

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ АМФИБИЙ

© К. Н. Морозова,¹ Е. В. Киселева²

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;
электронный адрес: ¹ morozko@bionet.nsc.ru; ² elka@bionet.nsc.ru*

Проведено морфологическое исследование ооцитов амфибий на разных стадиях оогенеза и изучена динамика эндоплазматического ретикулума (ЭПР) в процессе их развития. Сравнительный морфометрический анализ относительной площади поверхности мембран ЭПР и относительного объема этого компартмента в периферической, средней и околоядерной цитоплазме ооцитов амфибий показал, что на I—II стадиях роста ооцита большое скопление мембран ЭПР регистрируется преимущественно в периферической области клетки. На III—IV стадиях роста ооцита, сопровождающихся активацией транскрипции, происходят увеличение относительной площади поверхности мембран ЭПР и относительного объема ЭПР в средней и околоядерной областях цитоплазмы и уменьшение этих параметров в периферическом отделе клетки. Одновременно наблюдается множественное слияние пузырьков ЭПР с наружной ядерной мембраной, что свидетельствует об активном формировании новых фрагментов ядерной оболочки на этой стадии оогенеза. V—VI стадии развития ооцита характеризуются увеличением общего объема ЭПР в целом на ооцит. Предполагается, что выявленная реорганизация ЭПР в растущих ооцитах амфибий обусловлена процессами вителлогенеза — накопления желтка, перераспределением ионов Ca^{2+} , синтезом и запасанием белков и липидов, необходимыми для обеспечения развития будущего эмбриона, а также сборкой новых фрагментов растущей ядерной оболочки.

Ключевые слова: эндоплазматический ретикулум, морфометрический анализ, ультраструктура, оогенез амфибий.

Исследованию особенностей ультраструктурной организации развивающихся ооцитов посвящено большое количество работ (Айзенштадт, 1984; Wallace, Selman, 1990; Ebner et al., 2003; Smith et al., 2004), в которых подробно описана динамика внутриклеточных органелл на разных стадиях оогенеза. При этом особое внимание уделялось изучению морфологии эндоплазматического ретикулума (ЭПР), выполняющего важнейшую функцию среди мембранных компонентов клетки, поскольку этот компартмент обеспечивает синтез всех белков и липидов, а также организует внутриклеточное пространство, продолжаясь в наружную мембрану ядерной оболочки (Palade, 1975; Van Meer, 1993; Levin, Rabouille, 2005). Кроме того, ЭПР играет центральную роль в передаче внутриклеточных сигналов за счет накопления и выброса ионов кальция (Terasaki, Sardet, 1991; Berridge, 2002; Michalak et al., 2002; de Martin et al., 2005; Verkhratsky, 2005). Различные процессы в клетке, включая экзо- и эндоцитоз, фагоцитоз, формирование ядерной оболочки и внутриклеточный транспорт, требуют большого количества мембранных компонентов. Частично эта потребность удовлетворяется за счет плазматической мембраны клетки, однако большинство внутриклеточных мембран формируется de novo с участием элементов гладкого и шероховатого ЭПР.

ЭПР является высокодинамичной структурой, реорганизующейся при различных воздействиях на клетку, а также при изменении физиологического состояния кле-

ток в процессе развития организмов и при различном уровне экспрессии генов (Jaffe, Terasaki, 1994; Fedorovitch et al., 2005; de Martin et al., 2005). Такие фундаментальные клеточные процессы, как сборка ядерной оболочки в митозе, поддержание кальциевого гомеостаза, мембранный транспорт и секреция, сопровождаются изменением формы и расположения ЭПР в цитоплазме (Paiement, Bergeron, 2001). Это было продемонстрировано с использованием электронно-микроскопических и морфометрических методов, показавших, что количество мембран ЭПР изменяется в процессе клеточной дифференцировки, пролиферации, а также при гормональной индукции (Христолюбова, 1972; Lee, Chen, 1988; Prinz et al., 2000; Семченко, Хижняк, 2001). Реорганизация мембран ЭПР также происходит в ответ на стрессовые для клетки условия, например при изменении концентрации Ca^{2+} в клетках млекопитающих (Subramanian, Meyer, 1997; Sidrauski et al., 1998).

Механизм формирования различных компонентов ЭПР исследовался в экспериментах *in vitro*, показавших, что цистерны ЭПР образуются путем слияния мембранных пузырьков (Dreier, Rapoport, 2000). Было также показано, что формирование ЭПР не зависит от присутствия микротрубочек, хотя развитие и организация ЭПР в соматических клетках тесно ассоциированы с их распределением (Terasaki et al., 1986; Lee et al., 1989). Многие исследования продемонстрировали активное участие ЭПР в сборке—разборке ядерной оболочки в митозе и

позволили выявить последовательные этапы этих процессов (Marshall, Wilson, 1997; Kiseleva et al., 2001; Burke, Ellenberg, 2002). В условиях *in vitro* было показано, что в формировании ядерной оболочки принимают участие два типа различающихся по составу мембранных пузырьков (Lohka, 1998; Drummond et al., 1999). Сначала в этот процесс вовлекаются шероховатые пузырьки ЭПР, связывающиеся с хроматином, затем с ними сливаются гладкие пузырьки ЭПР, в результате чего формируется ядерная оболочка (Wiese et al., 1997; Lohka, 1998). При разборке ядерной оболочки в профазе митоза ее наружная и внутренняя мембраны распадаются на отдельные пузырьки либо перемещаются в сеть протяженных цистерн ЭПР (Marshall, Wilson, 1997; Cotter et al., 1998).

Наименее исследованным является в настоящее время вопрос об участии ЭПР в сборке новых фрагментов ядерной оболочки в неделящихся растущих клетках, таких, например, как развивающиеся ооциты. К настоящему времени достаточно хорошо изучена динамика ЭПР в зрелых ооцитах на последних стадиях их созревания, а также после их оплодотворения (Henson et al., 1990; Jaffe, Terasaki, 1994). Показано, что реорганизация ЭПР на последних стадиях мейотического деления ооцитов связана с их подготовкой к оплодотворению и является характерной особенностью этих клеток (Mehlmann et al., 1995), однако механизм этого процесса еще слабо изучен. Установлено, что после оплодотворения ооцитов амфибий в их цитоплазме наблюдаются большие скопления (кластеры) мембранных компонентов ЭПР (Terasaki, 2000), что связывают с активацией синтеза различных белков, необходимых для развивающегося эмбриона. Данных о характере распределения ЭПР в ооцитах на ранних стадиях оогенеза очень мало, хотя это представляет большой интерес, поскольку ранние стадии являются наиболее активными по интенсивности процессов амплификации генов, а также транскрипции (Дэвидсон, 1972; Roger et al., 2002). Известно, что в течение профазы мейоза диаметр яйцеклетки амфибий и ее ядра увеличиваются примерно в 9 и 5 раз соответственно (Duryee, 1950), что должно сопровождаться увеличением количества различных органелл в клетке и ростом ядерной оболочки, в формировании которой ЭПР может принимать активное участие. Это позволяет предполагать, что площадь поверхности мембран ЭПР и его объем, а также расположение компонентов ЭПР по цитоплазме клеток должны при этом существенно изменяться.

Основной задачей настоящей работы являлось ультраструктурное и морфометрическое исследование динамики ЭПР в цитоплазме ооцитов ксенопуса в процессе их развития, а также выяснение возможной роли ЭПР в процессе формирования ядерной оболочки на разных стадиях оогенеза. Установлено, что в процессе развития ооцита от (от I до VI стадии оогенеза) происходят реорганизация и перемещение пузырьков и мембран ЭПР из периферической области клетки в среднюю и околоядерную области цитоплазмы. На III—IV стадиях развития ооцитов многочисленные пузырьки ЭПР накапливаются в околоядерной области цитоплазмы и многие из них сливаются с наружной ядерной мембраной, что может свидетельствовать о непосредственном участии компонентов ЭПР в формировании ядерной оболочки. На более поздних стадиях ЭПР распределен более равномерно по различным областям цитоплазмы.

Материал и методика

В качестве объекта исследования использовали шпорцевых лягушек *Xenopus laevis*. Лягушек содержали в профильтрованной и аэрированной воде при комнатной температуре. Животных усыпляли хлороформом, ооциты на I—VI стадиях развития выделяли из вскрытой брюшины и переносили в раствор Рингера для амфибий (Macgregor, Varley, 1983). Ооциты фиксировали 2.5%-ным раствором глутаральдегида в 0.1 М HEPES-буфере в течение 1 ч при комнатной температуре, затем дофиксировали в 1%-ном OsO₄ в течение 1 ч при 4 °С. Образцы дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, заливали в эпоксидную смолу Agar-100 и полимеризовали в термостате при 60 °С в течение 2 сут. Срезы толщиной около 50—70 нм получали с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме (Reichert, Австрия), контрастировали растворами цитрата свинца и уранил-ацетата, после чего изучали в электронном микроскопе LEO 910 (Германия) при ускоряющих напряжениях 60 и 80 кВ.

Ооциты на разных стадиях развития идентифицировали по размерам и пигментированности согласно классификации Дьюри (Duryee, 1950; Семакова, Киселева, 2003). Для морфометрического анализа параметров ЭПР образцы объединяли в 3 группы: ооциты на стадиях I—II, ооциты на стадиях III—IV и ооциты на стадиях V—VI (рис. 1, а). После определения стадии созревания ооцитов на полутонких срезах в световом микроскопе получали ультратонкие срезы, которые анализировали в электронном микроскопе согласно приведенной ниже схеме. Для каждой стадии случайным образом отбирали по 33 ооцита. Для каждого ооцита анализировали по 15 участков, размещая тестовую рамку случайным образом внутри периферической, средней или околоядерной области цитоплазмы. Протяженность каждой области цитоплазмы ооцита определяли для разных стадий оогенеза по условному, единому для всех образцов принципу (рис. 1, б, в). Например, для стадий I—II к периферической области ооцита относили фрагмент цитоплазмы, имеющий ширину в радиальном направлении 5 мкм (при отсчете от плазматической мембраны клетки). К околоядерной области относили фрагмент аналогичного размера начиная от ядерной мембраны, а к средней области — участок цитоплазмы, находящийся между первыми двумя областями. Поскольку диаметр ядра ооцита от I к VI стадии оогенеза возрастает почти в 6 раз, условный размер периферической и околоядерной зон увеличивали пропорционально этому значению. Для стадий III—IV размеры периферической и околоядерной областей определяли как 15 мкм, а для стадий V—VI — как 25 мкм.

Параметрами для морфометрического анализа служили относительная площадь поверхности мембран ЭПР и относительный объем ЭПР. Поскольку объем структуры на срезе представлен площадью сечения, а площадь поверхности на срезе определяется по длине профиля (Груздев, 1974), в настоящей работе с использованием статистической программы AnalySIS (версия 2.11, Soft Imaging System) подсчитывали среднюю протяженность всех мембран, ограничивающих полости ЭПР, и среднюю площадь внутреннего пространства ЭПР, ограниченного всеми мембранами ЭПР, попадающими на единицу площади среза (участок площадью 1 мкм²) в изучаемой области ооцита. Относительная площадь поверхности мембран ЭПР и их относительный объем оце-

нивали для каждой из трех анализируемых областей. Для оценки общей площади поверхности мембран ЭПР и общего объема ЭПР на ооцит в целом значения относительной площади поверхности мембран и относительно объема ЭПР на единицу объема цитоплазмы для каждой из областей приводили к объему данной области, а затем суммировали.

В работе использовали следующие реактивы: HE-PES-буфер и глутаральдегид (Fluka, Германия); тетраокись осмия (Johnson Matthey, Англия); Агар-100 (Agar Scientific, Англия), уранил-ацетат и цитрат свинца (Serva, Германия).

Результаты

Процесс развития ооцитов амфибий включает в себя, согласно классификации Дьюри (Duguee, 1950), шесть стадий. Морфологическое исследование структурной организации растущих ооцитов амфибий на разных стадиях развития, проведенное на полутонких срезах, показало, что от I к VI стадии развития диаметр клеток увеличивается со 150 до 1300 мкм, а диаметр ядра возрастает при этом со 100 до 600 мкм (рис. 1, а). Сравнительный электронно-микроскопический анализ ооцитов показал, что в процессе раннего оогенеза структурная организация ооцита существенно усложняется, что сопровождается перераспределением органелл по цитоплазме клетки.

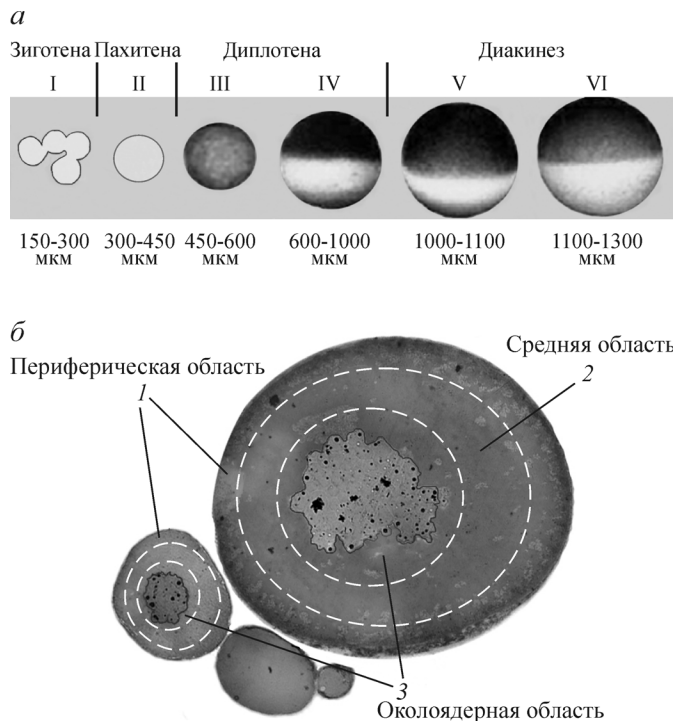


Рис. 1. Ооциты ксенопуса на разных стадиях развития при исследовании в световом микроскопе.

а — размеры ооцитов ксенопуса на разных стадиях оогенеза и соответствующие стадии профазы первого деления мейоза; б — схема условного разделения цитоплазматического пространства ооцита на срезе для проведения морфометрического анализа распределения ЭПР в цитоплазме ооцита: 1 — периферическая область, 2 — средняя область, 3 — околоядерная область.

Особенности ультраструктурной организации ооцитов на разных стадиях оогенеза. I—II стадии оогенеза. Установлено, что ранний ооцит имеет прозрачную цитоплазму и характеризуется присутствием «митохондриальных полей», состоящих из плотно расположенных удлинённых митохондрий. Кортикальные и желточные гранулы в цитоплазме практически отсутствуют, аппарат Гольджи развит слабо, в цитоплазме множество рибосом, многочисленные пузырьки и цистерны гладкого и шероховатого ЭПР наблюдаются в больших количествах вблизи плазматической мембраны (рис. 2, а, б). В средней области цитоплазмы ооцита элементы ЭПР немногочисленны (рис. 2, в, г), а в околоядерной области они практически отсутствуют. При этом ядерная оболочка имеет сглаженные контуры и содержит ядерные поровые комплексы, расположенные с высокой плотностью (рис. 2, д, е).

III—VI стадии оогенеза. На этих стадиях начинается формирование желточных гранул (вителлогенез), сопровождающееся увеличением количества мембран и пузырьков ЭПР в цитоплазме клетки (рис. 3, а—е). Митохондриальные поля распадаются, и митохондрии распределяются по всей цитоплазме. Одновременно появляются небольшие кортикальные гранулы, мигрирующие по направлению к плазматической мембране. Наблюдается более развитый аппарат Гольджи (рис. 3, в), компоненты которого располагаются преимущественно на периферии клетки. В цитоплазме встречается большое количество окончатых мембран, располагающихся в средних и околоядерных областях клетки. ЭПР распределен более равномерно по цитоплазме, его по-прежнему много на периферии клетки (рис. 3, а), но при этом возрастает количество его компонентов в средней и околоядерной областях (рис. 3, б—е). В околоядерной области появляются многочисленные пузырьки ЭПР диаметром от 150 нм и более, многие из которых контактируют и сливаются с наружной мембраной ядерной оболочки (рис. 3, д, е). Вблизи области такого слияния обнаруживаются участки, свободные от ядерных пор, а также незрелые поры на промежуточных этапах их формирования. При этом ядерная оболочка становится менее ровной и содержит выпуклые и вогнутые участки (не показано).

V—VI стадии оогенеза. На последних этапах оогенеза амфибий, соответствующих диакинезу первого деления мейоза, происходит дифференцировка ооцита на два полюса, строго разграниченных по экватору клетки: анимальный (пигментированный) и вегетативный (светлый) (рис. 1, а). Желточные гранулы, накапливающиеся в цитоплазме, распределяются по вегетативной полусфере, занимая ее практически целиком. Кортикальные гранулы подстилают плазматическую мембрану, формируя кортикальный слой. Мембраны ЭПР в периферической области немногочисленны, значительно большие скопления цистерн и пузырьков ЭПР отмечаются в средней области цитоплазмы (рис. 4, а—г). Цитоплазма анимального полюса выглядит разреженной, компоненты ЭПР, окончатые мембраны и митохондрии равномерно распределены по цитоплазме, изредка располагаясь вблизи ядерной оболочки (рис. 4, д, е).

Морфометрический анализ динамики эндоплазматического ретикулаума в различных областях цитоплазмы растущего ооцита. Электронно-микроскопический анализ растущих ооцитов показал, что элементы ЭПР, включающие в себя пузырьки

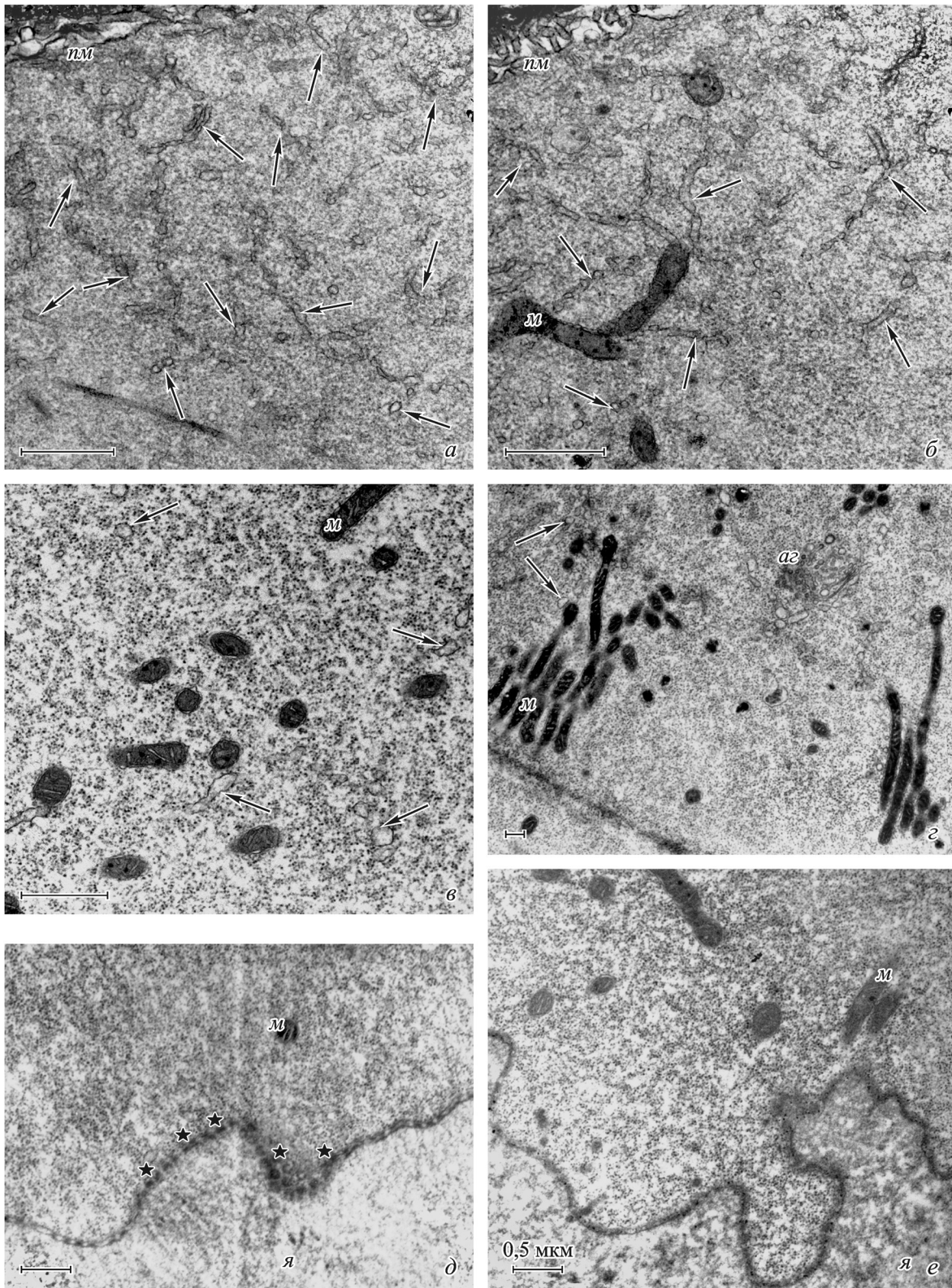


Рис. 2. Распределение ЭПР в цитоплазме ооцита ксенопуса на I—II стадиях оогенеза.

a, б — в периферической области; *в, г* — в средней области; *д, е* — в околоядерной области (ЭПР отмечен *стрелками*; *аг* — аппарат Гольджи, *м* — митохондрии, *пм* — плазматическая мембрана, *я* — ядро; *звездочками* отмечены зрелые ядерные поровые комплексы).

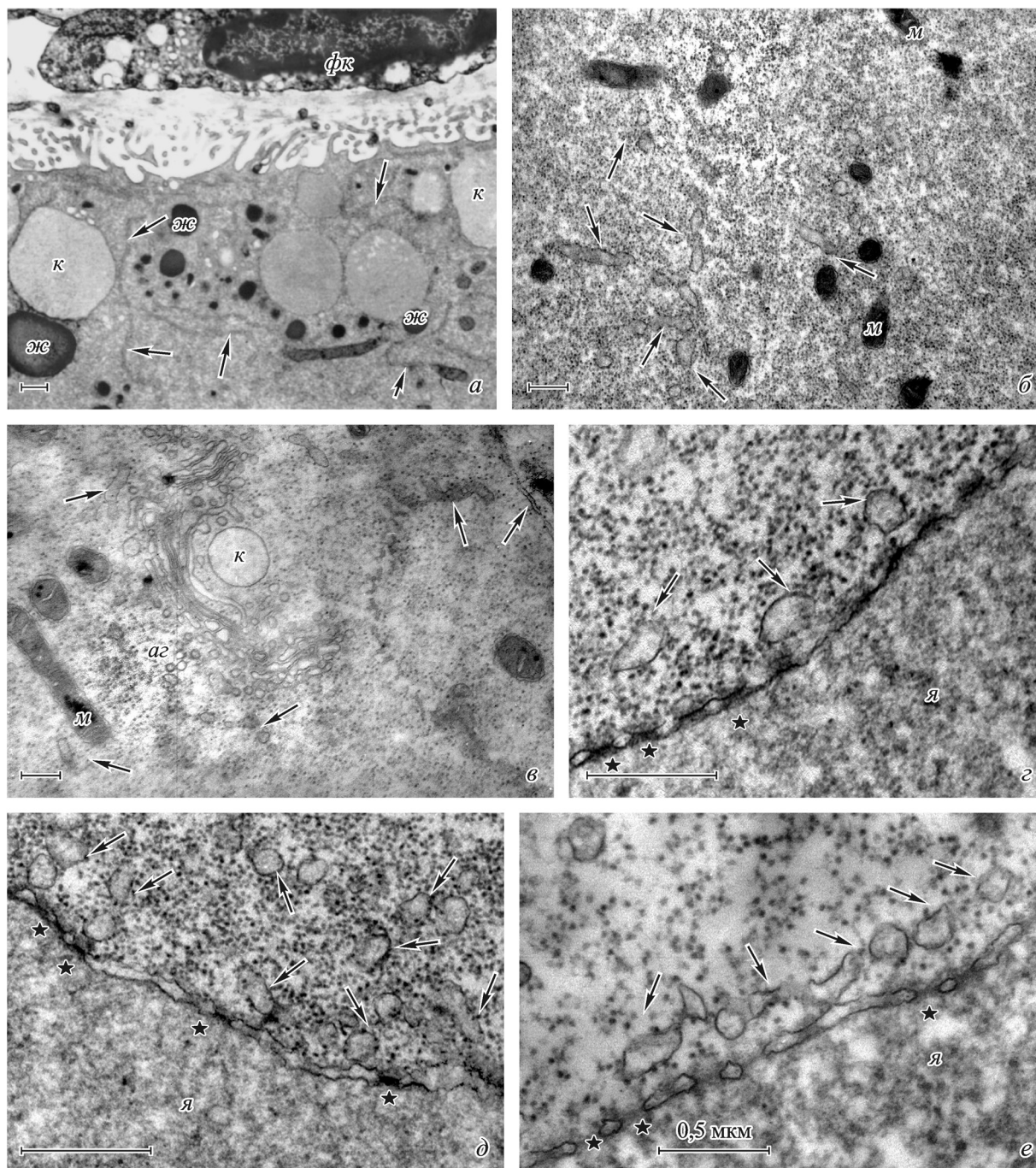


Рис. 3. Распределение ЭПР в цитоплазме ооцита на III—IV стадиях оогенеза.

a — в периферической области (*фк* — фолликулярная клетка, *жс* — желточные гранулы, *к* — кортикальные гранулы); *б, в* — в средней области (*аг* — аппарат Гольджи); *г* — в околоядерной области (*я* — ядро); *д, е* — массовое слияние пузырьков ЭПР с наружной ядерной мембраной и фрагменты ядерной оболочки без ядерных пор вблизи участков слияния (звездочками отмечены зрелые ядерные поровые комплексы, *я* — ядро).

и цистерны гладкого и шероховатого ретикулама, распределены неравномерно между различными зонами цитоплазмы ооцита и их локализация в клетке меняется в процессе оогенеза (рис. 2—4). Для более точной оценки динамики ЭПР в клетке был проведен морфометрический анализ относительной площади поверхности и относительного объема пузырьков и цистерн ЭПР на случайно выбранных образцах и срезах ооцитов, находящихся на разных стадиях развития. При этом цитоплазма каждого ооцита условно делилась на три области: пери-

ферическую, околоядерную и расположенную между ними среднюю область (рис. 1; см. раздел «Материал и методика»).

Периферическая зона цитоплазмы. Согласно данным морфометрического анализа, на I—II стадиях оогенеза наибольший относительный объем ЭПР и наибольшая относительная площадь поверхности его мембран регистрируются в периферической области цитоплазмы ооцита (рис. 5). На III—IV стадиях оогенеза, характеризующихся максимальным синтезом различных типов

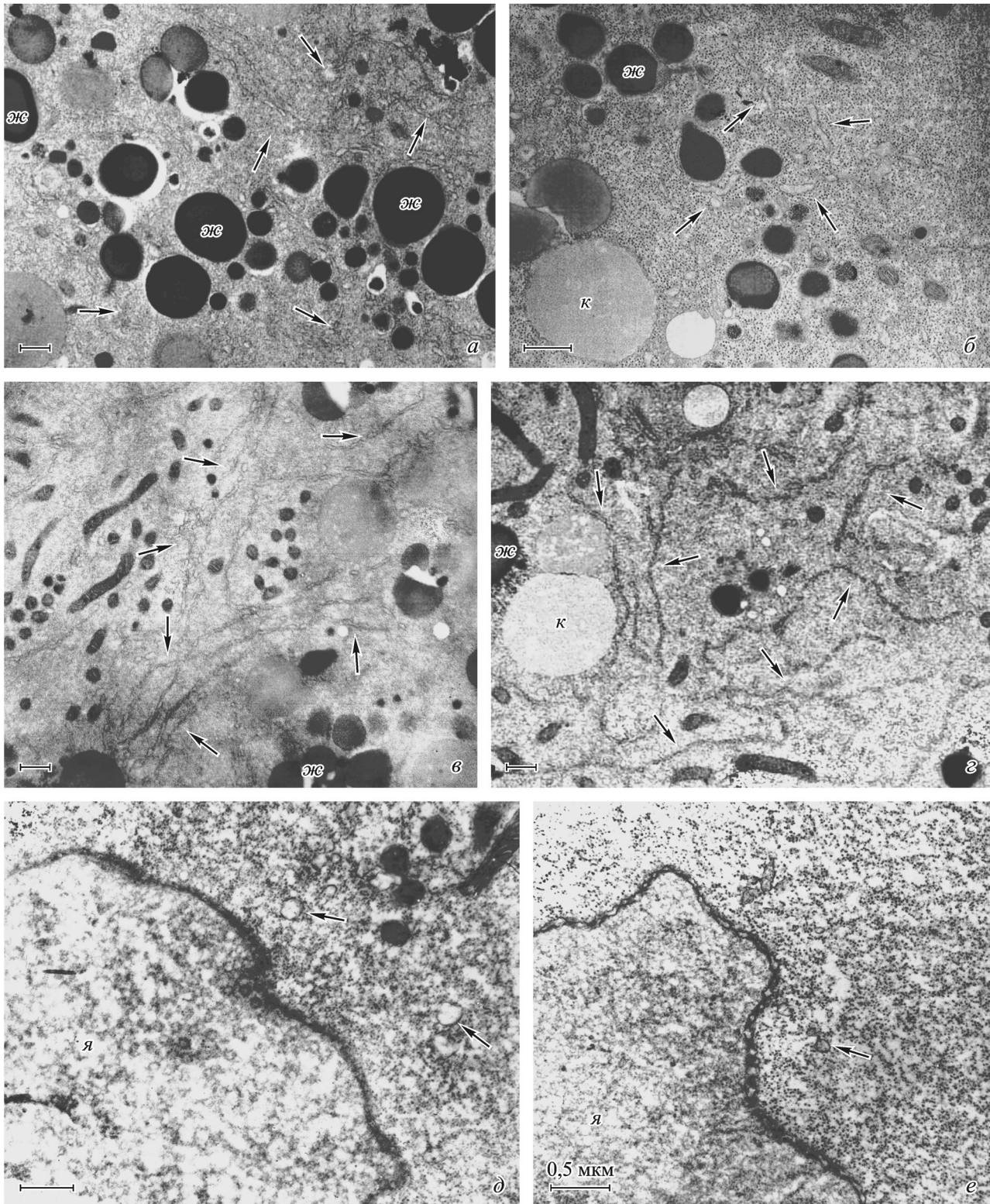


Рис. 4. Распределение ЭПР в цитоплазме ооцита на V—VI стадиях оогенеза.

a, б — в периферической области (*ж* — желточные гранулы, *к* — кортикальные гранулы; *стрелки* указывают на пузырьки и цистерны ЭПР); *в, г* — в средней области; *д, е* — в околоядерной области (*я* — ядро).

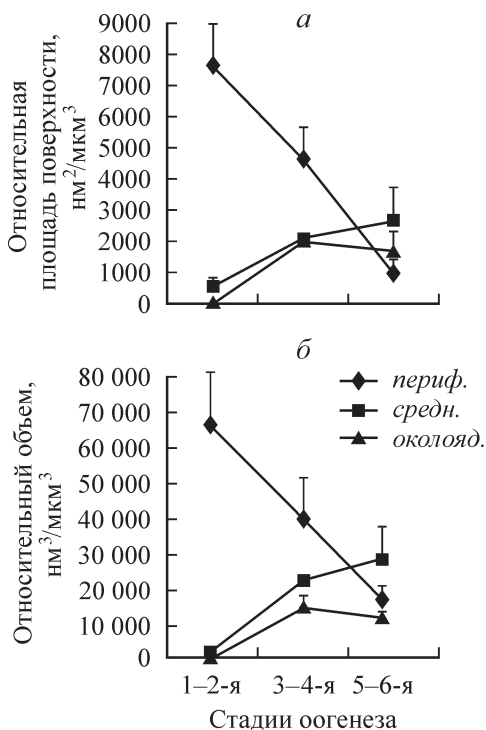


Рис. 5. Гистограмма, демонстрирующая изменение относительной площади поверхности мембран ЭПР (а) и относительного объема цистерн и пузырьков ЭПР (б) на единицу площади анализируемой области.

периф. — периферическая область цитоплазмы, средн. — средняя область, околояд. — околоядерная область цитоплазмы.

РНК, а также началом вителлогенеза, относительная площадь поверхности и относительный объем ЭПР на периферии ооцита уменьшаются почти в 2 раза, но все равно остаются достаточно высокими. На V—VI стадиях оогенеза относительная площадь поверхности мембран

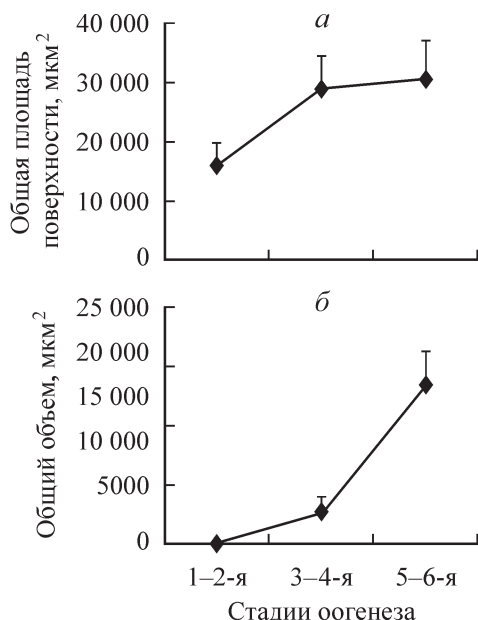


Рис. 6. Гистограмма, демонстрирующая изменение общей площади поверхности мембран ЭПР (а) и его общего объема (б) на ооцит на разных стадиях оогенеза ксенопуса.

ЭПР и их относительный объем в периферической цитоплазме продолжают синхронно уменьшаться.

Средняя область цитоплазмы. Морфометрическое исследование относительной площади поверхности мембран ЭПР и его относительного объема в средней области цитоплазмы ооцита на I—II стадиях оогенеза показало, что эти параметры более чем в 10 раз ниже соответствующих значений ЭПР в периферической области цитоплазмы (рис. 5). Однако к III—IV стадиям оогенеза перечисленные параметры ЭПР в средней области цитоплазмы существенно увеличиваются: первый — в 4 раза, а второй — в 10 раз, что свидетельствует об увеличении в этом районе количества цистерн ЭПР. Поскольку на этой стадии синтезируется большое количество желтка, появление большого числа мембран ЭПР связано, вероятно, с активацией синтетических процессов в клетке и с транспортом вителлогенина к формирующимся желточным гранулам. На V—VI стадиях оогенеза происходит дальнейшее увеличение относительной площади поверхности мембран ЭПР и относительного объема ЭПР в средней области клетки, но не столь существенно, как на III—IV стадиях развития.

Околоядерная область цитоплазмы. Морфометрический анализ относительной площади поверхности мембран ЭПР и относительного объема ЭПР в околоядерной области цитоплазмы позволил установить, что на I—II стадиях оогенеза элементы ЭПР практически отсутствуют вблизи ядерной оболочки (рис. 5, а, б). На III—IV стадиях оогенеза относительная площадь поверхности мембран ЭПР и их относительный объем ЭПР резко возрастают. Поскольку в этот период зарегистрировано уменьшение элементов ЭПР в периферической области цитоплазмы, можно предполагать, что часть из них перемещается в область ядра. Этот процесс может быть обусловлен активацией сборки новых фрагментов ядерной оболочки в растущем ядре, с наружной мембраной которого пузырьки ЭПР активно сливаются (рис. 3, д, е). На V—VI стадиях оогенеза относительная площадь поверхности и относительный объем ЭПР в околоядерной области несколько снижаются по сравнению с III—IV стадиями. Из графика (рис. 5, б) также следует, что наибольший относительный объем ЭПР в околоядерной области отмечается на III—IV стадиях развития ооцита.

Оценка морфометрических параметров ЭПР в целом на ооцит показала, что общая площадь поверхности его

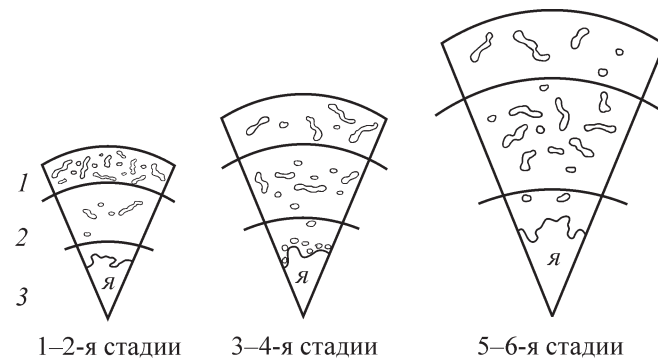


Рис. 7. Схема распределения мембран ЭПР в цитоплазме ооцитов ксенопуса на разных стадиях развития (стадии I—VI оогенеза).

1 — периферическая область, 2 — средняя область, 3 — околоядерная область; я — ядро.

мембран возрастает от I—II к III—IV стадиям и затем остается на том же уровне (рис. 6, а). Общий объем ЭПР в целом на ооцит резко возрастает от I—II к III—IV стадиям, а к V—VI стадиям происходит его дальнейшее увеличение (рис. 6, б). Таким образом, в процессе оогенеза происходит постепенное увеличение общей площади поверхности мембран ЭПР и общего объема ЭПР.

Выявленная динамика ЭПР в трех различных областях цитоплазмы ооцита на разных стадиях его развития представлена в схематической форме на рис. 7. Данная схема наглядно демонстрирует происходящую в процессе оогенеза динамику ЭПР: на I—II стадиях оогенеза наибольшее количество мембран ЭПР наблюдается в периферических областях цитоплазмы, в то время как остальная цитоплазма обеднена этим внутриклеточным компонентом. На III—IV стадиях развития происходят существенное снижение количества мембран ЭПР на периферии и накопление его компонентов как в средней, так и в околядерной областях. На последующих стадиях ЭПР более или менее равномерно распределяется по цитоплазме ооцита.

Обсуждение

Сочетание электронно-микроскопического и морфометрического исследования развивающихся ооцитов ксенопуса позволило установить, что в процессе оогенеза параллельно с ростом ооцита наблюдается увеличение общей площади поверхности мембран ЭПР и общего объема ЭПР в цитоплазме ооцита, причем процесс этот происходит неравномерно. Обнаружено, что в ходе оогенеза в цитоплазме ооцита происходят динамические изменения и перераспределение внутриклеточных оргanelл, в том числе и составных компонентов ЭПР, по различным областям цитоплазмы.

Согласно нашим данным, в ооцитах на I—II стадиях оогенеза компоненты ЭПР скапливаются в периферических отделах цитоплазмы, вблизи плазматической мембраны клетки. Известно, что начальные стадии оогенеза характеризуются низким уровнем белкового синтеза (Дэвидсон, 1972), поэтому возникает вопрос о том, что обеспечивает накопление мембранных компонентов ЭПР на периферии ранних ооцитов. Источники и механизмы формирования ЭПР *in vivo* остаются до сих пор слабо изученными, хотя при исследовании этого процесса в условиях *in vitro* было показано, что сначала формируются пузырьковидные элементы ЭПР, которые затем сливаются в трубочки и цистерны (Dreier, Rapoport, 2000). Многими авторами была продемонстрирована возможность прямого контакта между ЭПР и плазматической мембраной клеток при выделении или поглощении клетками различных веществ (Gupta, Golding, 1996; Gagnon et al., 2002). Согласно ранее проведенным исследованиям, с плазматической мембраной ооцитов амфибий, находящихся на ранней стадии развития, часто контактируют многослойные миелиноподобные структуры, формирующиеся в фолликулярных клетках (Семакова, Киселева, 2003). При этом цитоплазматические области, расположенные вблизи таких контактов, содержат увеличенное количество различных компонентов ЭПР, состоящих в основном из коротких и длинных цистерн.

Электронно-микроскопические исследования показали, что миелиноподобные структуры могут раскручиваться в мембраны ЭПР, что позволило предположить возможную функциональную роль этих структур в качестве запаса мембран, используемых как для увеличения площади поверхности плазматической мембраны растущего ооцита, так и для формирования новых компонентов ЭПР (Семакова, Киселева, 2003).

С какими процессами может быть связана реорганизация ЭПР, происходящая на последующих стадиях развития ранних ооцитов амфибий? Известно, что этот внутриклеточный компартмент служит основным резервуаром ионов Ca^{2+} (Subramanian, Meyer, 1997; Stricker, Smythe, 2003), выполняющих важную роль во многих внутриклеточных процессах, происходящих в соматических клетках, а также в яйцеклетке и развивающемся эмбрионе (Shiraishi et al., 1995; Marangos et al., 2003; Carroll et al., 2004). Так, например, обнаружено, что концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме изменяется при овуляции зрелых ооцитов амфибий и млекопитающих (Subramanian, Meyer, 1997; Kline, 2000) и это сопровождается существенной реорганизацией ЭПР (Terasaki, 2000; FitzHarris et al., 2003). Показано, что в процессе подготовки ооцита к оплодотворению плотность распределения ЭПР в цитоплазме увеличивается (Jaffe, Terasaki, 1994; Mehlmann et al., 1995; Kume et al., 1997; Kline, 2000). Предполагается, что это обеспечивает выброс ионов кальция и активацию яйцеклетки на последних стадиях мейотического деления (Kline, 2000; FitzHarris et al., 2003). Накопление ионов Ca^{2+} в цитозоле, сопровождающееся реорганизацией компонентов ЭПР, регистрируется также после оплодотворения яйцеклетки (Stricker, 1999). Все эти данные позволяют предполагать, что перемещение мембран ЭПР по цитоплазме ооцитов амфибий может быть вызвано необходимостью перераспределения ионов Ca^{2+} в клетке в процессе раннего оогенеза.

В результате многих исследований было показано, что шероховатые и гладкие компоненты ЭПР, включающие в себя цистерны, трубочки и пузырьки, быстро переформируются при любых изменениях физиологического состояния клеток (Waterman-Storer, Salmon, 1998; Prinz et al., 2000; Voeltz et al., 2002). Так, например, площадь поверхности мембран ЭПР увеличивается при гормональной индукции и стимуляции белкового синтеза в клетках (Христолюбова, 1972; Shiraishi et al., 1995). Изменение плотности ЭПР в цитоплазме отмечалось также в клетках, находящихся на разных стадиях мейоза и митоза (Koch, Booth, 1988; Terasaki et al., 2001; FitzHarris et al., 2003). Поэтому выявленная в настоящем исследовании реорганизация мембранных компонентов ЭПР в цитоплазме растущего ооцита амфибий может быть обусловлена изменениями экспрессии генов на разных стадиях его развития. Известно, что уровень синтеза ДНК и РНК в ооцитах почти на два порядка выше, чем в соматических клетках (Дэвидсон, 1972; Roger et al., 2002). Благодаря интенсивной амплификации в ядрах яйцеклеток амфибий на III—IV стадиях оогенеза накапливается до 1—2 мм копий ДНК (Дэвидсон, 1972). При этом уровень РНК полимеразы I остается высоким в течение III—VI стадий оогенеза (Roger et al., 2002), что обеспечивает формирование огромного количества рибосом, участвующих в синтезе желтка и других белков, необходимых для развития будущего зародыша. Наши исследования показали, что общая площадь поверхности мембран ЭПР резко возрастает от I—II к III—IV стадиям ооге-

неза, а затем остается на том же уровне. Это согласуется с результатами других исследований, продемонстрировавших, что III—IV стадии оогенеза характеризуются высокой функциональной активностью, поскольку в этот период начинается формирование желточных гранул (вителлогенез) и происходят активная амплификация и транскрипция ДНК, сопровождающиеся появлением хромосом типа ламповых щеток (Айзенштадт, 1984; Wallace, Selman, 1990; Swiderski, Xuylander, 2000; Roger et al., 2002). На V—VI стадиях оогенеза синтез и накопление желтка продолжают и общая площадь мембран ЭПР остается на том же высоком уровне. Мы предполагаем, что появление большого числа мембран ЭПР на III—IV стадиях связано как с активацией синтетических процессов в клетке, так и с транспортом вителлогенина к формирующимся желточным гранулам.

Наряду с накоплением ЭПР в средних областях цитоплазмы на III—IV стадиях оогенеза зарегистрировано увеличение его количества в околядерной зоне цитоплазмы. Известно, что ЭПР сходен по составу и контактирует с наружной мембраной ядерной оболочки, компоненты которой в процессе клеточного деления могут перемещаться в мембраны этого компартмента (Worman, Courvalin, 2000; Burke, Ellenberg, 2002). Исследование сборки ядерной оболочки и ЭПР в условиях *in vitro* (Wiese et al., 1997; Dreier, Rapoport, 2000) показало, что помимо обеспечения синтеза внутриклеточных белков и липидов мембраны и пузырьки ЭПР принимают непосредственное участие в формировании ядерной оболочки (Marshall, Wilson, 1997). Обнаруженное в настоящем исследовании увеличение относительной площади мембран ЭПР в околядерной области ооцита именно на III—IV стадиях, вероятно, объясняется использованием компонентов ЭПР для формирования новых фрагментов растущей ядерной оболочки.

Результаты настоящего электронно-микроскопического исследования, продемонстрировавшие массовое слияние пузырьков ЭПР с наружной ядерной мембраной на III стадии развития ооцитов, свидетельствуют в пользу данной гипотезы. Поскольку рост ядра ооцита в определенной степени можно сравнить с ростом ядра соматической клетки на стадии интерфазы, мы предполагаем, что компоненты ЭПР принимают участие в сборке новых фрагментов ядерной оболочки интерфазных клеток.

Известно, что в любой яйцеклетке, готовой к оплодотворению, существует неоднородное, асимметричное распределение РНК и различных морфогенетических факторов, необходимых для развития будущего эмбриона (Weeks, Melton, 1987; Mowry, Cote, 1999). В качестве одного из примеров можно привести данные о распределении в ооците полифункционального белка активина, индуцирующего развитие мезодермы и влияющего на процессы дифференцировки, пролиферации, миграции, апоптоза и органогенеза. Было показано, что активин связан с компонентами ЭПР и распределен неравномерно по цитоплазме ранних ооцитов амфибий (Nakaya et al., 2000; Fukui et al., 2003). При этом распределение активина в клетке существенно коррелирует с расположением митохондриальных полей и изменяется на разных стадиях раннего оогенеза. Результаты наших исследований в совокупности с этими данными позволяют предполагать, что динамическая реорганизация ЭПР, выявленная в растущих ооцитах ксенопуса в профазе I мейоза, связана, возможно, с регуляцией распределения морфогенетических факторов и обеспечения синтетических процессов в

определенных районах цитоплазмы, а также с доставкой мембранных компонентов для растущей ядерной оболочки.

Авторы выражают признательность к б. н. А. Г. Шиллову за критическую оценку рукописи и ценные замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-48261-а) и фонда Велком Траст (Англия)..

Список литературы

- Айзенштадт Т. Б. 1984. Цитология оогенеза. М.: Наука. 209 с.
- Груздев А. Д. 1974. Применение стереологических методов в цитологии. Новосибирск. 80 с.
- Дэвидсон Э. 1972. Действие генов в раннем развитии. М.: Мир. 342 с.
- Семакова К. Н., Киселева Е. В. 2003. Миелоноподобные структуры как возможный источник гладкого эндоплазматического ретикула в растущих ооцитах амфибий. Цитология. 45 (8) : 746—757.
- Семченко В. В., Хижняк А. С. 2001. Ультраструктурные изменения астроцитов собаки в пост-ишемический период (морфометрический анализ). Морфология. 119 (2) : 15—19.
- Христолюбова Н. Б. 1972. Функциональная морфология цитоплазматических органелл. Новосибирск: Наука. 189 с.
- Berridge M. J. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. Cell Calcium. 32 : 235—249.
- Burke B., Ellenberg J. 2002. Remodelling the wall of the nucleus. Mol. Biol. Cell. 3 : 487—497.
- Carroll J., FitzHarris G., Marangos P., Halet G. 2004. Ca²⁺ signalling and cortical reorganisation during the transition from meiosis to mitosis in mammalian oocytes. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 115 : 61—67.
- Cotter L. A., Goldberg M. W., Allen T. D. 1998. Nuclear pore complex disassembly and nuclear envelope breakdown during mitosis may occur by both nuclear envelope vesicularization and dispersion throughout the endoplasmic reticulum. Scanning. 20 : 250—251.
- Dreier L., Rapoport T. A. 2000. *In vitro* formation of the endoplasmic reticulum occurs independently of microtubules by a controlled fusion reaction. J. Cell Biol. 148 : 883—898.
- Drummond S., Ferrigno P., Lyon C., Murphy J., Goldberg M., Allen T., Smythe C., Hutchison C. J. 1999. Temporal differences in the appearance of NEP-B78 and an LBR-like protein during *Xenopus* nuclear envelope reassembly reflect the ordered recruitment of functionally discrete vesicle types. J. Cell Biol. 144 : 225—240.
- Duryee W. 1950. Chromosomal physiology in relation to nuclear structure. Ann. N. Y. Acad. Sci. 50 : 920—924.
- Ebner T., Moser M., Sommergruber M., Puchner M., Wiesinger R., Tews G. 2003. Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. Hum. Reprod. 18 : 1294—1298.
- Federovitch C. M., Ron D., Hampton R. Y. 2005. The dynamic ER: experimental approaches and current questions. Curr. Opin. Cell Biol. 17 : 409—414.
- FitzHarris G., Marangos P., Carroll J. 2003. Cell cycle-dependent regulation of structure of endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release in mouse oocytes and embryos. Mol. Biol. Cell. 14 : 288—301.
- Fukui A., Komazaki S., Miyoshi O., Asashima M. 2003. Immunocytochemical study of activin type IB receptor (XALK4) in *Xenopus* oocytes. Develop. Growth Differ. 45 : 113—119.
- Gagnon E., Duclos S., Rondeau C., Chevet E., Cameron P. H., Steele-Mortimer O., Paiement J., Bergeron J. J., Desjardins M. 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. Cell. 110 : 119—131.

- Gupta R. S., Golding G. B. 1996. The origin of the eukaryotic cell. *Trends Biochem. Sci.* 21 : 166—171.
- Henson J. H., Beaulieu S. M., Kammer B., Begg D. A., 1990. Differentiation of a casequestrin-containing endoplasmic reticulum during sea urchin oogenesis. *Develop. Biol.* 142 : 255—269.
- Jaffe L. A., Terasaki M. 1994. Structural changes in the endoplasmic reticulum of starfish oocytes during meiotic maturation and fertilization. *Develop. Biol.* 164 : 579—587.
- Kiseleva E. V., Rutherford S., Cotter L. M., Allen T. D., Goldberg M. W. 2001. Steps of nuclear pore complex disassembly and reassembly during mitosis in early *Drosophila* embryos. *J. Cell Sci.* 114 : 3607—3618.
- Kline D. 2000. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. *Curr. Top. Develop. Biol.* 50 : 125—154.
- Koch G. L. E., Booth C. 1988. Dissociation and re-assembly of the endoplasmic reticulum in live cells. *J. Cell Sci.* 91 : 511—522.
- Kume S., Yamamoto A., Inoue T., Muto A., Okano H., Mikoshiba K. 1997. Developmental expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and structural changes in the endoplasmic reticulum during oogenesis and meiotic maturation of *Xenopus laevis*. *Develop. Biol.* 182 : 228—239.
- Lee C., Chen L. B. 1988. Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cell. *Cell.* 54 : 37—46.
- Lee C., Ferguson M., Chen L. B. 1989. Construction of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 109 : 2045—2055.
- Levine T., Rabouille C. 2005. Endoplasmic reticulum: one continuous network compartmentalized by extrinsic cues. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 : 362—368.
- Lohka M. J. 1998. Analysis of nuclear envelope assembly using extracts of *Xenopus* eggs. *Methods Cell Biol.* 53 : 367—395.
- Macgregor H. C., Varley J. 1983. Working with animal chromosomes. New York: Wiley-Interscience Press. 250 p.
- Marangos P., FitzHarris G., Carroll J. 2003. Ca²⁺ oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development.* 130 : 1461—1472.
- Marshall I. C. B., Wilson K. L. 1997. Nuclear envelope assembly after mitosis. *Trends Cell Biol.* 7 : 20—29.
- Martin P. E., de, Novick P., Ferro-Novick S. 2005. The organization, structure, and inheritance of the ER in higher and lower eukaryotes. *Biochem. Cell Biol.* 83 : 752—761.
- Mehlmann L. M., Terasaki M., Jaffe L. A., Kline D. 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocytes. *Develop. Biol.* 170 : 607—615.
- Michalak M., Robert Parker J. M., Opas M. 2002. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* 32 : 269—278.
- Mowry K. L., Cote C. A. 1999. RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *FASEB J.* 13 : 435—445.
- Nakaya M., Fukui A., Izumi Y., Akimoto K., Asashima M., Ohno S. 2000. Meiotic maturation induces animal-vegetal asymmetric distribution of aPKC and ASIP/PAR-3 in *Xenopus* oocytes. *Development.* 127 : 5021—5031.
- Paiement J., Bergeron J. 2001. The shape of things to come: regulation of shape changes in endoplasmic reticulum. *Biochem. Cell Biol.* 79 : 587—592.
- Palade G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science.* 189 : 347—358.
- Prinz W. A., Grzyb L., Veenhuis M., Kahana J. A., Silver P. A., Rapoport T. A. 2000. Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 150 : 461—474.
- Roger B., Moisan A., Amalric F., Bouvet P. 2002. The rDNA transcription during *Xenopus laevis* oogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117 : 243—255.
- Shiraishi K., Okada A., Shirakawa H., Nakanishi S., Mikoshiba K., Miyazaki S. 1995. Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and the spatial pattern of Ca²⁺ release during maturation of hamster oocytes. *Develop. Biol.* 170 : 594—606.
- Sidrauski G., Chapman R., Walter P. 1998. The unfolded protein response: an intracellular signaling pathway with many surprising features. *Trends Cell Biol.* 8 : 245—249.
- Smith G. D., Silva E., Silva C. A. 2004. Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. *Reprod. Biomed.* 9 : 171—178.
- Stricker S. A. 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Develop. Biol.* 211 : 157—176.
- Stricker S. A., Smythe T. L. 2003. Endoplasmic reticulum reorganizations and Ca²⁺ signaling in maturing and fertilized oocytes of marine protostome worms: the roles of MAPKs and MPF. *Development.* 130 : 2867—2879.
- Subramanian K., Meyer T. 1997. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell.* 89 : 963—971.
- Swiderski Z., Xylander W. E. 2000. Vitellogenes and vitellogenesis in cestodes in relation to embryonic development, egg production and life cycle. *Int. J. Parasitol.* 30 : 805—817.
- Terasaki M. 2000. Dynamics of the ER and Golgi apparatus during early sea urchin development. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 897—914.
- Terasaki M., Chen L. B., Fujiwara K. 1986. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J. Cell Biol.* 103 : 1557—1568.
- Terasaki M., Runft L. L., Hand A. R. 2001. Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation. *Mol. Biol. Cell.* 12 : 1103—1116.
- Terasaki M., Sardet C. 1991. Demonstration of calcium uptake and release by sea urchin egg cortical endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 115 : 1031—1037.
- Van Meer G. 1993. Transport and sorting of membrane lipids. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5 : 661—673.
- Verkhatsky A. 2005. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol. Rev.* 85 : 201—279.
- Voeltz G. K., Rolls M. M., Rapoport T. A. 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 3 : 944—950.
- Wallace R. A., Selman K. 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc. Tech.* 16 : 175—201.
- Waterman-Storer C. M., Salmon E. D. 1998. Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr. Biol.* 8 : 798—806.
- Weeks D. L., Melton D. A. 1987. A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF-beta. *Cell.* 51 : 861—867.
- Wiese C., Goldberg M. W., Allen T. D., Wilson K. L. 1997. Nuclear envelope assembly in *Xenopus* extracts visualized by scanning EM reveals a transport-dependent «envelope smoothing» event. *J. Cell Sci.* 110 : 1489—1502.
- Worman H. J., Courvalin J.-C. 2000. Inner nuclear membrane. *J. Membr. Biol.* 177 : 1—11.

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF ENDOPLASMIC RETICULUM DYNAMICS
IN GROWING AMPHIBIAN OOCYTES*K. N. Morozova,¹ E. V. Kiseleva²*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk;
e-mail: ¹ morozko@bionet.nsc.ru; ² elka@bionet.nsc.ru

Morphological analysis of endoplasmic reticulum (ER) dynamics was carried out in early amphibian oocytes at different stages of their development. Comparative morphometric analysis of ER membrane relative surface area and relative volume has shown that at the 1st—2nd stages of oogenesis the accumulation of ER membranes occurred mainly in the peripheral region of the cell cytoplasm. At the 3rd—4th stages of oocyte growth characterized by active transcription, the increase in the relative volume of ER and relative surface area of ER membranes occurs in the middle and near-nuclear region of cytoplasm, and reduction of these parameters takes place in the peripheral part of the cell. Simultaneously observed fusion of numerous ER vesicles with the outer nuclear membrane may serve as an evidence of active formation of new fragments of nuclear envelope. The 5th—6th stages of oocyte development are characterized by an increase in the relative volume of ER in the whole oocyte. It has been supposed that the revealed reorganization of endoplasmic reticulum in growing amphibians oocytes might be due to yolk accumulation (vitellogenesis), redistribution of calcium ions, and synthesis and storage of lipids and proteins. These processes are necessary for the future embryo development, and also for assembly of new fragments of growing nuclear envelope.
