин, снова раствором глицина – 5 мин; проводили через спирты в восходящей концентрации и высушивали. Затем на срезы наносили биотинилированный зонд ДНК ВПГ (Enzo Life Sciences, США), разведенный в гибридизационном буфере (Enzo Life Sciences) до концентрации 1 мкг/мл, и накрывали их покровными стеклами. Гибридизацию проводили на гибридайсере Biometra Thermocycler T1; условия проведения реакции: 95°С – 5 мин, 37°С – 18–20 ч. Для иммуногистохимической детекции зонда ДНК ВПГ применяли набор Ultra Sensitive Enhanced Hrp-DAB in situ detection system (Enzo Life Sciences) в соответствии с рекомендациями производителя.

5.3. Результаты

5.3.1. Восстановление сперматогенной ткани с помощью трансплантации КС на модели нарушения сперматогенеза в ходе вирусной инфекции

Анализ воздействия вируса простого герпеса (ВПГ) на семенники мышей показал, что первые сигналы ДНК ВПГ, по данным гибридизации *in situ*, появлялись в семенниках на 2 и 3 сут инфекции в небольшом количестве семенных канальцев, они локализовались в ядрах сперматоцитов, некоторых округлых сперматид (рис. 1 А) и КС (рис. 5.1 Б). Более сильные сигналы вирусной ДНК детектировали на 6 сут инфекции в ядрах КС, сперматогониев и сперматоцитов. ДНК ВПГ была выявлена также в отдельных удлиняющихся сперматидах (рис. 5.1 В). В поздний период инфекции (45 сут) вирусная ДНК присутствовала в ядрах некоторых КС и интерстициальных клеток (рис. 5.1 Г). По данным иммунофлуоресцентного анализа, вирусный белок обнаруживался во всех слоях сперматогенного эпителия (рис. 1 Д), а также в отдельных КС (рис. 5.1 Е). Доля канальцев, содержащих белок ВПГ, достигала максимума на 6 сут (23,5%) и далее снижалась; на 21 и 45 сут вирусный белок не выявлялся. Начиная с 14 сут после заражения, масса семенников значительно снижалась по сравнению с контролем: к 45 сут – в 7,9 раз (рис. 5.1 Ж). Доля морфологически нормальных канальцев снижалась до 6% на 14 сут после введения вируса и продолжала оставаться на низком уровне вплоть до 45 сут (рис. 5.1 З). Гистологический анализ показал, что под действием ВПГ развивался орхит и происходили значительные деструктивные изменения в сперматогенной ткани (рис. 5.2 А-Г). Приблизительно в половине семенных канальцев (46,5%) погибали КС (на рис. 5.2 Е у контрольных животных по периметру всех канальцев присутствуют зеленые ядра КС, тогда как у инфицированных животных (З) в части канальцев нет КС).

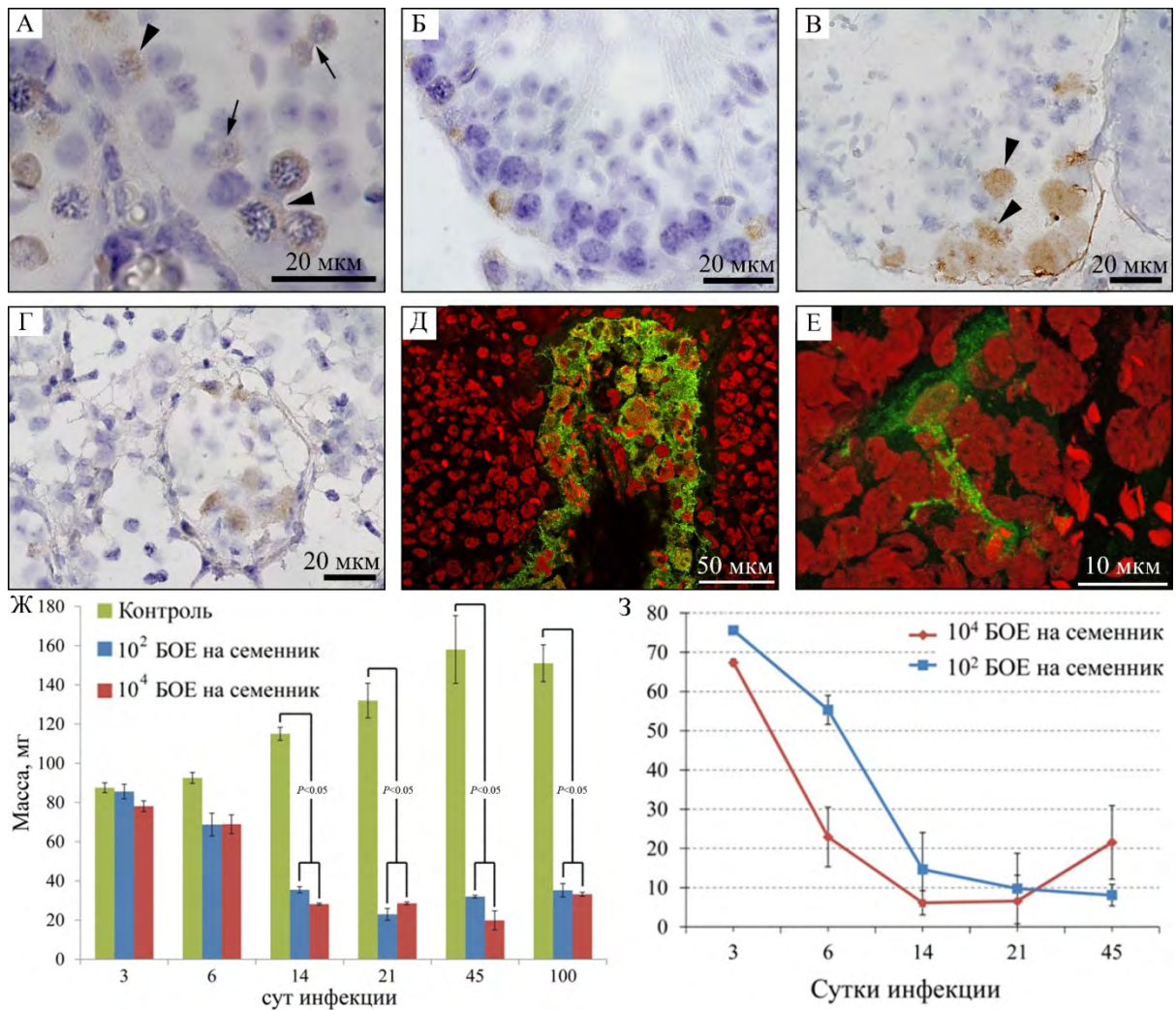


Рис. 5.1. А-Г - локализация ДНК ВПГ в семенниках методом гибридизации *in situ* (А,Б – 3 сут, В – 6 сут, Г – 45 сут ВПГ-инфекции). Коричневая окраска – гибридизационный сигнал, ядра клеток докрашены гематоксилином. Головки стрелок – сперматоциты, стрелки – округлые сперматиды. Д, Е - локализация белка ВПГ в семенниках на 6 сут инфекции(конфокальная микроскопия). Белок ВПГ присутствует в атрофированных семенных канальцах (Д), единичных КС(Е). Иммунофлуоресцентная окраска криосрезов семенников поликлональными антителами Anti-HSV1 (зеленый). Ядра клеток докрашены пропидия йодидом (красный). Ж - изменение массы семенников мышей в ходе ВПГ-инфекции. З - динамика дегенеративных изменений в семенниках, инфицированных ВПГ. По оси ординат: доля нормальных канальцев, %. По оси абсцисс: время после заражения, сутки. По материалам статей Малолина и др., 2013, Malolinaetal., 2014.

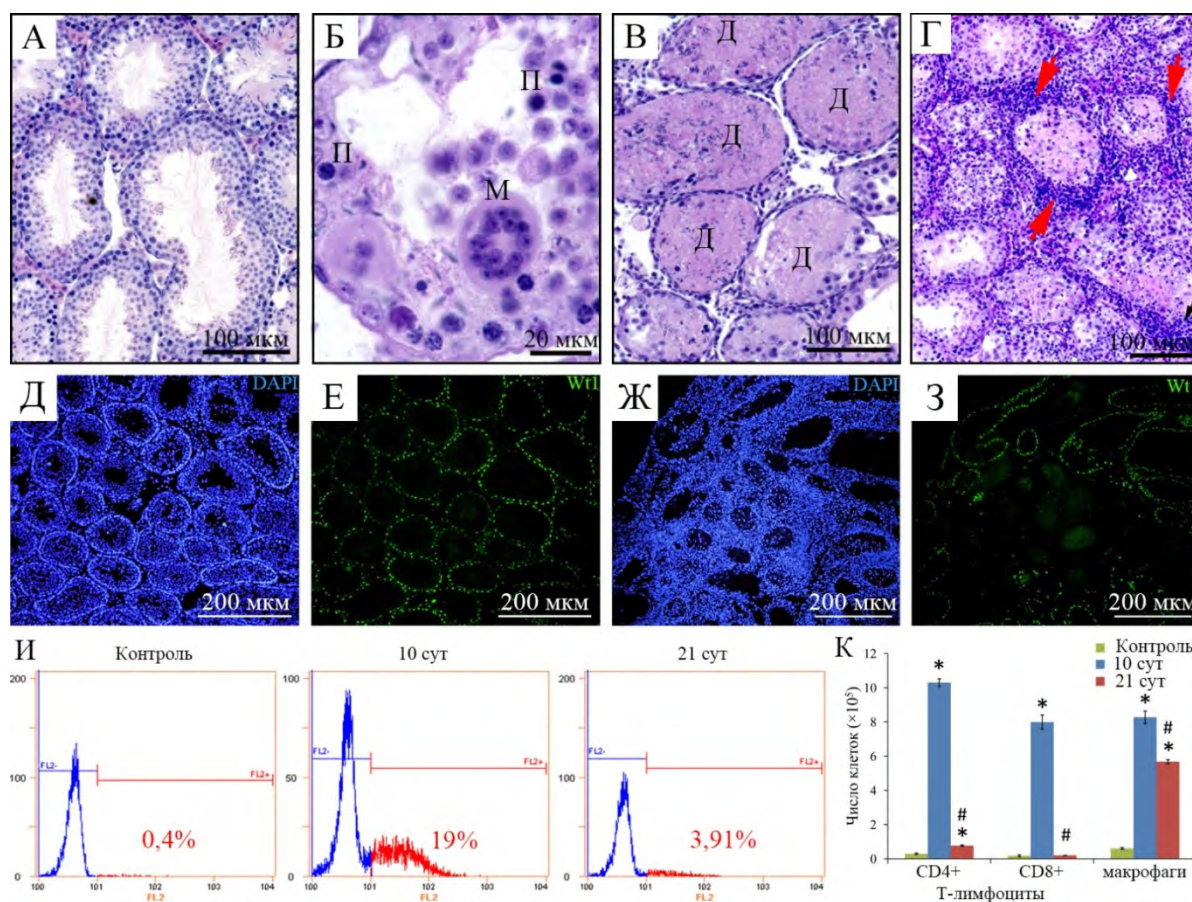
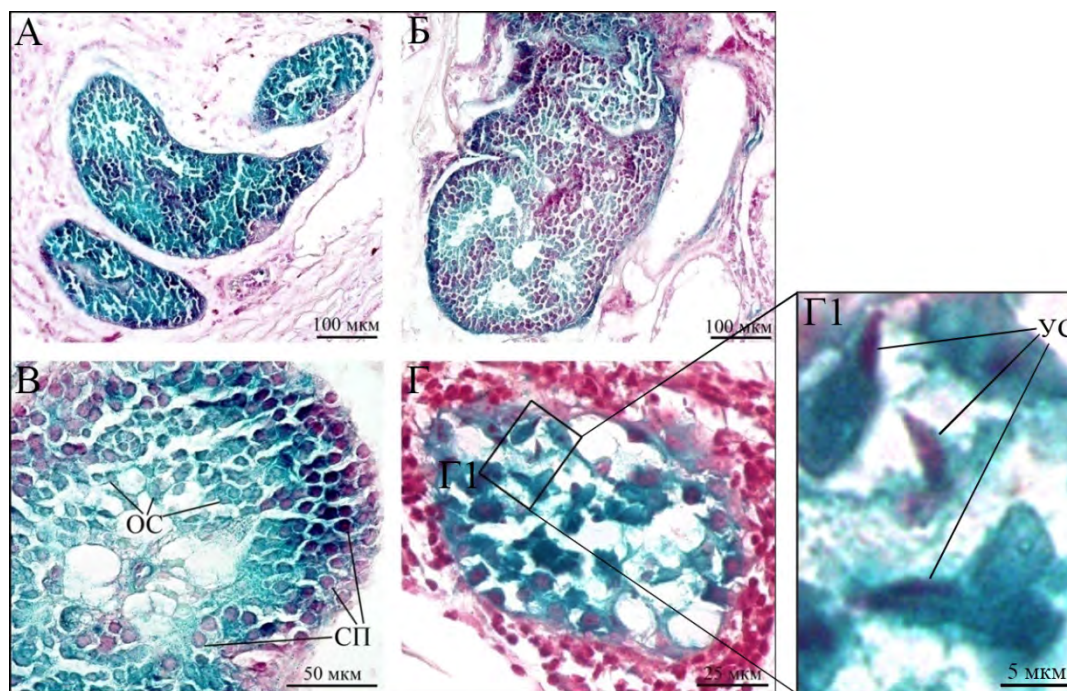


Рис. 5.2. А-Г - морфологические изменения в семенниках при ВПП-инфекции. А - срез семенника контрольной мыши, Б-Г - срезы семенников мышей на 6-10 (Б, Г), 14-21 (В) сут инфекции. Д – клеточный дебрис, М – гигантские многоядерные сперматиды, П – пикнотические ядра, Стрелки - лейкоцитарные инфильтраты. Окраска: гематоксилин и эозин. Д-З - гибель КС в семенниках при ВПП-инфекции. Д, Е - срезы семенников контрольных мышей и Ж, З - мышей на 14 сут инфекции. Иммунофлуоресцентная окраска против маркера КС Wt1 (зеленый). Ядра клеток докрашены DAPI (синий). И, К - цитофлуориметрический анализ воспаления в инфицированных ВПП семенниках. И - репрезентативные гистограммы, полученные при анализе CD4⁺ клеток, по оси ординат: число клеток, по оси абсцисс: уровень флуоресценции; синим показаны не окрашенные клетки, красным – окрашенные клетки; указано число CD4⁺ клеток в процентах от общего числа клеток в интерстиции. К - динамика изменения числа лейкоцитов в ходе ВПП-инфекции, * – отличие от контроля статистически значимо (p<0.05, критерий Манна–Уитни); # – отличие от 10 сут инфекции статистически значимо (p<0.05, критерий Манна–Уитни). По материалам статей Малолина и др., 2013, Malolina *et al.*, 2014.

Для более полной характеристики воспалительного процесса в инфицированных семенниках с помощью проточной цитофлуориметрии оценили содержание лейкоцитов (рис. 5.2. И). Установили, что на 10 сут инфекции число CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитов и макрофагов в инфицированных семенниках в

десятки раз выше, чем в контрольных. На 21 сут число $CD8^+$ Т-лимфоцитов снижалось до контрольного уровня, число $CD4^+$ Т-лимфоцитов также значительно снижалось, в то же время содержание макрофагов продолжало оставаться высоким (рис. 5.2 К). Полученные данные свидетельствуют о том, что при ретроградном пути заражения ВПГ мужских гонад происходят нарушения структуры семенника, гибель половых и соматических клеток, развивается орхит. Все это указывает на необратимость дегенеративных изменений в инфицированных семенниках.



Количественный анализ трансплантаций

Число семенников	Число семенников с трансплантатом (%)	Число новых канальцев (%)	Число новых канальцев с половыми к-ми (%)	Число новых канальцев с крупными спермидами (%)
13	12(92)	17,8±5,5	50,4±10,4	14,2±2,0

Рис. 5.3. Результаты трансплантации клеток семенников неонатальных мышей в семенные каналцы (А, В, Г) и интерстиций (Б) половозрелых животных, получавших ацикловир. Новые семенные каналцы, образованные клетками доноров окрашены в синий цвет (гистохимическая окраска на продукт гена *LacZ*). ОС – округлые сперматиды, СП – сперматоциты, УС – удлиняющиеся сперматиды. срезы докрашены нейтральным красным. По материалам статьи Malolina *et al.*, 2016.

Для восстановления сперматогенеза, нарушенного действием ВПГ, в семенники на 21 сут инфекции трансплантировали клетки семенников неонатальных трансгенных мышей Rosa26, экспрессирующих во всех клетках трансген *LacZ*. Для подавления возможной реактивации ВПГ в ходе операции по трансплантации клеток и последующего отторжения трансплантата мышам вводили противовирусный препарат ацикловир. Через 30 сут после операции проводили анализ результатов трансплантаций. Клетки мышей-доноров были найдены в 12 из 13 проанализированных семенников. Они располагались внутри многих канальцев реципиентов, большей частью по периферии

семенников. КС мышей-доноров формировали новые каналцы внутри старых каналцев реципиентов, как правило, на срез каналца реципиента приходилось по 1–3 новых каналца. В большей части новых каналцев КС поддерживали развитие половых клеток донора. Причем сперматогенный эпителий имел нормальную, правильную организацию, а дифференцировка половых клеток доходила, по крайней мере, до стадии сперматоцитов, а во многих случаях – и до стадии округлых сперматид (рис. 5.3 А, В). В том случае, когда клетки доноров попадали в интерстициальную ткань семенников мышей-реципиентов, они располагались компактно, формируя обособленную структуру, напоминающую по форме и строению новый семенник и часто занимающую большую часть старого семенника (рис. 5.3 Б). Внутри трансплантата КС формировали новые каналцы неправильной формы, часто довольно протяженные. В большинстве их были найдены половые клетки доноров. Дифференцировка половых клеток доходила до стадии сперматоцитов или округлых сперматид. Анализ семенников мышей-реципиентов на отдаленные сроки после трансплантации – 60 и 150 сут – показал, что во многих новых каналцах дифференцировка половых клеток доноров доходила до стадии удлиняющихся сперматид (рис. 5.3 Г), которые являются практически зрелыми половыми клетками и могут использоваться для процедур искусственного оплодотворения.

5.3.2. Восстановление сперматогенной ткани с помощью трансплантации КС на модели нарушения сперматогенеза в ходе экспериментального крипторхизма

На модели экспериментального двустороннего абдоминального крипторхизма у крыс была исследована возможность восстановления сперматогенеза после трансплантации в интерстициальную ткань поврежденных семенников КС, полученных из семенников неонатальных крысят. Критериями оценки результатов трансплантаций являлись вес семенника, качественный и количественный гистологический анализ состояния сперматогенной ткани. Экспериментальный двусторонний абдоминальный крипторхизм через 3 мес после помещения семенников в брюшную полость приводил к выраженным дегенеративным изменениям во всех семенных каналцах: блоку мейоза, гибели половых клеток вплоть до полной деструкции сперматогенного эпителия в некоторых каналцах (рис. 5.4 А-В). Средний вес семенников на момент проведения орхипексии и трансплантации клеток составлял (280 мг, группа К1). Через 1 мес и 3 мес после низведения семенников и трансплантации КС (группы О-1 и О-3) их вес увеличивался соответственно до 522 и 528 мг, что было статистически достоверно выше, чем у крыс из контрольных групп (рис. 5.4 Д). Трансплантация КС приводила к полному восстановлению сперматогенеза в значительной части семенных каналцев (33.7 и 37.5 % через 1 и 3 мес после трансплантации соответственно), в то время как у животных из контрольных групп такие каналцы практически отсутствовали (рис. 5.4 Г, Е). Необходимо отметить, что в этом случае восстановление сперматогенеза происходило за счет собственных КС и половых клеток реципиентов, а КС доноров, инъецированные в

интерстиций семенника, способствовали восстановлению собственного сперматогенеза реципиентов за счет паракринных воздействий.

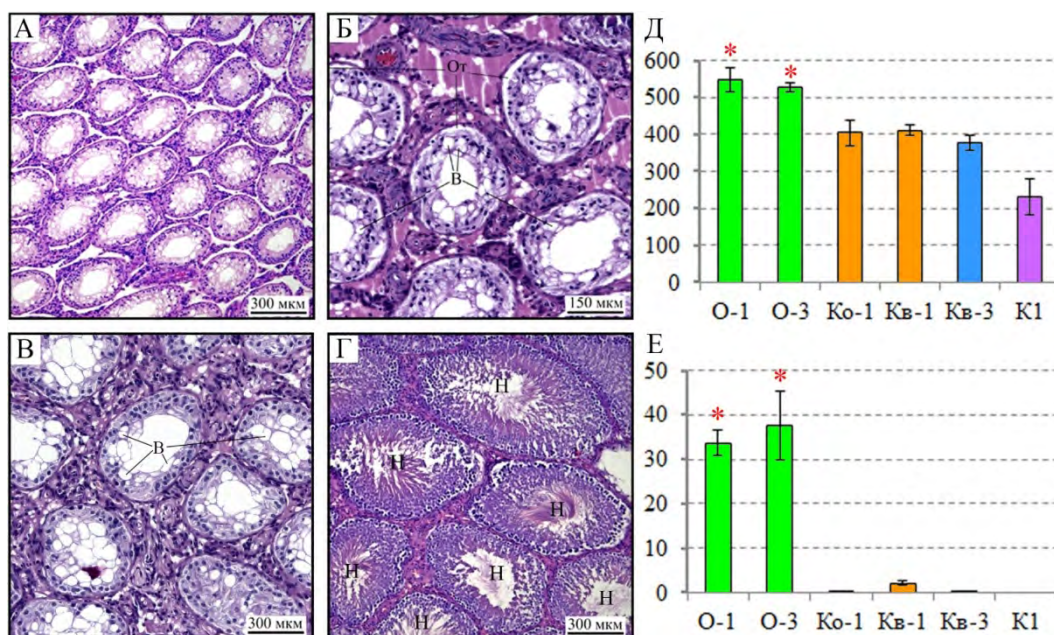


Рис. 5.4. А - гистологические срезы семенников крыс после 120 сут крипторхизма – контрольная группа К1, Б – после 90 сут крипторхизма и через мес после орхипексии – контрольная группа КО-1, В - после 90 сут крипторхизма и через мес после орхипексии и введения среды без клеток – контрольная группа Кв-1, Г - гистологические срезы семенников крыс через 3 мес (Г) после орхипексии и введения среды с неонатальными КС – опытная группа О-3. В – вакуоли в сперматогенном эпителии, Н – каналцы с полностью восстановившемся сперматогенезом, присутствуют все типы сперматогенных клеток их расположение и количество соответствует норме, О – опустошенные каналцы почти не содержащие половых клеток, От – отслоение клеток от стенки каналца. Окраска гематоксилин-эозин. Д - вес семенников в опытных и контрольных группах крыс. Данные представлены в виде Сред. ± SEM. * – средний вес семенников в опытных группах статистически достоверно выше, чем в контрольных при $P < 0.05$. Е - доля каналцев, содержащих все типы дифференцирующихся половых клеток. * – среднее число каналцев с полностью восстановившимся сперматогенезом в опытных группах животных статистически достоверно выше, чем в контрольных при $P < 0.05$. По материалам статьи Кулибин и др., 2015.

5.3.3. Изучение КС, полученных из семенников половозрелых мышей и выведенных в культуру

Анализ результатов культивирования КС, полученных из семенников половозрелых мышей, показал, что в процессе культивирования КС формировали колонии мелких, активно делящихся клеток. Кроме того, в культуре присутствовали отдельно лежащие не пролиферирующие КС. Клетки в колониях имели морфологию ядра, схожую с таковой у недифференцированных КС мышонка (много мелких гетерохроматиновых глыбок в ядре), в то время как отдельно лежащие КС имели морфологию ядра, близкую к дифференцированным КС взрослых животных (более крупное ядро, содержащее 2 гетерохроматиновые глыбки) (рис. 5.5 А1,2).

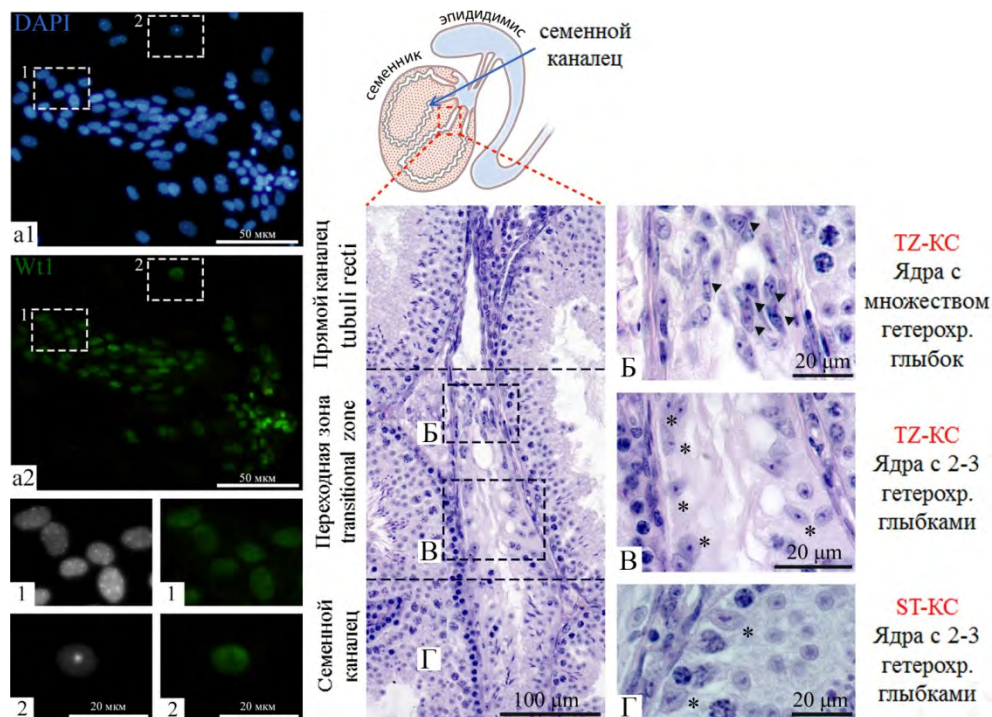


Рис. 5.5. А1,2 – культура КС половозрелой мыши. Часть $Wt1^+$ КС с измененной морфологией ядра формирует колонии в культуре (TZ-КС), часть, с неизменной морфологией, располагается в виде отдельных клеток (ST-КС). Схема семенника, увеличен участок извитого семенного канальца (Г) и его концевой отдела – транзитной зоны (Б, В) впадающей в прямой каналец - часть выносящей системы семенника – *retetestis*. По материалам статей Кулибин А.Ю., Малолина Е.А., 2013; Kulibin A. Yu., Malolina E. A., 2016.

Дальнейшие исследования показали, что КС с измененной морфологией ядра не образуются в культуре из КС с обычной морфологией, а уже присутствуют в ней с 1 сут культивирования, *in vivo* эти КС располагаются в концевых отделах семенных канальцев (в т.н. переходной зоне, transitional zone, TZ), в месте их перехода в сеть семенника *retetestis* (рис. 5.5). В количественном отношении доля КС с модифицированной морфологией в семенниках намного ниже, чем с обычной, но их пролиферативный потенциал в культуре значительно больше. Это подтвердилось результатами раздельного культивирования КС, полученных из семенных канальцев, и КС, полученных из переходной зоны. В первом случае образования колоний не наблюдается, во втором – формируются большие колонии, окрашивающиеся на маркеры КС $Wt1$ и $Sox9$ (рис. 5.6 А2,3, Б2,3).

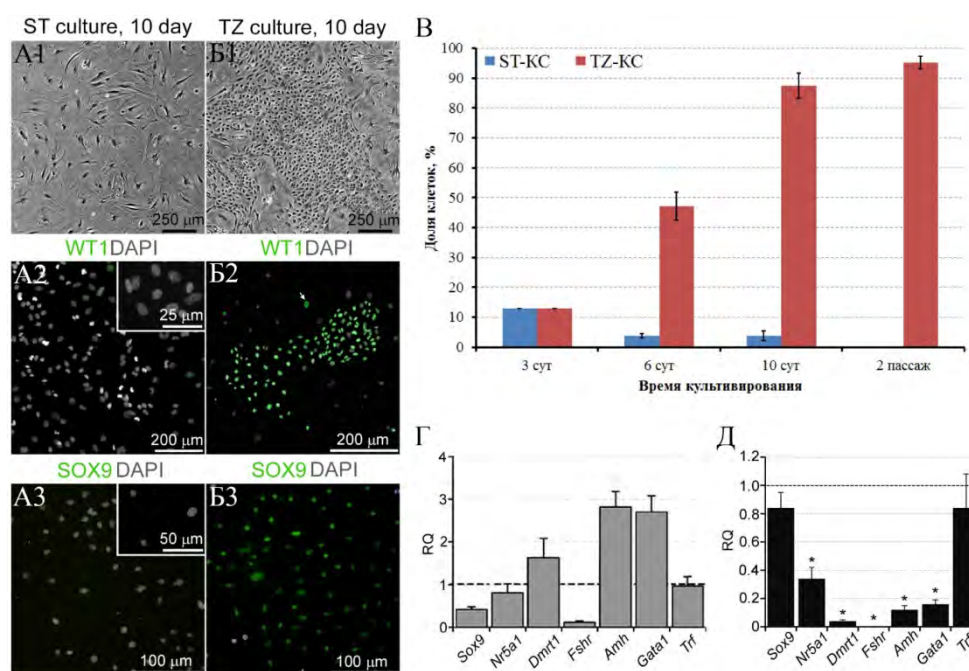


Рис. 5.6. A1, B1 – внешний вид культур ST-КС и TZ-КС на 10 сут культивирования (фазовый контраст), в культуре TZ-КС видна большая колония, образованная КС, A2, B2 – окраска на маркер КС -Wt1, A3, B3 – окраска на маркер КС– Sox9, В – динамика изменения концентрации КС в культурах STи TZ-клеток, Г, Д– результаты ПЦР РВ анализа экспрессии маркеров КС в клетках из TZ-культуры на 10 сут нулевой пассаж (Г) и второй пассаж (Д) (пунктир – уровень экспрессии в клетках из TZ-культуры на 2 сут). Данные ПЦР-анализ указывают, что TZ-КС, образующие колонии, по профилю экспрессии маркеров занимают промежуточное положение между недифференцированными КС мышонка и дифференцированными ST-КС взрослой мыши. По материалам статьи Kulibina A.Yu., Malolina E.A., 2016.

Помещение TZ-КС в коллагеновый гель после 10 сут культивирования показало, что они способны формировать небольшие каналцевые структуры *de novo*, похожие на каналцы, образуемые КС неонатальных животных (рис. 5.7 А-Г), в отличие от ST-КС, которые не формировали каналцевых структур (рис. 5.7 Д). При совместном культивировании в 3D условиях TZ-КС, полученных от трансгенных GFP мышей, и клеток семенника мышонка GFP⁺TZ-КС принимают участие в формировании семенных каналцев, что свидетельствует о функциональности TZ-КС (рис. 5.7 Е-К) и только единичные GFP⁺ST-КС входят в состав каналцев, сформированных клетками мышонка (рис. 5.7 Л). Таким образом, полученные результаты показывают, что популяция клеток, выделенных из переходной, транзитной зоны семенника половозрелой мыши, является источником недифференцированных КС, которые можно поддерживать и размножать в культуре, и которые, при помещении в соответствующие условия, способны дифференцироваться и формировать семенные каналцы.

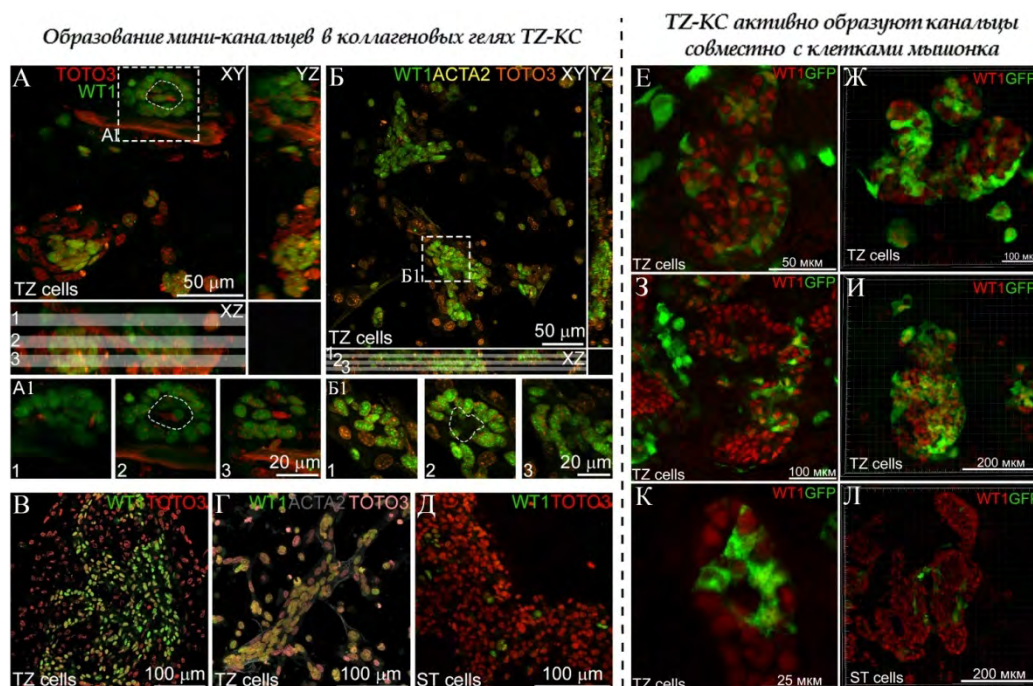


Рис. 5.7. А-Д - коллагеновые гели на 7 сут 3D-культивирования, содержащие КС половозрелых мышей культивированных в течение 10-сут. А-Г – клетки из культуры TZ-KC, Д – из культуры ST-KC. А, Б - ортогональные проекции с Z-серией конфокальных снимков. А1, Б1 - максимальные проекции, сделанные с различных участков Z-серии А и Б (расположение указано цифрами, пунктир - просвет в каналце). В-Д - максимальные проекции с Z-серии конфокальных снимков. Ядра КС, окрашены на маркер Wt1 (зеленый), ПМК на маркер α -актин (желтый), ядра подкрашены TOTO3 (красный). Е-Л - Совместные культуры GFP⁺ TZ-KC (Е-К), ST-KC (Л) и клеток семенника мышонка, конфокальная микроскопия. Иммунофлуоресцентная окраска на Wt1 (красный), GFP⁺ клетк и из культуры (зеленый). По материалам статьи Kulibin A.Yu., Malolina E.A., 2016.

5.4. Публикации по теме

1. **Малолина Е.А., Кулибин А.Ю., Тюленев Ю.А., Куш А.А.** Деструктивные изменения в семенниках мыши при ретроградном пути их заражения вирусом простого герпеса // Урология. - 2013. - № 4. - С. 55-59.
2. **Кулибин А.Ю., Малолина Е.А.** Характеристика культуры клеток Сертоли в условиях повышенной температуры и гипоксии. // Цитология. - Санкт-Петербург: "НАУКА", 2013. – Т.55. – №11. С.788-797.
3. **Malolina E.A., Kulibin A.Yu., Naumenko V.A., Gushchina E.A., Zavalishina L.E., Kushch A.A.** Herpes simplex virus inoculation in murine rete testis results in irreversible testicular damage // International Journal of Experimental Pathology. – 2014. – V. 95. – P. 120–130.
4. Naumenko V.A., Tyulenev Yu.A., Evdokimov V.V., Kurilo L.F., Shileyko L.V., Sorokina T.M., Yakovleva V.A., Kovalyk V.P., **Malolina E.A., Kulibin A.Yu., Gomberg M.A., Kushch A.A.**

Detection and quantification of human herpes viruses types 4-6 in sperm samples of patients with fertility disorders and chronic inflammatory urogenital tract diseases. // *Andrology*. 2014. – V.2. – №5. – P.687-694.

5. **Кулибин А.Ю., Малолина Е.А., Яцек С.П., Жамынчиев Э.К., Кузин Г.В.** Восстановление сперматогенеза после экспериментального двустороннего абдоминального крипторхизма путем аллогенной трансплантации недифференцированных клеток Сертоли. // *Урология*. 2015. №6. С. 74-81.
6. **Malolina E.A., Kulibin A.Yu., Kushch A.A.** Neonatal testicular cell transplantation restores murine spermatogenesis damaged in the course of herpes simplex virus-induced orchitis. // *Reproduction, Fertility and Development*. 2016. – V.28. – №6. – P. 757-764.
7. **Kulibin A.Yu., Malolina E.A.** Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture. // *Reproduction*. 2016. – V.152. – №4. – P. 271-281.
8. **Малолина Е.А., Лебедева А.Л., Кулибин А.Ю., Евдокимов В.В., Курило Л.Ф., Сорокина Т.М., Тюленев Ю.А., Науменко В.А., Куш А.А.** Взаимодействие герпесвирусов со зрелыми сперматозоидами человека в модельной системе *in vitro*. // *Вопросы вирусологии*. 2016. Т.61. №3. С. 119-125.
9. Курило Л.Ф., Сорокина Т.М., Матющенко Г.Н., Евдокимов В.В., **Малолина Е.А., Ковалык В.П., Яковлева В.А., Гомберг М.А., Куш А.А.** Влияние бессимптомных инфекций урогенитального тракта на показатели эякулята у мужчин с бесплодием и варикоцеле // *Андрология и генитальная хирургия*. 2016. Т. 17. № 2. С. 98-103.

5.5. Список цитируемой литературы

1. Ahmed, E. A., Barten-vanRijbroek, A. D., Kal, H. B., Sadri-Ardekani, H., Mizrak, S. C., vanPelt, A. M. and de Rooij, D. G. (). Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. *Biol. Reprod.* – 2009. – V.80. – P.1084-1091.
2. Bayasgalan G., Naranbat D., Tsedmaa B.J. Clinical patterns and major causes of infertility in Mongolia // *ObstetGynaecol Res.* – 2004. – V.30. – P.386-393.
3. Dobrinski I. De novo morphogenesis of functional testis tissue after ectopic transplantation of isolated cells // *Organogenesis*. – 2007. – V.3. – P.79–82.
4. Nistal M., Gonzalez-Peramato P. & De Miguel M.P. Sertoli cell dedifferentiation in human cryptorchidism and gender reassignment shows similarities between fetal environmental and adult medical treatment estrogen and antiandrogen exposure // *Reproductive Toxicology*. - 2013. - Vol.42. - P.172–179.

5. Ogawa T., Arechaga J.M., Avarbock M.R., Brinster R.L. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules // *Int. J. Dev. Biol.* - 1997. - Vol. 41. - P.111-122.
6. Shinohara T., Orwig K.E., Avarbock M.R., Brinster R.L. Restoration of spermatogenesis in in-fertile mice by Sertoli cell transplantation // *Biol. Reprod.* - 2003. - Vol. 68. - P.1064-1071.
7. Tarulli GA, Stanton PG, Loveland KL, Rajpert-De Meyts E, McLachlan RI and Meachem SJ A survey of Sertoli cell differentiation in men after gonadotropin suppression and in testicular cancer // *Spermatogenesis.* – 2013. – V.3. – P. 203-210.
8. Zhang Z.-H., Hu Z.-Y., Song X.-X., Xiao L.-J., Zou R.-J., Han C.-S., Liu Y.-X. Disrupted expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey after experimental cryptorchidism // *Int. J. Androl.* - 2004. - Vol.27. - P.234-239.
9. Zhang Z, Shao S, Shetty G & Meistrich ML Donor Sertoli cells transplanted into irradiated rat testes stimulate partial recovery of endogenous spermatogenesis // *Reproduction.* – 2009. – V.137. – P.497–508.

Раздел 6. Разработка подходов для сохранения и воссоздания исчезающих видов осетровых рыб.

6.1. Материалы и методы

Использование метода криоконсервации спермы является важной составляющей исследований по диспермному андрогенезу у осетровых рыб. Изучалось влияние аминокислот на качество спермы при передержке и транспортировке для последующей криоконсервации. В работе использовали сульфаминокислоту таурин, которая, как известно, участвует в защите мембран от структурно-функциональной дестабилизации, вызываемой низкими температурами.

Опыты проводились на сперме ленского осетра, выращенного на Конаковском заводе товарного осетроводства. Таурин добавляли в нативную сперму в концентрациях от 0,01, 0,05 и 0,1 ммоль/мл сразу после получения. Оплодотворение икры опытными образцами спермы проводили в лабораторных условиях на чашках Петри в трехкратной повторности. Контролем при оплодотворении служила нативная сперма без добавления таурина.

Влияние протективного действия таурина оценивали по подвижности и оплодотворяющей способности спермы после 4 часов хранения. В эти же сроки определяли пригодность обработанной таурином спермы к замораживанию.

В работе использовали новый способ облучения, при котором яйцеклетки, помещенные в стакан с раствором Рингера, вращались вокруг УФ-лампы. Об эффективности генетической инактивации яйцеклеток судили по следующим показателям: проявлению эффекта Гертвига, по доле эмбрионов, у которых на завершающих стадиях развития проявлялся гаплоидный синдром, по остановке эмбрионального развития у гибридов сибирский осетр х белуга и по отсутствию у эмбрионов материнских аллелей микросателлитных локусов.

6.2. Результаты

Активность спермиев с таурином в концентрации 0,01 ммоль/мл была примерно в 2 раза выше, чем в контроле. Кроме того, эта сперма оказалась более пригодной к замораживанию. Оплодотворяющая способность такой спермы после размораживания составляла около 70 %. Если сперма хранится для последующего криоконсервирования, то содержание таурина в количестве 0,01 ммоль/мл является оптимальным, а 0,05 ммоль/мл предельно допустимым.

Завершен гистологический анализ гиногенетического потомства стерляди (с участием К.В. Метальниковой, ВНИРО). В исследованной выборке 6-мес. гиногенетических особей (14 шт.) присутствовали как самки, так и самцы, что указывает на женский тип гетерогаметности у этого

вида. Самок идентифицировали по продольной щели-борозде вдоль всей гонады. В гонадах присутствовали оогонии и ооциты на фазе протоплазматического роста. Гонады самцов отличались гладкой поверхностью, развитой жировой тканью, выраженной васкуляризацией и наличием гоний в процессе митотического деления. У трех гиногенетических особей гонады находились на жировой стадии и пол у них дифференцировать не удалось.

Достигнут положительный эффект в исследованиях по гормональной инверсии пола в женском направлении у стерляди (совместная работа с ВНИИПРХ). Потомства, получавшие на ранних стадиях корма с 17β -эстрадиолом в количестве 2 мг/кг корма, практически полностью состояли из самок. Эти результаты представляют особый интерес в связи с полученными нами ранее данными, указывающими на женский тип гетерогаметности у стерляди (наличие самцов и самок в гиногенетическом потомстве). В этом случае андрогенетические потомства стерляди с высокой степенью вероятности могут оказаться однополо-мужскими. Воспроизводство таких потомств может осуществляться путем скрещивания андрогенетических самцов с инвертированными самками (генетическими самцами).

Впервые достигнут положительный эффект в инактивации ядер яйцеклеток осетровых рыб с помощью УФ-облучения. Это имеет принципиальное значение для работ по диспермному андрогенезу, проведение которых усложняется тем, что до настоящего времени для генетической инактивации яйцеклеток применялось исключительно ионизирующее излучение (рентгеновское или γ -облучение). Источники такого излучения дороги и требуют использования специально оборудованных помещений. Кроме того, эти источники обычно удалены от осетровых хозяйств, что затрудняет проведение работ по андрогенезу.

При УФ-облучении яйцеклеток сибирского осетра на основании поведения кривой доза-эффект можно заключить, что полная их генетическая инактивация была достигнута при экспозиции 120 сек, а у стерляди – 90 или 105 сек. Результаты работы указывают на принципиальную возможность инактивации ядер яйцеклеток и индукции андрогенетического развития у осетровых рыб с помощью УФ-облучения.

6.3. Публикации по разделу

1. Грунина А.С., Рекубратский А.В., Цветкова Л.И., Барминцева А.Е., Васильева Е.Д. Диспермный андрогенез у осетровых рыб: экспериментальное подтверждение возможности использования метода для восстановления исчезающих видов. Материалы международной конференции "Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб",

- посвященной памяти В.С. Кирпичникова. С. 156-168. ФГБНУ «ГосНИОРХ», ООО «Прозцвет», Санкт-Петербург, 2013 г.
2. Грунина А.С., Рекубратский А.В., Цветкова Л.И., Барминцев В.А., Васильева Е.Д. Диспермный андрогенез как метод восстановления исчезающих генофондов осетровых рыб. Доклады Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития пресноводной аквакультуры» 5-6 февраля 2013г. С. 47-53.
 3. Грунина А.С., Цветкова Л. И., Пронина Н.Д., Рекубратский А.В. Диспермный андрогенез с использованием криоконсервированной спермы как подход для восстановления генотипов осетровых рыб. Материалы Международной заочной научно-практической конференции “Теоретические и практические аспекты современной криобиологии” (24 марта 2014 г. Россия – Украина). – Сыктывкар, 2014. – 412 с. (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН). С. 260-264.
 4. Грунина А.С., Рекубратский А.В., Цветкова Л.И. Методика оценки генетических последствий криоконсервации спермы рыб с использованием гаплоидного андрогенеза: опыты на осетрах. Академику Л. С. Бергу – 140 лет: Сборник научных статей. Бендеры: Eco-TIRAS, 2016 (Типogr. “Elan Poligraf”). – 610 p. 1916 г. С. 336-338.
 5. Grunina A.S., Tsvetkova L.I., Pronina N.D., Recoubratsky A.V. Investigations on dispermic androgenesis in sturgeon fishes with the use of cryopreserved sperm: experiment on Sterlet and Beluga sturgeons. RAD 2016 Conference (Fourth International Conference on radiation and applications in various fields of research) Nis, Serbia 23-27 of May, 2016, virtual session.

Раздел 7. Механизмы детерминации соматических и половых клеток в раннем развитии млекопитающих и человека

7.1. Введение

Начальные стадии *in vitro* дифференцировки эмбриональных стволовых клеток рассматривают в качестве уникальных трехмерных моделей раннего развития млекопитающих для фундаментальных, фармакологических и токсикологических исследований. Результаты свидетельствуют о том, что 3D-структура ранних эмбрионов и различная чувствительность клеток разных эмбриональных популяций к химическим веществам являются ключевыми элементами защиты эмбрионов от повреждающих факторов (Ducibella et al., 1975; Gardner, 1982; Гордеева и др., 2002; Sachlos et al., 2008; Van Winkle et al., 2012). Поэтому целью нашей работы являлось исследование формирования защитных механизмов от повреждающих факторов в эмбрионидных телах разных стадий дифференцировки на примере изучения прямых и отсроченных повреждающих эффектов цитостатиков.

Баланс процессов пролиферации и дифференцировки стволовых клеток является основой гомеостаза самообновляющихся тканей. Нарушения механизмов, контролирующих самообновление и дифференцировку в стволовых клетках, вследствие различных мутаций могут приводить к их функциональным нарушениям или онкогенной трансформации в раковые стволовые клетки (Caisander et al., 2006; Gore et al., 2011; Hovatta et al., 2010; Urbach et al., 2009). Потенциально плюрипотентные стволовые клетки в эмбрионе, как и мультипотентные стволовые клетки во взрослых тканях, могут трансформироваться в опухолевые стволовые клетки при различных генетических и эпигенетических перестройках. Ранее опухолевые аналоги плюрипотентных стволовых клеток млекопитающих – линии эмбриональных тератокарциномных клеток (ЭТК) – были выделены из тератом и тератокарцином у разных млекопитающих и человека (Andrews et al., 1984; Andrews et al., 1985; Andrews, 1988; Martin et al., 1975; Zeuthen et al., 1980). По сравнению с плюрипотентными стволовыми клетками ЭТК имеют ограниченный потенциал к дифференцировке *in vitro* и при развитии в химерных эмбрионах, в то время как пролиферативный потенциал недифференцированных плюрипотентных стволовых клеток и ЭТК сходен (Гордеева и др., 2009; Andrews et al., 1984; Andrews et al., 1985; Andrews, 1988; Papaioannou et al., 1978; Rossant et al., 1982). Таким образом, в ЭТК происходит дерегуляция пролиферативных и антипролиферативных сигнальных и регуляторных механизмов, нарушающая их дифференцировку. В свете данных литературы о роли паттернов эндогенной экспрессии факторов семейства TGF β в поддержании разных статусов плюрипотентности нормальных ЭСК встает вопрос о том, какие изменения в экспрессии факторов семейства трансформирующего фактора

роста (TGF β) в ЭТК мыши и человека могут оказывать влияние на изменение их потенциала к дифференцировке, а также существуют ли различия в паттернах экспрессии факторов семейства TGF β в ЭТК с их нормальными клетками-аналогами. Поскольку эти вопросы практически не исследованы, был проведен сравнительный количественный анализ экспрессии факторов семейства TGF β в ЭСК и ЭТК мыши и человека.

Перспективными регуляторами баланса пролиферации и дифференцировки можно рассматривать раково-тестикулярные антигены, однако их функции до сих пор остаются неизвестными. Специфический паттерн экспрессии РТА млекопитающих в норме ограничен только сперматогенными клетками, эмбриональными и внезародышевыми клетками, но aberrantный паттерн экспрессии обнаружен в большинстве опухолевых клеток различного происхождения. Как и у человека, в геноме мышей были идентифицированы 18 генов РТА семейств *Mage*, 8 из которых были гомологичны генам семейств *MAGE-A* (Melanoma Antigen A) человека, 5 - генам *MAGE-B*, 2 - *MAGE-D*, 2- *MAGE-E*, 1- *MAGE-L*. Несмотря на то, что РТА у млекопитающих были идентифицированы более 20 лет назад, мало известно о их функциональных свойствах и роли в регуляции различных процессов (Sang et al., 2011). Предшествующие исследования показали, что РТА вовлечены в регуляцию транскрипции генов (Laduron et al., 2004), пролиферативной активности (Ohman Forslund et al., 2001; Nagao et al., 2003; Jungbluth et al., 2005; Por et al., 2010), апоптоза (Marcar et al., 2010) и чувствительности раковых клеток к цитокинам (Park et al., 2002). Кроме того, было обнаружено, что РТА могут быть вовлечены в детерминацию и специализацию эмбриональных клеточных линий (De Plaen et al., 1999; Aubry et al., 2001; Gaskell et al., 2004; Gjerstorff et al., 2006; Gjerstorff et al., 2007). Экспрессия генов семейств *MAGE/Mage* выявлена в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека, а также в развивающихся нейроэктодермальных и мезодермальных клетках и клетках плаценты у человека (Andrieu et al., 2003; Kuwajima et al., 2006; Deponti et al., 2007; Jungbluth et al., 2007; Gjerstorff et al., 2008; Lifantseva et al., 2011).

Экспрессия раково-тестикулярных антигенов семейств *Mage* была в основном исследована в различных раковых клетках *in vitro* или в клинических образцах опухолей разного происхождения (Sahin et al., 2000; Yuasa et al., 2001). Однако практически отсутствуют данные об экспрессии их в нормальных клетках, длительно поддерживаемых в культуре *in vitro* (Cronwright et al., 2005; Gjerstorff et al., 2008; Lifantseva et al., 2011). Основываясь на высказанной нами ранее гипотезе о роли РТА в развитии ранних эмбриональных линий и их aberrantной экспрессии при нарушении нормальной дифференцировки при трансформации и канцерогенезе (Lifantseva et al., 2011), целью наших исследований являлось изучение паттернов экспрессии и функциональной роли раково-тестикулярных антигенов семейств *Mage* (Melanoma Antigen) в развитии линий соматических и

половых клеток млекопитающих, а также в ходе самообновления и *in vitro* дифференцировки плюрипотентных стволовых и клеток.

7.2. Материалы и методы

Объекты исследований.

В работе были использованы линия ЭСК мыши R1, линии ЭСК человека ESM02 и SC5, линия эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ) и человека (чЭФ), полученные и охарактеризованная в Институте биологии развития и Институте цитологии РАН, Санкт-Петербург (Кольцова и др., 2011).

Культивирование клеток *in vitro*.

ЭСК мыши и человека культивировали в среде DMEM, содержащей 1мМ L-глутамина, 0.1 мМ заменимых аминокислот (“HyClone”, США), 0.1 мМ β-меркаптоэтанола (“Sigma”, США) и 15% заменителя телячьей фетальной сыворотки (Knockout Serum Replacement, “Gibco”, США). Недифференцированные мЭСК поддерживали на фидере из эмбриональных фибробластов мыши (мЭФ, полученных из E12.5 эмбрионов мышей C57Bl/6), инактивированных митомицином С (10 мкг/мл, “Sigma”) или в бесфидерной системе в среде, содержащей фактор ингибирования лейкемии (leukemia inhibitory factor, LIF, 10 нг/мл, “Sigma”). Недифференцированные чЭСК линии ESM02 поддерживали на инактивированном фидере мЭФ, а чЭСК SC5 – на фидере из чЭФ. В среду для культивирования чЭСК добавляли рекомбинантный фактор роста фибробластов человека (FGF2/bFGF, 10 нг/мл, “Invitrogen”, США).

Эмбрионидные тела (ЭТ), формируемые при дифференцировке мЭСК, получали с помощью метода “висячей капли”, описанного ранее (Гордеева и др., 2009). ЭТ ESM02 и SC5 получали при механическом разделении колоний недифференцированных чЭСК и последующем культивировании клеточных кластеров в планшетах для суспензионного культивирования (“Greinerbio”, Германия) в течение последующих 5 сут (ЭТ5).

Анализ генной экспрессии.

Анализ генной экспрессии проводили в клетках и ЭТ, растущих в бессывороточной среде: фидерных клетках мЭФ и чЭФ, в мЭСК, растущих в среде с LIF, в чЭСК, механически изолированных от фидера, и в ЭТ на 5 сут дифференцировки в средах без LIF и bFGF. Тотальную РНК выделяли из клеток, используя Trizol (“Invitrogen”, США), в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию тотальной РНК в образцах определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (ThermoScientific, США). Все образцы тотальной РНК

обрабатывали ДНКазой (TurboDNA kit, “Ambion”, США) по протоколу производителя для предотвращения контаминации геномной ДНК. Для синтеза кДНК библиотек использовали 1 мкг тотальной РНК каждого образца. Синтез кДНК библиотек проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV и олиго (dT)18праймеров (“Fermentas”, Литва).

Количественный анализ генной экспрессии проводили на амплификаторе “Applied Biosystems 7500” (США) с использованием набора для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green (“Синтол”, Россия) по следующему протоколу: предварительная денатурация: 94°C – 5’; отжиг праймеров и элонгация: 62°C - 45’’; денатурация: 94°C - 15’’, 40 циклов. Специфические праймеры были сконструированы на основе данных о структуре исследуемых генов в базах данных GenBank, MGI и Ensemble. Уровень экспрессии генов в каждом образце нормализовали к уровню экспрессии гена гипоксантин-гуанин фосфорибозил трансферазы (HPRT/Hprt). Для определения относительного уровня экспрессии генов использовали сравнительный Ct метод (ABI Relative Quantification Study software, Applied Biosystems, США). Относительные уровни экспрессии рассчитывали по формуле $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SD$. За одну относительную единицу принимали уровень экспрессии генов в недифференцированных ЭСК или необработанных фибробластах. При анализе относительных уровней экспрессии семейства факторов TGF β и FGF2 в каждом типе клеток уровень экспрессии гена HPRT принимали за одну относительную единицу, а уровень экспрессии всех остальных генов в образце рассчитывали по формуле $2^{-\Delta Ct} \pm SE$.

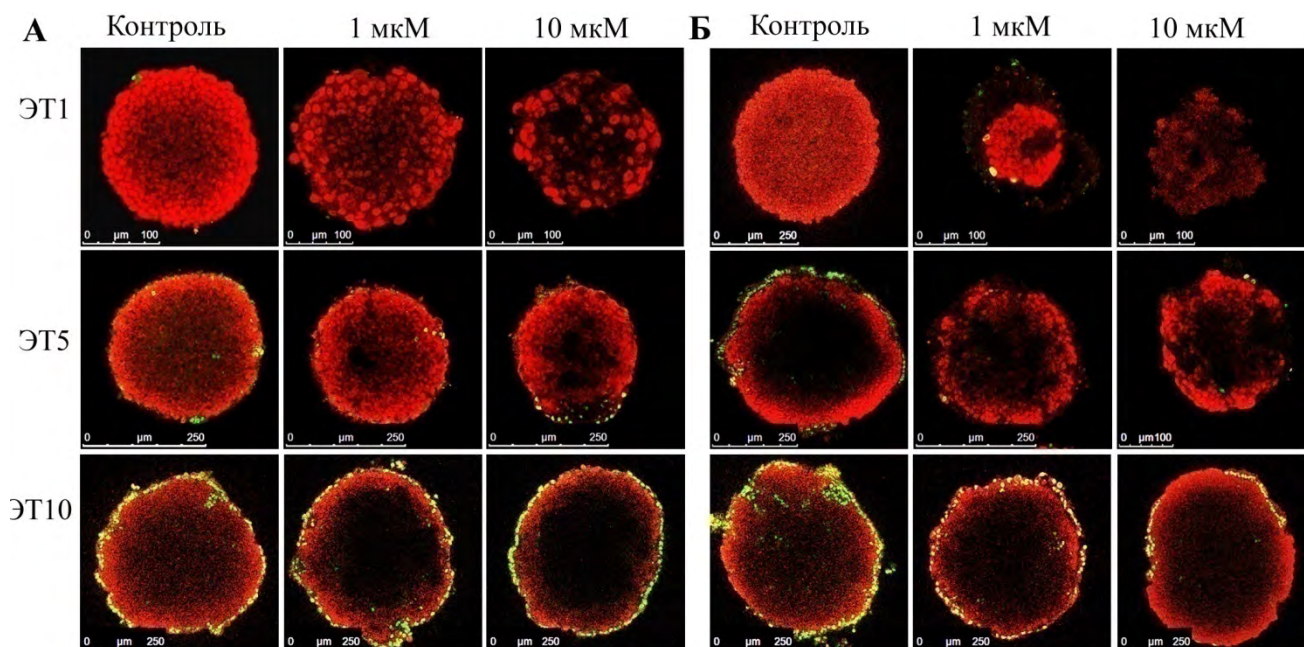
Кластерный и корреляционный анализы.

С помощью иерархического кластерного анализа и кластеризации с помощью k-средних была проведена оценка кластеризации клеточных популяций *in vitro* и *in vivo* (в эмбрионе на стадии гаструляции) на основании их паттернов экспрессии генов-регуляторов и семейств Mage. В проекте впервые был использован свой оригинальный метод анализа данных с помощью кластерного анализа на основе рассчитанных коэффициентов корреляции по Пирсону между уровнями экспрессии генов регуляторов и генов Mage, который позволил сформулировать гипотезу о вовлечении разных генов Mage в процессы самообновления и плюрипотентности, вхождении в дифференцировку и специализации клеточных линий в раннем развитии мыши.

7.3. Результаты

При анализе динамики роста и дифференцировки плюрипотентных стволовых мыши в эмбриоидных телах для создания модели раннего развития млекопитающих *in vitro* были исследованы клеточные контакты и межклеточные коммуникации в разных слоях сфероидов и установлено, по мере их роста уменьшается диффузия белков и низкомолекулярных веществ. При анализе факторов, влияющих на ключевые параметры разрабатываемой 3D-модели раннего развития млекопитающих, было впервые показано что динамика дифференцировки эмбриоидных тел зависит от происхождения клеточной линии, от состава среды для культивирования (сывороточные-бессывороточные) и, в меньшей степени, от исходного числа клеток, формирующих эмбриоидное тело. Максимальные повреждающие эффекты цитостатиков выявлены в недифференцированных эмбриональных стволовых клетках, а в процессе роста и дифференцировки эмбриоидных тел токсический эффект цитостатиков снижается, что связано увеличением объема эмбриоидных тел и развитием гипертрофированного слоя внезародышевой энтодермы, приводящим к снижению диффузии, транспорта и метаболизма химических и биологически активных веществ и препятствием действию повреждающих факторов.

Рис. 7.1. Экспрессия транскрипционных факторов Oct4 (красный) и Gata4 (зеленый) в ЭТ на 1, 5 и 10 дни дифференцировки после 24 ч воздействия этопозида (А) и через 72 ч после его отмены (Б). ЭТ1, ЭТ5, ЭТ10 – эмбриоидные тела на 1, 5, и 10 сут дифференцировки соответственно.



Таким образом, нами разработана новая 3D-модель раннего развития с использованием эмбриональных стволовых клеток мыши, которая может быть применена для фундаментальных, фармакологических и токсикологических исследований новых лекарств.

В наших исследованиях впервые показано, что механизмы сигнальной регуляции самообновления и дифференцировки клеток в базовом и первичном статусах плюрипотентности значительно различаются вследствие различий в уровнях эндогенной экспрессии факторов TGFβ1, BMP4 и ActivinA, а также FGF2. Впервые установлено, что потенциал к дифференцировке у плюрипотентных и нуллипотентных клеток мыши и человека обусловлен различными паттернами эндогенной экспрессии факторов семейства TGFβ, активирующих соответствующие сигнальные пути, различиями их функциональной активности и биологической роли в этих клетках. Наши данные свидетельствуют, что дисбаланс пролиферативных и антипролиферативных сигналов, приводящий к нарушению процессов дифференцировки ЭТК, обусловлен снижением активности эндогенных сигнальных путей факторов семейства TGFβ и усилением митогенной активности PI3K/Akt и MEK/ERK сигнальных путей. Для коррекции дисбаланса и ингибирования опухолевого роста необходимо применение стратегии ингибирования указанных митогенных сигнальных путей в ЭТК мыши и человека. Предполагаемые механизмы и мишени для различных сигнальных путей, активных в ЭСК и ЭТК представлены на Рис. 2.

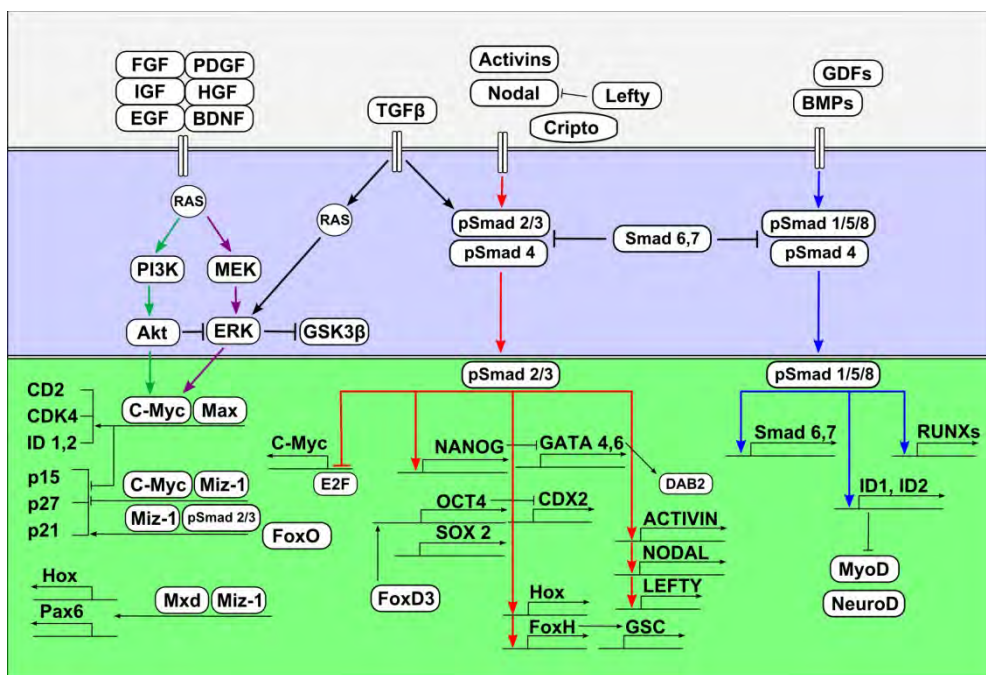


Рис. 7.2. Сигнальные пути и их гены-мишени в эмбриональных стволовых и тератокарциномных клетках человека.

В исследованиях механизмов детерминации соматических и половых клеток в раннем развитии млекопитающих впервые определены паттерны экспрессии раково-тестикулярных антигенов *семейств Mage-a, Mage-b, Mage-d, Mage-e, Mage-h* и *Mage-l* в недифференцированных и дифференцирующихся плюрипотентных стволовых, тератокарциномных и эмбриональных

соматических клетках мышцы и впервые выявлена роль дифференциальной экспрессии генов *Mage* в самообновлении и дифференцировке плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток мышцы. Впервые выявлены корреляции в экспрессии генов семейств *Mage* и регуляторами пролиферации (*C-myc*, *E-ras*) дифференцировки (*Mvh*, *Afp*, *Gata4*, *Pax6*) и в ходе кластерного анализа паттернов экспрессии генов *Mage* впервые определены роли кластеров генов *Mage-a4* и группы *Mage-a8*, *Mage-d1*, *Mage-d2*, *Mage-e1*, *Mage-l2* как потенциальных функциональных антагонистов в регуляции пролиферации и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток мышцы. Обнаружены существенные различия в экспрессии генов *Mage-a2* и *Mage-ab* в плюрипотентных стволовых и злокачественных тератокарциномных клетках мышцы. Анализ паттернов экспрессии генов семейств *Mage* в нормальных и трансформированных эмбриональных фибробластов мышцы выявил значительные различия (10-1000 раз) в экспрессии генов семейства *Mage-a* нормальных фибробластах, но не в трансформированных фибробластах стимуляции апоптоза. Предположительно, гены семейства *Mage-a* в нормальных и трансформированных эмбриональных фибробластах мышцы могут быть вовлечены в регуляцию устойчивости к окислительному стрессу и способствуют выживаемости клеток. Полученные данные впервые демонстрируют участие генов семейства *Mage* в регуляции клеточных процессов как опухолевых клеток, так и плюрипотентных стволовых и эмбриональных соматических клеток, что является важным для разработки новых подходов для разработки диагностики и лечения раковых опухолей эмбрионального происхождения у млекопитающих и человека.

С целью всестороннего анализа экспрессии генов семейств *Mage* в развитии линий соматических и половых клеток были изучены профили генной экспрессии в семенниках, яичниках, переднем мозге и печени взрослых мышей четырех линий - C57Bl/6, CBA, Balb/c и Nude. В наших исследованиях не было обнаружено существенных различий в уровнях экспрессии генов семейств *Mage* у животных с разным генетическим бэкграундом и иммунологическим статусом. Однако выявлены существенные различия в уровнях экспрессии генов семейств *Mage-a* и *Mage-b* между семенниками и другими органами (50-100 раз), в то время как гены *Mage-d1*, *-d2*, *-e1*, *-e2*, *-h1* и *-l2* экспрессировались на сходных уровнях во всех органах у всех линий мышей. Кроме того, не было выявлено значимых различий в экспрессии всех изучаемых генов в репродуктивных и соматических органах мышей при старении животных (3-4, 10-12, 12-14 мес.).

Получены приоритетные данные о паттернах экспрессии 17 раково-тестикулярных антигенов семейств *Mage* в эмбриональных и внезародышевых структурах, которые аннотированы в международную базу Mouse Genome Informatics/Gene Expression Database (MGI/GXD) для использования международным научным сообществом. (Ref ID: J:230330; J:237181;

<http://www.informatics.jax.org/gxd/reference/J:230330>;

<http://www.informatics.jax.org/reference/J:237181>

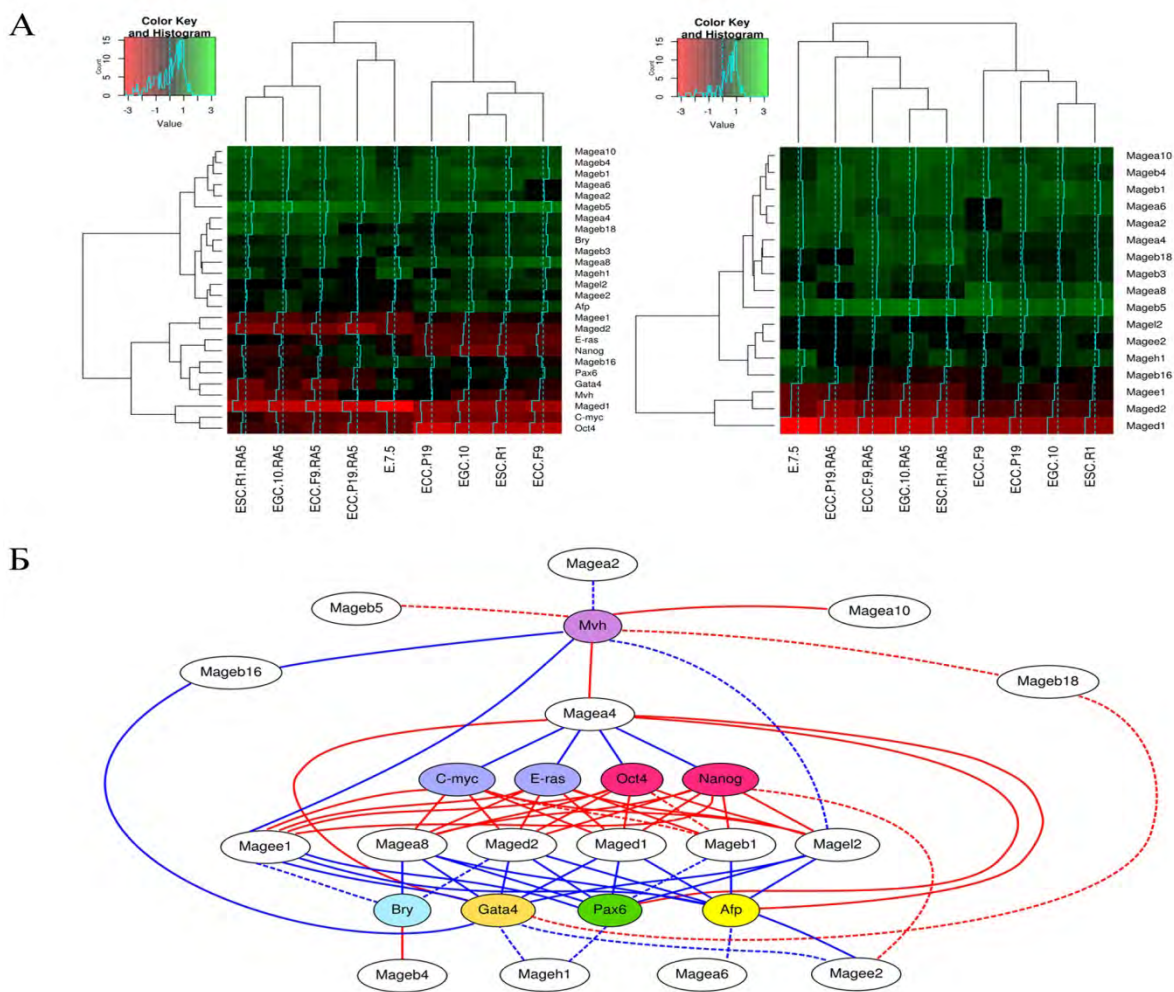


Рис 7.3. Кластерный анализ паттернов генной экспрессии в недифференцированных и дифференцирующихся плюрипотентных стволовых клетках и эмбрионе на ранней стадии гаструляции выявил значительные корреляции в экспрессии генов семейства *Mage* и генов-регуляторов раннего развития мыши (А), функциональные связи которых были предложены в виде новой модели (Б).

Таким образом, наши данные впервые показывают, что экспрессия генов семейств *Mage* мало изменяется в ходе нормальных физиологических процессов и строго контролируется. Существенные изменения экспрессии этих генов наблюдаются только в ходе развития или трансформации и канцерогенеза. Все полученные нами данные впервые демонстрируют существенные различия в паттернах экспрессии генов разных семейств *Mage*, что указывает на их потенциальную роль в регуляции процессов ранней детерминации и дифференцировки половых и соматических клеток мыши, вовлеченность генов разных семейства *Mage* в регуляцию клеточных

процессов в нормальных эмбриональных клетках, как и в опухолевых или трансформированных клетках мышцы. Полученные результаты являются приоритетными и вносят новый вклад в понимание значения раково-тестикулярных антигенов в регуляции развития млекопитающих и различных клеточных процессов в норме и при канцерогенезе.

7.4. Публикации по теме

Статьи

1. **Гордеева О. Ф.** Цитотоксические эффекты этопозиды на разных стадиях дифференцировки эмбрионидных тел, сформированных эмбриональными стволовыми клетками мышцы// *Онтогенез*. 2013. Т. 44. №6. С.381-388. (**Gordeeva O. F.** Cytotoxic effects of etoposide at different stages of differentiation of embryoid bodies formed by mouse embryonic stem cells. *Rus J Dev Biol.* 2013; 44(6). P. 283–289).
2. **Лифанцева Н.В.**, Кольцова А.М., Полянская Г.Г., **Гордеева О.Ф.** Экспрессия факторов семейства TGF β и фактора роста фибробластов FGF2 в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека, поддерживаемых в разных системах культивирования// *Онтогенез*. 2013. Т. 44. №1. С. 10–23. (**Lifantseva N. V.**, Koltsova A. M., Poljanskaya G. G., and **Gordeeva O. F.** Expression of TGF β family factors and FGF2 in mouse and human embryonic stem cells maintained in different culture systems. *Rus J Dev Biol.* 2013; 44(1). P. 7-18.)
3. **Gordeeva O.F.**, Nikonova T.M. Development of Experimental Tumors Formed by Mouse and Human Embryonic Stem and Teratocarcinoma Cells after Subcutaneous and Intraperitoneal Transplantations into Immunodeficient and Immunocompetent Mice// *Cell Transplant.* 2013. V.22 (10). P. 1901-1914.
4. **Гордеева О. Ф.** Низкая экспрессия активина А в нуллипотентных эмбриональных тератокарциномных клетках мыши и человека// *Онтогенез*. 2014. Т. 45. №4. С.272-279. (**Gordeeva O. F.** Low Expression of Activin A in Mouse and Human Embryonic Teratocarcinoma Cells. *Rus J Dev Biol.* 2014; 45(4). P. 272–279.)
5. **Гордеева О. Ф.** Экспрессия раково-тестикулярных антигенов семейств Mage-a и Mage-b в эмбриональных фибробластах мыши, культивируемых *in vitro*// *Онтогенез*. 2015. Т. 46. №3. С.186-197. (**Gordeeva O. F.** Expression of Cancer Testis Antigens of Mage-a and Mage-b Families in Mouse Embryonic Fibroblasts Cultured *in vitro*. *Rus J Dev Biol.* 2015; 46(3). P.148–158.)

7.5. Список используемых источников

1. Гордеева О.Ф., Мануилова Е.С., Гривенников И.А, и др. Характеристика плюрипотентной популяции на начальных стадиях дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в культуре // Доклады Академии наук. 2002. Т. 386. С.555-558.

2. Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Никонова Т.М. Регуляция *invitro* и *invivo* дифференцировки эмбриональных стволовых, эмбриональных герминативных и тератокарциномных клеток мыши факторами семейства TGF β // Онтогенез. 2009. V. 40. P. 403-418.
3. Andrieu D., Watrin F., Niinobe M., Yoshikawa K., Muscatelli F., Fernandez P.A. Expression of the Prader-Willi gene *Necdin* during mouse nervous system development correlates with neuronal differentiation and p75NTR expression // *Gene Expr. Patterns*. 2003. V. 3. P.761-765.
4. Andrews P.W., Damjanov I., Simon D. et al. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro// *Lab. Invest.*. 1984. V. 50. P. 147-162.
5. Andrews P.W., Damjanov I., Simon D. et al. A pluripotent human stem-cell clone isolated from the TERA-2 teratocarcinoma line lacks antigens SSEA-3 and SSEA-4 in vitro, but expresses these antigens when grown as a xenograft tumor// *Differentiation*. 1985. V. 29. P. 127-135.
6. Andrews P.W. Human teratocarcinomas// *Biochim. Biophys. Acta*. 1988. V. 948. P. 17-36.
7. Aubry F., Satie A.P., Rioux-Leclercq N., Rajpert-De Meyts E., Spagnoli G.C., Chomez P., De Backer O., Jégou B., Samson M. MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors // *Cancer*. 2001. V. 92. P.2778-2785.
8. Caisander G., Park H., Frej K. et al. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged in vitro culture// *Chromosome Res*. 2006. V. 14. P. 131-137.
9. Cronwright G., Le Blanc K., Götherström C., Darcy P., Ehnman M., Brodin B. Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression // *Cancer Res.*. 2005. V. 65. P.2207-2215.
10. De Plaen E., De Backer O., Arnaud D., Bonjean B., Chomez P., Martelange V., Avner P., Baldacci P., Babinet C., Hwang S.Y., Knowles B., Boon T. A new family of mouse genes homologous to the human MAGE genes // *Genomics*. 1999. V. 55. P.176-184.
11. Deponti D., François S., Baesso S., Sciorati C., Innocenzi A., Broccoli V., Muscatelli F., Meneveri R., Clementi E., Cossu G., Brunelli S. *Necdin* mediates skeletal muscle regeneration by promoting myoblast survival and differentiation // *J. Cell Biol.*. 2007. V. 179. P.305-319.
12. Ducibella T., Albertini D.F., Anderson E. et al. The preimplantation mammalian embryo: characterization of intercellular junctions and their appearance during development // *Dev. Biol.*. 1975. V. 45. P. 231-250.
13. Gardner R.L. Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo // *J Embryol Exp Morphol*. 1982. V. 68. P. 175-198.

14. Gaskell T.L., Esnal A., Robinson L.L.L., Anderson R.A., Saunders P.T.K. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations // *Biol. Reprod.* 2004. V. 71. P.2012-2021.
15. Gjerstorff M.F., Johansen L.E., Nielsen O., Kock K., Ditzel H.J. Restriction of GAGE protein expression to subpopulations of cancer cells is independent of genotype and may limit the use of GAGE proteins as targets for cancer immunotherapy // *Br. J. Cancer.* 2006. V. 94. P.1864-1873.
16. Gjerstorff M.F., Kock K., Nielsen O., Ditzel H.J. MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development // *Hum. Reprod.* 2007. V. 22. P.953-960.
17. Gjerstorff M.F., Harkness L., Kassem M., Frandsen U., Nielsen O., Lutterodt M., Møllgård K., Ditzel H.J. Distinct GAGE and MAGE-A expression during early human development indicate specific roles in lineage differentiation // *Hum. Reprod.* 2008. V. 23. P.2194-2201.
18. Gore A., Li Z., Fung H. et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells// *Nature.* 2011. V. 471. P. 63-67.
19. Hovatta O., Jaconi M., Töhönen V. et al. A teratocarcinoma-like human embryonic stem cell (hESC) line and four hESC lines reveal potentially oncogenic genomic changes// *PLoS ONE.* 2010. V. 5. P. e10263.
20. Jungbluth A.A., Ely S., DiLiberto M., Niesvizky R., Williamson B., Frosina D., Chen Y., Bhardwaj N., Chen-Kiang S., Old L.J., Cho H.J. The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation // *Blood.* 2005. V. 106. P.167-174.
21. Jungbluth A.A., Silva W.A.J., Iversen K., Frosina D., Zaidi B., Coplan K., Eastlake-Wade S.K., Castelli S.B., Spagnoli G.C., Old L.J., Vogel M. Expression of cancer-testis (CT) antigens in placenta // *Cancer Immun.* 2007. V. 7. P.15.
22. Kuwajima T., Nishimura I., Yoshikawa K. Necdin promotes GABAergic neuron differentiation in cooperation with Dlx homeodomain proteins // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. P.5383-5392.
23. Lifantseva N., Koltsova A., Krylova T., Yakovleva T., Poljanskaya G., Gordeeva O. Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks // *Stem Cells Int.* 2011. V. 2011. P.795239.
24. Marcar L., Maclaine N.J., Hupp T.R., Meek D.W. Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin // *Cancer Res.* 2010. V. 70. P.10362-10370.
25. Martin G.R. and Evans M.J. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1975. V. 72. P. 1441-1445.
26. Nagao T., Higashitsuji H., Nonoguchi K., Sakurai T., Dawson S., Mayer R.J., Itoh K., Fujita J. MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P.10668-10674.

27. Ohman Forslund K., Nordqvist K. The melanoma antigen genes--any clues to their functions in normal tissues? // *Exp. Cell Res.*. 2001. V. 265. P.185-194.
28. Papaioannou V.E., Gardner R.L., McBurney M.W. et al. Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis// *J Embryol Exp Morphol.* 1978. V. 44. P. 93-104.
29. Park J., Kong G., Lee S. hMAGE-A1 overexpression reduces TNF-alpha cytotoxicity in ME-180 cells // *Mol. Cells.* 2002. V. 14. P.122-129.
30. Por E., Byun H., Lee E., Lim J., Jung S., Park I., Kim Y., Jeoung D., Lee H. The cancer/testis antigen CAGE with oncogenic potential stimulates cell proliferation by up-regulating cyclins D1 and E in an AP-1- and E2F-dependent manner // *J. Biol. Chem.*. 2010. V. 285. P.14475-14485.
31. Rossant J. and McBurney M.W. The developmental potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection// *J Embryol Exp Morphol.* 1982. V. 70. P. 99-112.
32. Sachlos E. and Auguste D.T. Embryoid body morphology influences diffusive transport of inductive biochemicals: a strategy for stem cell differentiation // *Biomaterials.* 2008. V. 29. P. 4471-4480.
33. Sahin U., Koslowski M., Türeci O., Eberle T., Zwick C., Romeike B., Moringlane J.R., Schwechheimer K., Feiden W., Pfreundschuh M. Expression of cancer testis genes in human brain tumors // *Clin. Cancer Res.*. 2000. V. 6. P.3916-3922.
34. Sang M., Wang L., Ding C., Zhou X., Wang B., Wang L., Lian Y., Shan B. Melanoma-associated antigen genes - an update // *Cancer Lett.*. 2011. V. 302. P.85-90.
35. Urbach A. and Benvenisty N. Studying early lethality of 45,XO (Turner's syndrome) embryos using human embryonic stem cells// *PLoS ONE.* 2009. V. 4. P. e4175.
36. Yuasa T., Okamoto K., Kawakami T., Mishina M., Ogawa O., Okada Y. Expression patterns of cancer testis antigens in testicular germ cell tumors and adjacent testicular tissue // *J. Urol.*. 2001. V. 165. P.1790-1794.
37. Van Winkle A.P., Gates I.D. and Kallos M.S. Mass transfer limitations in embryoid bodies during human embryonic stem cell differentiation // *Cells Tissues Organs (Print).* 2012. V. 196. P. 34-47.
38. Zeuthen J., Norgaard J.O., Avner P. et al. Characterization of a human ovarian teratocarcinoma-derived cell line// *Int. J. Cancer.* 1980. V. 25. P. 19-32.

Раздел 8. Использование зародышей морского ежа для поиска веществ с антимиотическим действием, обусловленным дестабилизацией микротрубочек

8.1. Введение

Ингибиторы деления клеток (цитостатики), обладающие антипролиферативным действием, широко применяются в химиотерапии онкологических заболеваний. «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств», утвержденный в 2003 г. в Российской Федерации, включает 47 препаратов-цитостатиков для химиотерапии рака. В США список утвержденных противоопухолевых лекарственных средств содержит 50 препаратов, в том числе 5 веществ, относящихся к группе так называемых митотических ядов (винка-алкалоиды и таксоиды), механизм действия которых связан с нарушением динамики и структуры микротрубочек. Однако, химиотерапевтические средства обладают нежелательными побочными эффектами, такими как нейро- и кардиотоксичность, угнетение кроветворения, подавление иммунитета, нарушение деятельности желудочно-кишечного тракта и почек. Важной характеристикой противоопухолевых препаратов является широта терапевтического воздействия («терапевтическое окно»), которая определяется как интервал между минимальной дозой (концентрацией) препарата, вызывающей угнетение роста опухоли, и начальной дозой, вызывающей токсические эффекты. Еще одним ограничением применения современных химиотерапевтических средств является развитие у раковых клеток феномена множественной лекарственной устойчивости, который может быть связан как с повышенной выработкой Р-гликопротеина - трансмембранного белка, выводящего чужеродные молекулы из клетки, так и с разнообразными изменениями генов и белков, в том числе макромолекул, связанных с апоптозом - запрограммированной гибелью клетки. Для преодоления этих недостатков в настоящее время активно проводится поиск новых высокоэффективных молекул, малотоксичных, с хорошей фармакокинетикой, способных угнетать развитие опухолей, устойчивых к уже известным цитостатикам.

Скрининг природных и синтетических химических соединений является важной проблемой медицинской химии. Первоначальные доклинические испытания веществ проводятся по двум направлениям: молекулярно-биологический подход со стороны возможной клеточной мишени (target-based screening) и фенотипический скрининг на клеточных культурах и модельных организмах. Молекулярный скрининг предоставляет информацию о клеточной мишени и механизме действия, однако в клетке и тем более в организме биологический эффект исследуемого химического агента может быть совершенно другим или отсутствовать вообще. Фенотипический скрининг, как правило, не позволяет установить клеточную мишень, но дает

представление о реальном действии вещества на клеточном или организменном уровне. Первостепенное значение фенотипический скрининг имеет для исследования биологической активности представителей новых классов химических соединений («first-in-class small molecules») (Swinney, 2013).

Выбор подходящей экспериментальной модели для обнаружения новых активных химических соединений имеет первостепенное значение. Желательно, чтобы биологические характеристики модельного объекта позволяли экстраполировать результаты скрининга на клетки человека. Кроме того, тест-модель должна быть доступной, дешевой, удобной в применении, обеспечивать воспроизводимые результаты. Зародыши морского ежа, классический объект биологии развития, обладают этими преимуществами. К уникальным качествам данного объекта относятся возможность получения большого количества гамет, простота искусственного оплодотворения и выращивания, быстрое синхронное деление клеток на ранних стадиях развития, высокая проницаемость для различных веществ. Крупные размеры яйцеклеток и прозрачность зародышей и личинок позволяют наблюдать *in vivo* фенотипические изменения с помощью обычного микроскопа без применения специфических красителей, в том числе митотический аппарат делящейся яйцеклетки. Детально изученные процессы дифференцировки и морфогенеза зародышей морского ежа облегчают интерпретацию наблюдаемых нарушений развития, что позволяет делать предположения о механизме действия испытываемых агентов. С эволюционной точки зрения морские ежи находятся ближе к человеку, чем такие широко используемые экспериментальные модели, как дрозофила или круглый червь *Caenorhabditis elegans*. Многие основополагающие принципы эмбриогенеза, регуляторные пути и сигнальные макромолекулы, играющие ключевую роль во всех животных клетках, включая человека, впервые были описаны именно у зародышей морских ежей (Pedersen, 2006; McClay, 2011; Ernst, 2011). При изучении генома морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* было выявлено более 7000 генов, общих с человеком, в том числе гены, связанные с миодистрофией и болезнями Паркинсона, Альцгеймера и Хантингтона (<http://www.medicalnewstoday.com/articles/58507.php>). Зародыши морских ежей включены в список модельных организмов для медико-биологических исследований (Falugi et al., 2008; Lead Institutes and Staff Contacts for Specific Model Organisms; <http://www.ncrr.nih.gov>. *S. purpuratus* (Sea Urchin). Michael C. Chang, Ph.D. National Center for Research Resources). В настоящее время ряд научно-исследовательских групп используют зародышей морских ежей для выявления химических соединений, влияющих на деление клеток, с перспективой разработки новых противоопухолевых лекарственных средств (De Andrade Cunha et al., 2003; Madari et al., 2003; Nishioka et al., 2003; Militao et al., 2005; de Lima et al., 2009; Magalhaes et al., 2011, Macedo et al., 2016).

Как показал наш многолетний опыт работы на зародышах морского ежа, разработанный нами фенотипический метод тестирования химических соединений на этом объекте дает хорошо воспроизводимые результаты, в большой степени сходные с результатами, полученными с использованием общепринятых тест-систем, таких как культуры опухолевых клеток и полимеризация очищенного тубулина *in vitro*.

8.2. Материалы и методы

В работе использовали оригинальный фенотипический метод тестирования, позволяющий быстро идентифицировать молекулы, способные нарушать деление клеток, и дающий информацию о механизме антимитотической активности и клеточной мишени (Semenova M.N., Kiselyov A., Semenov V.V. Sea urchin embryo as a model organism for the rapid functional screening of tubulin modulators. - *BioTechniques*, 2006, v. 40, № 6, pp. 765–774). Данная тест-система предоставляет возможность выявлять: а) дестабилизаторы микротрубочек, или ингибиторы полимеризации тубулина; б) вещества с антипролиферативной/антимитотической активностью, не связанной с нарушением структуры и функции микротрубочек; в) молекулы, избирательно воздействующие на реснички; в) соединения, обладающие токсическим эффектом.

Опыты проводили в биологической лаборатории ИБР им. Н.К.Кольцова РАН на Кипре. Взрослых морских ежей *Paracentrotus lividus* L. (Echinidae, Echinodermata) собирали в прибрежной зоне и содержали в аквариуме с аэрируемой морской водой. Нерест стимулировали инъекцией в полость тела животных 1–2 мл 0.5 М KCl. Полученные яйцеклетки отмывали профильтрованной через нейлоновый фильтр морской водой и оплодотворяли добавлением нескольких капель разбавленной спермы. Зародышей (600–2000/мл) инкубировали в профильтрованной морской воде при комнатной температуре (18–23 °С) в 6-луночных культуральных платах.

Исходные растворы гидрофобных химических соединений готовили в ДМСО, после чего разводили в 10 раз 96% этанолом. Такая процедура способствует увеличению растворимости веществ в солесодержащих средах (морской воде). Маточные растворы водорастворимых соединений готовили на дистиллированной или профильтрованной морской воде. Растворимость исследуемых соединений контролировали с помощью стереомикроскопа МБС-10.

Обработку веществами проводили в 6-луночных культуральных платах. В каждую лунку помещали 5 мл суспензии яйцеклеток или зародышей и добавляли соответствующий объем раствора исследуемого вещества для достижения требуемой конечной концентрации. При этом максимальная концентрация растворителя не превышала предельно допустимую (1% для этанола и 0.05% для ДМСО). Для оценки антимитотической активности яйцеклетки обрабатывали

веществами через 8–15 мин после оплодотворения, и через 2.5–6 ч регистрировали нарушение и/или остановку дробления. О способности веществ воздействовать на тубулин и дестабилизировать микротрубочки судили по характерному изменению плавательного поведения бластул, обработанных веществами в возрасте 8.5–10 ч, сразу после вылупления. Прекращение прямолинейного плавания зародышей у поверхности воды, оседание на дно сосуда и быстрое вращение (спиннинг) вокруг анимально-вегетативной оси является свидетельством антитубулинового механизма действия исследуемых химических соединений. В тестах использовали последовательно понижающиеся в два раза концентрации веществ до исчезновения эффекта. Активность оценивали по наименьшей (пороговой) концентрации ЕС, вызывающей нарушение дробления, остановку дробления и спиннинг зародышей. Наблюдения проводили с помощью оптического микроскопа Биолам ЛОМО (г. Санкт-Петербург, Россия) до перехода к активному питанию (средний плутеус 2).

Использование зародышей морского ежа в качестве объекта удовлетворяет требованиям лабораторной этики. Зародыши развиваются вне материнского организма, отнерестившиеся особи сохраняют жизнеспособность и возвращаются в естественную среду обитания.

8.3. Результаты

За отчетный период на модели зародышей морского ежа *Paracentrotus lividus* было испытано 514 вещества из библиотеки химических соединений ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН и синтезированных в ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН и ТИБОХ ДВО РАН. Были испытаны представители следующих классов органических соединений:

- 1) стильбены, содержащие гетероциклический фрагмент (пиразолы, изоксазолы и триазолы) - синтетические аналоги природных антимитотиков комбретастинов;
- 2) природные и синтетические флавоноиды;
- 3) арилцианохромены - синтетические аналоги природного цитостатика подофиллотоксина;
- 4) синтетические производные природного дитерпеноида изостевиола (ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН);
- 5) метоксинафтохиноны - синтетические аналоги пигмента морских ежей эхинохрома (ТИБОХ ДВО РАН);
- 6) азотсодержащие гетероциклические соединения (пирролил-производные триазолилфуразанов, бензимидазолилфуразаны, пиразолопиридины, тиенопиримидины);
- 7) алкоксинафталины.

Выявлено 120 соединений с антимитотической активностью, обусловленной дестабилизацией микротрубочек. Из них 62 вещества нарушали дробление зародышей морского ежа в концентрации ≤ 50 нМ. Последующие испытания этих веществ на 60 линиях опухолевых

клеток человека в Национальном институте рака США (NCI NIH, USA) по Программе поиска новых противоопухолевых лекарственных средств (Developmental Therapeutic Program, NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen) выявили их высокую цитотоксичность (GI_{50} в области наномолярных значений), а также способность эффективно угнетать рост клеток с множественной лекарственной устойчивостью, обусловленной повышенной экспрессией мембранного транспортного белка Р-гликопротеина. Два соединения отобраны NCI для последующих испытаний на мышах на противоопухолевую активность и острую токсичность.

Исследование зависимости биологической активности от молекулярной структуры показало, что многие мощные антимитотики - дестабилизаторы микротрубочек содержат полиалкоксибензольный фармакофорный фрагмент. В качестве исходных химических реагентов для синтеза таких соединений используются аллилполиалкоксибензолы растительного происхождения, выделенные из легкодоступного экологически чистого растительного сырья – CO_2 - экстракта семян укропа и петрушки.

На примере триазольного производного комбретастина, обладающего выраженной антимитотической антитубулиновой активностью, были проведены исследования механизмов гибели лейкозных клеток человека Jurkat и дочерней линии Jurkat A4, обладающей множественной лекарственной устойчивостью. Исследования проводили совместно с сотрудниками ИЭПОР им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины. Обнаружено, что триазольное производное комбретастина запускает каспазо-зависимый апоптоз в клетках Jurkat. Наряду с этим выявлены признаки гибели клеток по механизму митотической катастрофы. В клетках Jurkat A4 исследуемое вещество не способно запускать апоптоз, однако вызывает остановку клеточного цикла в фазе G2/M с последующей гибелью по еще не выясненному механизму.

Обнаружено, что пиразолопиридиноны специфически блокируют спиколюгенез у плутеусов *P. lividus*, не влияя на дробление и другие процессы дифференцировки и морфогенеза. Эти соединения обладали выраженной избирательной токсичностью по отношению к клеткам лейкемии MOLT-4. Две молекулы этой серии отобраны NCI для исследования острой токсичности на мышах. Проведенные совместные исследования в Novartis (Швейцария) показали, что пиразолопиридиноны не обладают способностью ингибировать протеинкиназы. Механизм действия и клеточные мишени пиразолопиридинов предстоит выяснить.

Испытания производных изостевиола показали, что присоединение трифенилфосфониевого фрагмента, обеспечивающего селективное накопление изостевиола в митохондриях, приводит к появлению аберрантных мультиполярных митотических веретен и остановке клеточного деления предположительно за счет воздействия на ДНК митохондрий. Дальнейшие исследования в Университете г. Пиза (University of Pisa, Italy) на изолированных митохондриях и клетках миокарда крысы выявили способность трифенилфосфониевых

производных изостевиола деполаризовать мембрану митохондрий и снижать захват ионов кальция (calcium uptake), что позволяет рассматривать это соединения как потенциальные кардиопротекторы.

При исследовании эффектов 29 метоксинафтохинонов - синтетических аналогов эхинохрома обнаружены 6 соединений, токсичных для зародышей морского ежа в концентрации 0.05–2

клетках человека.

Испытания 40 химических соединений класса тиенопиримидинов, проводимые совместно с сотрудниками Университета Окленда (University of Auckland, New Zealand) выявили 8 новых молекул с антимиотической активностью, обусловленной дестабилизацией микротрубочек, и 11 веществ с нетубулиновой антипролиферативной активностью, предположительно обусловленной ингибированием фосфолипазы C. Тиенопиримидины с тиофенильным фрагментом вызывали гибель зародышей на стадии раннего плутеуса независимо от продолжительности и стадии обработки, не влияя при этом на предыдущие этапы эмбриогенеза. Испытания тиенопиримидинов на 60 линиях опухолевых клеток человека, проводимые в Национальном институте рака США (NCI), выявили ряд молекул с выраженной цитотоксичностью, в том числе по отношению к клеткам с множественной лекарственной устойчивостью.

8.4. Публикации по разделу

1. Tsyganov D.V., Chernysheva N.B., Salamandra L. K., Konyushkin L.D., Atamanenko O.P., **Semenova M.N.**, Semenov V.V. Synthesis of polyalkoxy-3-(4-phenyl)coumarins with antimetabolic activity using plant allylbenzenes. *Mendeleev Commun.*, 2013, v. 23, issue 3, pp. 147–149.
2. Куликов А.С., Епишина М.А., Батог Л.В., Рожков В.Ю., Махова Н.Н., Конюшкин Л.Д., **Семенова М.Н.**, Семенов В.В. Синтез и противоопухолевые свойства (1,2,3-триазол-1-ил)фуранов. *Известия РАН, Серия химическая*, 2013, № 3, с. 835–842.
3. Tsyganov D.V., Konyushkin L.D., Karmanova I.B., Firgang S.I., Strelenko Y. A., **Semenova M.N.**, Kiselyov A.S., Semenov V.V. *cis*-Restricted 3-aminopyrazole analogues of combretastatins: Synthesis from plant polyalkoxybenzenes and biological evaluation in the cytotoxicity and phenotypic sea urchin embryo assays. – *J. Nat. Prod.* 2013, v. 76, pp. 1485–1491.
4. Tsyganov D.V., Khrustalev V.N., Konyushkin L.D., Raihstat M.M., Firgang S.I., Semenov R.V., Kiselyov A.S., **Semenova M.N.**, Semenov V.V. Regioisomers of 3-(5-)-amino-o-diarylisoxazoles: Synthesis from plant allyl polyalkoxybenzenes and antitubulin activity. – *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, v. 73, pp. 112–125.
5. Demchuk D.V., Samet A.V., Chernysheva N.B., Ushkarov V.I., Stashina G.A., Konyushkin L.D., Raihstat M.M., Firgang S.I., Philchenkov A.A. , Zavelevich M.P., Kuiava L.M., Chekhun V.F., Blokhin D.Yu., Kiselyov A.S., **Semenova M.N.**, Semenov V.V. Synthesis and antiproliferative

- activity of conformationally restricted 1,2,3-triazole analogues of combretastatins in the sea urchin embryo model and against human cancer cell lines. – *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, v. 22, pp. 738–755.
6. **Semenova M. N.**, Tsyganov D.V., Malyshev O.R., Ershov O.V., Bardasov I.N., Semenov R.V., Kiselyov A.S., Semenov V.V. Comparative in vivo evaluation of polyalkoxy substituted 4*H*-chromenes and oxa-podophyllotoxins as microtubule destabilizing agents in the phenotypic sea urchin embryo assay. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, v. 24, pp. 3914–3918.
 7. Семенов В.В., **Семенова М.Н.** Полиалкоксифлавоноиды - ингибиторы деления клеток. *Усп. хим.*, 2015, 84 (2), 134–158.
 8. Stepanov, A. I.; Astrat'ev, A. A.; Sheremetev, A. B.; Lagutina, N. K.; Palysaeva, N. V.; Tyurin, A. Yu.; Aleksandrova, N. S.; Sadchikova, N. P.; Suponitsky, K. Yu.; Atamanenko, O. P.; Konyushkin, L. D.; Semenov, R. V.; Firgang, S.I.; Kiselyov, A. S.; **Semenova, M. N.**; Semenov, V. V. A facile synthesis and microtubule-destabilizing properties of 4-(1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl)-furazan-3-amines. *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, v. 94, pp. 237–251.
 9. Самет А.В., Жужин В.Ю., **Семенова М.Н.**, Семенов В.В. Синтез и антимиотическая активность алкоксизамещённых 1-арил-3-(ариламино)алкенонов. *Известия РАН, Серия химическая*, 2015, № 2, с. 439–444.
 10. Strobukina, I. Yu.; Belenok, M. G.; **Semenova, M. N.**; Semenov, V. V.; Babaev, V. M.; Rizvanov, I. Kh.; Mironov, V. F.; Kataev, V. E. Triphenylphosphonium cations of diterpenoid isosteviol: Synthesis and antimetabolic activity in the sea urchin embryo model. *J. Nat. Prod.*, 2015, v. 78, pp. 1300–1308.
 11. Tsyganov D.V., Krayushkin M.M., Konyushkin L.D., Strelenko Y.A., **Semenova M.N.**, Semenov V.V. Facile synthesis of natural alkoxy-naphthalene analogues from plant alkoxybenzenes. *J. Nat. Prod.*, 2016, v. 79, pp. 923–928.
 12. Semenov V.V., Tsyganov D.V., **Semenova M.N.**, Chuprov-Netochin R.N., Raihstat M.M., Konyushkin L.D., Volynchuk P.B., Marusich E.I., Nazarenko V.V., Leonov S.V., Kiselyov A.S. Efficient synthesis of glaziovianin A isoflavone series from dill and parsley extracts and their in vitro/in vivo antimetabolic activity. *J. Nat. Prod.*, 2016, v. 79, pp. 1429–1438.
 13. Tsyganov D.V., Konyushkin L.D., **Semenova M.N.**, Semenov V.V. Synthesis of analogues of natural antimetabolic glaziovianin A using essential oils of dill and parsley seeds. *Mendeleev Commun.*, 2016, v. 26, pp. 285–287.
 14. Samet A.V., Silyanova E.A., **Semenova M.N.**, Karnoukhova V.A., Semenov V.V. An efficient synthesis of fused 2-aryliminothiazolines via a solvent-free cyclopropyliminium rearrangement. *ChemistrySelect*, 2016, v. 1, pp. 2373–2376.

8.5. Список цитированной литературы

1. De Andrade Cunha G.M., Fontenele J.B., Nobre Junior H.V., de Sousa F.C.M., Silveira E.R., Nogueira N.A.P., de Moraes M.O., Viana G.S.B., Costa-Lotufo L.V. Cytotoxic activity of chalcones isolated from *Lonchocarpus sericeus* (Pocr.) Kunth. *Phytother. Res.*, 2003, v. 17, pp. 155–159.
2. McClay D.R. Evolutionary crossroads in developmental biology: sea urchins. *Development*, 2011, v. 138, pp. 2639–2648.
3. Ernst S.G. Offerings from an urchin. *Dev. Biol.*, 2011, v. 358, pp. 285–294.
4. Falugi C., Lammerding-Koppel M., Aluigi M.G. Sea urchin development: an alternative model for mechanistic understanding of neurodevelopment and neurotoxicity. *Birth Defects Res., Part C*, 2008, v. 84, pp. 188–203.
5. Macedo D., Mendonça Júnior, F.J.B., de Moura R.O., Marques-Santos L.F. Antimitotic activity of the pyrimidinone derivative py-09 on sea urchin embryonic development. *Toxicol. in vitro*, 2016, v. 31, pp. 72–85.
6. Madari Y., Panda D., Wilson L., Jacobs R.S. Antimitotic and antitubulin activity of the tumor inhibitor steganacin. *Cancer Res.*, 2003, v. 63, pp. 1214–1220.
7. Magalhaes H., Bezerra D., Cavalcanti B., Wilke D., Rotta R., de Lima D.P., Beatriz A., Alves A., Bitencourt F.da S., de Figueiredo I., Alencar N., Costa-Lotufo L.V., Moraes M., Pessoa C. In vitro and in vivo antitumor effects of (4-methoxyphenyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanone. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2011, v. 68, pp. 45–52.
8. Militao G.C., Jimenez P.C., Wilke D.V., Pessoa C., Falcao M.J., Sousa Lima M.A., Silveira E.R., de Moraes M.O., Costa-Lotufo L.V. Antimitotic properties of pterocarpanes isolated from *Platymiscium floribundum* on sea urchin eggs. *Planta Med.*, 2005, v. 71, pp. 683–685.
9. de Lima D.P., Rotta R.R., Beatriz A., Marques M.R., Montenegro R.C., Vasconcellos M.C., Pessoa C., de Moraes M.O., Costa-Lotufo L.V., Frankland Sawaya A.C.H., Eberlin M.N. Synthesis and biological evaluation of cytotoxic properties of stilbene-based resveratrol analogs. *J. Med. Chem.*, 2009, v. 44, pp. 701–707.
10. Nishioka D., Marcell V., Cunningham M., Khan M., Von Hoff D.D., Izbicka E. The use of early sea urchin embryos in anticancer drug testing. *Methods Mol. Med.*, 2003, v. 85, pp. 265–276.
11. Pedersen T. The sea urchin's siren. *Dev. Biol.*, 2006, v. 300, pp. 9–14.
12. Swinney D.C. Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clin. Pharm. Ther.*, 2013, v. 93, pp. 299–301.

Отчет утвержден решением Ученого совета ИБР РАН, «27» декабря 2016 г., протокол № 14.