

ВАГИН Ю.В., ВАГИНА И.Н.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Украина, 03143, Киев, Ул. Заболотного, 150, e.mail: maliuta@imbg.org.ua

ОВАРИАЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ ПЕРИИМПЛАНТАЦИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

По всей вероятности, возникновение в процессе эволюции млекопитающих периимплантиции явилось ключевым событием, предопределившим формирование инфракласса – *Eutheria* [1]. Наиболее полная информация о событиях, характерных для периимплантиционного периода, собрана в исследованиях, проводившихся на мышевидных грызунах [2,6]. Периимплантиционный период сопровождается рядом цитологических, морфологических и физиологических перестроек матки и эмбрионов, способствующих их подготовке к имплантации [2]. Все указанные изменения направлены на подготовку и успешное завершение процесса имплантации и сопряжены с активацией *de novo* сотен генов [6]. Успех имплантации эмбриона определяется его “диалогом” с маткой, происходящем на клеточно-молекулярном уровне [2,6,12]. У всех изученных до настоящего времени плацентарных млекопитающих матка в течение периимплантиционного периода обретает способность к эффективному двустороннему “общению” с бластоцистами, инициирующему восприимчивость матки и готовность эмбриона к имплантации [2]. Состояние восприимчивости длится ограниченное время [2,6]; при этом маточная среда способна поддержать рост бластоцисты, ее прикрепление и последующие процессы имплантации [5,10]. Последовательность указанных событий четко выверена в рамках пространственно-временного континуума. Соответственно, сдвиги в данной системе координат могут иметь роковые последствия для развивающегося в утробе матери потомства. Главными факторами, определяющими восприимчивость матки, являются овариальные стероиды - прогестерон и эстрогены. Однако если у мышей и крыс успех имплантации зависит от обоих гормонов, то у куньих, свиней, морских свинок, кроликов и хомячков указанный процесс обеспечивается только прогестероном [2,6]. В исследованиях на мышевидных грызунах было установлено, что процессы активации и имплантации их бластоцист быстро инициируются единичной инъекцией эстрогена в прогестерон-подготовленную матку [2]. Таким образом, у мышей важными факторами, определяющими состояние восприимчивости матки к имплантации, являются овариальные стероиды - прогестерон и эстрогены. Данное состояние матки подразделяется на три фазы: пререцептивное – матка еще не обрела восприимчивости к имплантации, рецептивное – матка восприимчива к имплантации, неререцептивное (рефракторное) – матка утратила восприимчивость к имплантации [5]. Временной период, когда матка находится в рецептивной фазе, был назван “окном имплантации” [2]. У плацентарных млекопитающих, в том числе у мышей и крыс, переход матки в состояние, определяющее успех имплантации бластоцист, возможен лишь в условиях их обоюдного взаимодействия с маткой [2,6,12]. Продолжительность этого состояния крайне ограничена [10]. При этом матка способна обеспечивать рост бластоцисты, ее прикрепление и последующий процесс имплантации [5,10]. Выяснилось, что у мыши матка полностью рецептивна на четвертый день, а в течение первых трех дней беременности или псевдобеременности ее можно считать пререцептивной [10]. В тоже время матку мыши можно сделать рецептивной путем инъекции особям малых доз эстрогена через 24-48 часов после обработки матки прогестероном [2]. Рецептивность матки и, соответственно, эффективность имплантации постепенно снижаются, и к шестому дню матка становится полностью рефракторной. Было установлено, что состояние открытости-закрытости “окна имплантации” у мышей определяется

изменениями уровней концентраций эстрогена в пределах довольно узкой области: при низких уровнях эстрогена "окно" остаётся открытым в течение достаточно длительного времени, однако оно стремительно закрывается по мере их повышения. При этом, очень высокие уровни эстрогена, переводя матку в фазу нерцептивности, в тоже время обуславливают нехарактерную для данной фазы экспрессию генов, связанных с имплантацией. Еще одним важным фактором, контролирующим, наряду с эстрогенами, процесс формирования "окна имплантации", является состояние активности бластоцисты. Очевидно, что активная и "спящая", бластоцисты молекулярно и физиологически различны. Так, рецептор эпидермального фактора роста (ЭФР), циклоксигеназа-2 (ЦОГ-2) и рецептор гистамина второго типа являются факторами, связанными с реакцией прикрепления, и экспрессируются в реактивированных бластоцистах, но снижают свою экспрессию в покоящихся [10]. Напротив, экспрессия каннабиоидного рецептора-1, связанного с G-белком, активирующаяся природными и эндо- каннабиоидами, снижается в активных бластоцистах и повышается в "спящих" бластоцистах [13]. В целом, эти данные отражают специфику молекулярных механизмов, контролирующих активацию бластоцисты и ее покоящееся состояние. Эстрогены обладают плеiotропным митогенным эффектом, распространяющимся на ткани мишени через мембранные и ядерные эстрогеновые рецепторы [8]. Они играют ключевую роль в активации и имплантации бластоцисты у мышей и крыс [6]. Мембранные эстрогеновые рецепторы (ЭР) экспрессируются в клетках всех типов покоящихся и реактивированных бластоцист мыши [9], а оба типа ядерных эстрогеновых рецепторов, ЭР α и ЭР β , идентифицировались в клетках только покоящейся бластоцисты [11]. Обработка мыши, находящейся на стадии задержки имплантации, эстрадиолом-17 β приводила через 6 часов к активации S-фазы клеточного цикла ее эмбрионов, а через 12 часов у них наблюдалось увеличение количества клеток [14]. В дальнейшем выяснилось, что основные эстрогены млекопитающих - эстрадиол-17 β , эстрон и эстрил – не активируют непосредственно покоящийся эмбрион мыши, поскольку эстрадиол-17 β не способен индуцировать экспрессию связанного с бластоцистой эпидермального фактора роста (ЭФР), являющегося ключевым признаком ее активации; кроме того, обработанные эстрогеном *in vitro* бластоцисты не приобретали способности к имплантации [11]. По мнению авторов указанного сообщения, эстрогеновые эффекты, связанные с реактивацией покоящихся бластоцист, могут опосредоваться не через классические ядерные рецепторы; указанным авторам удалось, используя негеномный сигнальный путь, вызвать активацию эмбрионов с помощью ЭФР и маточных катехоловых эстрогенов. Позднее наличие данного сигнального пути получило дополнительное подтверждение [7]. За последнее время накопилось достаточно фактов, указывающих на то, что действие эстрогена при подготовке матки и таковое при активации бластоцисты – два разных процесса. В экспериментах *in vitro*, проведенных на покоящихся бластоцистах, было установлено, что они не достигают имплантационной компетенции при обработке эстрадиолом, хотя и имеют оба типа ядерного ЭР. В свою очередь, бластоцисты, находящиеся в состоянии покоя, при культивировании *in vitro* становятся имплантационно компетентными, реагируя на катехолэстроген: 4-гидрокси-17- β -эстрадиол (4-ОН-Э₂). Вместе с тем, антагонист ядерного ЭР, ICI-182,780, не изменяет этой реакции, а это свидетельствует о том, что передача сигналов через ядерный ЭР не является решающей для активации бластоцисты [11]. Результаты экспериментов по переносу зародышей реципиентным самкам мышей с задержанной имплантацией свидетельствовали о том, что первичный эстроген, 17- β -эстрадиол, инициировал имплантационные процессы в самой матке, а его катехоловый метаболит, 4-ОН-Э₂, участвовал в активации "спящих" бластоцист. Наряду с 4-ОН-Э₂ в активации бластоцист принимают участие простагландины (ПГны), синтезированные с помощью ЦОГ-2 и цАМФ [2,11]. Результаты использования указанного выше антагониста

ядерного ЭР показали, что эстрадиол подготавливает прогестерон-обработанную матку к рецептивному состоянию эндокринно - через взаимодействие с ядерными ЭРми; в свою очередь, 4-ОН-Э₂, образовавшийся в матке из эстрадиола, осуществляет активацию бластоцисты паракринно, то есть использует сигнальный путь, минуя ядерные ЭРы. Таким образом, представленные выше результаты экспериментов, призванных прояснить специфику действия эстрогенов на матку и покоящуюся бластоцисту, показали, что первичные эстрогены готовят матку к рецептивной фазе, а их производные, катехолэстрогены, активируют бластоцисту. При этом, указанные гормоны используют также и различные сигнальные пути. Итак, классическое действие эстрогенов осуществляется через взаимодействие с ядерным эстрогеновым рецептором, лиганд-зависимым транскрипционным фактором, который представлен двумя типами: ЭР α и ЭР β [3]. Комплекс эстроген-ЭР образует гомодимер, связывающийся с эстроген-реагирующими элементами (ЭРЭами) в регуляторных областях целевых генов; данные элементы обычно присутствуют в 5'-фланкирующей области специфических генов. Выяснилось также, что у большинства эстроген-реагирующих генов напрочь отсутствуют известные ЭРЭты [15]. Эти результаты также подтверждают представление о негеномном сигнальном пути, через который опосредуются некоторые эстрогеновые эффекты. Количество данных, указывающих на то, что многие из быстрых маточных эффектов эстрогенных соединений не связаны с классическими геномными эффектами [6], продолжает расти. Так, самки мышей, мутантные по гену, контролирующему продукцию ЭР α , проявляют реакцию на катехолэстрогены или ксеноэстрогены. И все же приходится признать, что координированные эффекты эстрогена, наблюдаемые в матке при имплантации, реализуются, в основном, через их ядерные рецепторы [11]. В экспериментах с мышами, мутантными по генам, контролирующим экспрессию эстрогеновых рецепторов, выяснилось, что ЭР α / ЭР α особи имеют гиперстимулированные яичники и гипопластические матки и, соответственно, бесплодны. В дальнейшем было установлено, что им для успешной имплантации необходим функционально-активный ЭР α , поскольку перенос бластоцист в эстроген-прогестерон-обработанные матки мышей ЭР α / ЭР α не способствовал имплантации [4]. При этом выяснилось, что эти мыши могут индуцировать и поддерживать децидуализацию в ответ на искусственные стимулы при соответствующей подготовке даже одним прогестероном. Вероятно у ЭР α / ЭР α мышей нарушение имплантации обусловлено срывом реакции прикрепления, поскольку процесс децидуализации у них протекает нормально. Эстрадиол гидроксилируется до 4-ОН-Э₂ с помощью P450 связанного фермента CYP1B1 [6]. Данный фермент присутствует повсеместно в мышечной матке на четвертый день, но исчезает из мест имплантации на пятый день беременности [11]. Было установлено, что покоящиеся бластоцисты, перенесенные в матки реципиентов с задержанной имплантацией, имплантируются в пределах одного часа после введения эстрадиола. Однако аналогичные бластоцисты не имплантировались, если пересаживались в матки реципиентов по истечению часового периода. Эти результаты указывают на то, что *in utero* процессы реактивации и имплантации бластоцист быстротечны и ограничены непродолжительным интервалом времени [11]. Напротив, покоящиеся бластоцисты, культивируемые в присутствии 4-ОН-Э₂ (но без эстрадиола), приобретали компетенцию к имплантации; в результате, при их переносе в матки псевдобеременных реципиентов, они имплантировались далеко за пределами одночасового окна. Сходные данные были получены при культивировании покоящихся бластоцист в присутствии простагландина E₂ (ПРГЕ₂) или цАМФ, что указывает на важную роль ЦОГ-2 сигнального пути в реактивации бластоцист [11]. Показано, что коинкубация покоящихся бластоцист и ингибитора ЦОГ-2, происходящие в присутствии 4-ОН-Э₂, эффективно блокирует их активацию и имплантацию при переносе в подходящих реципиентов. Данный эффект ЦОГ-2 ингибитора частично снимался добавлением

ПРГЕ₂ в культуральные среды. Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что действие 4-ОН-Э₂ на покоящиеся бластоцисты, реиницирующее их развитие, осуществляется через ЦОГ-2 сигнальный путь, ведущий к увеличению внутриклеточных концентраций цАМФ [6].

Литература

1. *Вагин Ю.В.* Периимплантационная программа морфогенеза – эволюционное know how плацентарных млекопитающих. // Биополимеры и клетка. – 2007. – 23. – С. 332-337.
2. *Carson D.D., Bagchi I., Dey S.K., Enders A.C., Fazleabas A.T., Lessey B.A., Yoshinaga K.* Embryo implantation. // *Dev. Biol.* – 2000. – 223. – P. 217–237.
3. *Couse J.F., Korach K.S.* Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? // *Endocr. Rev.* – 1999. – 20. – P. 358–417.
4. *Curtis H., Goulding E.H., Eddy E.M., Korach K.S.* Studies using the estrogen receptor knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. // *Biol. Reprod.* – 2002. – 67. – P. 1268–1277.
5. *Dey S.K.* Implantation. // In book: *Reproductive endocrinology, surgery and technology.* New York: Lippincott-Raven. – 1996. – P. 421–434.
6. *Dey S.K., Lim H., Das S.K., Reese J., Paria B.C., Daikoku T., Wang H.* Molecular cues to implantation. // *Endocrine Reviews.* – 2004. – 25. – P. 341–373.
7. *Driggers P.H., Segars J.H.* Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. // *Trends in Endocrinology and Metabolism.* – 2002. – 13. – P. 422–427.
8. *Frasor J., Danes J.M., Komm B., Chang K.C., Lyttle C.R., Katzenellenbogen B.S.* Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. // *Endocrinology.* – 2003. – 144. – P. 4562–4574.
9. *Hou Q, Paria BC, Mui C, Dey SK & Gorski J.* Immunolocalization of estrogen receptor protein in the mouse blastocyst during normal and delayed implantation. // *PNAS.* – 1996. – 93. – P. 2376–2381.
10. *Paria B.C., Huet H., Dey S.K.* Blastocyst's state of activity determines the “window” of implantation in the receptive mouse uterus. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – 90. – P. 10159–10162.
11. *Paria B.C., Lim H., Wang X.N., Liehr J., Das S.K., Dey S.K.* Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholesterogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. // *Endocrinology.* – 1998. – 139. – P. 5235–5246.
12. *Paria B.C., Song H., Dey S.K.* Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. // *J.Dev. Biol.* – 2001. – 45. – P. 597-605.
13. *Paria B.C., Song H., Wang X., Schmid P.C., Krebsbach R.J., Schmid H.H., Bonner T.I., Zimmer A., Dey S.K.* Dysregulated cannabinoid signaling disrupts uterine receptivity for embryo implantation. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – 276. – P. 20523–20528.
14. *Spindler R.E., Renfree M.B., Gardner D.K.* Carbohydrate uptake by quiescent and reactivated mouse blastocysts. // *J. Exp. Zool.* – 1996. – 276. – P. 132–137.
15. *Stancel G.M., Boettger T., Chiappetta C., Hyder S.M., Kirkland J.L., Murthy L., Loose M.* Toxicity of endogenous and environmental estrogens: what is the role of elemental interactions? // *Environ. Health Perspect.* – 1995. – 103(Suppl 7). – P. 29–33.

Резюме

Представлены данные о событиях, связанных с контролем периимплантационного периода, осуществляемым с помощью овариальных факторов.

Представлено дані про події, щодо контролю періімплантаційного періоду, який здійснюється за допомогою овариальних факторів.

The data presented concerning events on periimplantation period control, which is accomplished with the help of ovarian factors.

ВОЛКОВА Н.С., ВОРОБІЙОВА Л.І.

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Україна, 61077, Харків, пл. Свободи 4, e-mail: volkova_natalya@bk.ru

ВПЛИВ ПІГМЕНТНИХ МУТАЦІЙ НА СТАТЕВУ ПОВЕДІНКУ *Drosophila melanogaster*

На сучасному етапі розвитку нейрогенетики та генетики поведінки триває пошук та дослідження зручних моделей, які дозволили б аналізувати генетичну структуру комплексних ознак поведінки людини як в нормі, так і при різних патологіях. Досить широкого вжитку набув у зазначеній галузі і класичний об'єкт генетичних досліджень – *Drosophila melanogaster* [1, 2], адже ключові сполуки та біохімічні реакції, що забезпечують функціонування нервової системи, а відповідно і формування фенотипу поведінки, є надзвичайно еволюційно консервативними. Більш того, за результатами проєктів “Геном дрозофіли” та “Геном людини” було встановлено цілу низку генів, які є гомологічними для видів *D. melanogaster* та *Homo sapiens* (www.FlyBase.com). Дане дослідження мало на меті вивчити вплив деяких генів, які контролюють певні реакції обміну амінокислот, що є джерелом нейроактивних речовин, на статеву поведінку *D. melanogaster*.

Матеріали та методи

Вихідний матеріал: лінії *D. melanogaster* з колекції кафедри генетики і цитології ХНУ ім. В.Н. Каразіна: *Canton-S (C-S)*, *Oregon (Or)* – інбредні лінії дикого типу та у (1 – 0.0) – жовте тіло, w (1 - 1.5) – білі очі, w^a (1 - 1.5) – абрикосові очі, b (2 – 48.5) – чорне тіло, cn (2 - 57.5) – кіноварні очі – аутбредні мутантні лінії. Для всіх зазначених генів виявлені гомологічні послідовності у геномі *Homo sapiens* (www.FlyBase.com). Лінії утримували у культуральних склянках (висота 10 см; діаметр 2,0 см; об'єм поживного середовища у склянці – 5 мл) на стандартному дріжджовому середовищі у термостаті (t=23±1°C). У експеримент брали лише віргіних статевозрілих особин (вік – 3 доби). До досягнення необхідного віку самців та самиць утримували окремо. Статеву активність самців визначали за кількістю останніх, які здійснили парування упродовж 1 години [3, 4]. Для цього особин поміщали до тестерної камери у співвідношенні 2n♀♀: n♂♂, де n – кількість особин (5±2), та фіксували відсоток особин чоловічої статі, які здійснили парування упродовж 1 години. Аналіз статевої рецептивності самиць проводили аналогічно, але особин брали у співвідношенні n♀♀: 2n♂♂ та фіксували долю самиць, які здійснили парування упродовж 1 години. Варіанти, коли жодна з пар у копуляцію не вступила, приймали за «0». Для вивчення впливу окремих локусів на статеву поведінку попередньо проводили насичуючі схрещування мутантних ліній с лінією *C-S* та з лінією *Or* в умовах направленою добору на маркерну мутацію та отримали вирівняні за генотипом мутантні лінії. Використовували методи статистичного аналізу: *t*-критерій Ст'юдента, дисперсійний аналіз кількісних ознак (силу впливу факторів (h_x^2) оцінювали за методом М. Снедекора) [5].

Результати та обговорення

Встановлено, що пігментні мутації, які призводять до порушень певних реакцій обміну амінокислот-джерел нейроактивних речовин, у низці випадків істотно впливають і на статеву поведінку особин *D. melanogaster* (Табл.1.). При цьому не спостерігається єдиноспрямованого пригнічення або стимуляції в наслідок заміщення генотипу мутантних особин, а напрямок впливу різних мутацій на статеву активність