

## ВЛИЯНИЕ ГИДРОКСИМОЧЕВИНЫ НА ЦИЛИОГЕНЕЗ В РЕСНИЧНОМ ЭПИТЕЛИИ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS*

© К. Е. Домарацкий,<sup>1</sup> Г. Е. Онищенко

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;  
электронный адрес: konst25@mail.ru

Проведено электронно-микроскопическое исследование структуры ресничного эпителия моллюска *Lymnaea stagnalis* при воздействии гидроксимочевина. С помощью метода радиоавтографии установлена высокая пролиферативная активность ресничного эпителия в норме, при этом отмечено кластерное распределение клеток, включающих метку. Показано, что присутствие гидроксимочевина в организме моллюска подавляет пролиферацию. При электронно-микроскопическом сканировании поверхности ноги моллюска в норме в складках эпителия обнаружены кластеры нересничных клеток и клеток с короткими ресничками. При воздействии гидроксимочевина в течение 1 сут подобные участки полностью исчезали, ресничный эпителий выглядел однородным и состоял только из клеток с длинными ресничками. Методом трансмиссионной электронной микроскопии обнаружено, что воздействие гидроксимочевина не влияет на образование базальных тел и ход цилиогенеза. Высказывается предположение о том, что гидроксимочевина не только подавляет пролиферативную активность клеток эпителия, но и индуцирует дифференцировку нересничных клеток в ресничные.

Ключевые слова: цилиогенез, эпителий, гидроксимочевина, базальное тело, центриоль, дифференцировка.

В настоящее время известны два основных пути увеличения числа центриолей в клетке. Первый способ называется ацентриолярным и подразумевает синтез центриолей *de novo* при участии аморфных электронно-плотных структур типа дейтеросом (Dirksen, 1991; Dawe et al., 2007). Дейтеросомы обнаруживаются в ресничном эпителии макаки-резуса (Anderson, Brenner, 1971), эпителии дыхательных путей крыс (Sorokin, 1968), в эпидермисе и трахее *Xenopus* (Steinman, 1968), а также у моллюска *Lymnaea stagnalis* в первом делении дробления (Krioutchkova, Onishchenko, 1999). Второй способ — центриолярный. В этом случае процентиоли закладываются под прямым углом к стенке родительской центриоли (Anderson, Brenner, 1971).

Ранее нами был подробно исследован механизм центриоле- и цилиогенеза в ресничном эпителии ноги моллюска *L. stagnalis* (большой прудовик). Процессы центриоле- и цилиогенеза в ресничных клетках эпителия происходят в течение всей жизни моллюска. Также на протяжении всей жизни ворсинчатые клетки эпителия дифференцируются в ресничные клетки, причем в клетках с микроворсинками образование центриолярных цилиндров идет наиболее интенсивно (Домарацкий, Онищенко, 2002). Мы показали, что центриолярные цилиндры в данном случае образуются *de novo*, т. е. ацентриолярным способом. Далее они мигрируют к апикальной плазматической мембране и контактируют с ней, приобретают корешковый аппарат и базальные ножки. Затем происходит удлинение цилиндра, образование базальной пластики и собственно рост аксонемы от дистальной части базального тела (Домарацкий, Онищенко, 2002).

Вопрос регуляции образования центриолей и последующего цилиогенеза остается малоизученным. Синтез центриолей центриолярным способом, как правило, связан с удвоением клеточного генома. Например, при полиплоидизации эпителиальных клеток кишечника морской звезды (до 16 n) число центриолей поддерживается кратным числу геномов (Воробьев, 1982). Момент дупликации центриолей четко координируется Cdk2-cyclin A при прохождении клеточного цикла и приходится на позднюю G<sub>1</sub>—раннюю S-фазу (Kuriyama, Borisy, 1981; Meraldi et al., 1999). Несмотря на это, есть основания полагать, что контроль репликации центриолей в клетке может осуществляться независимо от репликации ДНК. В частности, подавление синтеза ДНК с помощью гидроксимочевина (ГМ), блокирующей клетки в S-фазе (Clarke et al., 2001), может разобщать центриолярный и клеточный циклы и инициировать появление множественных аномальных центриолей в опухолевых клетках НСТ116 (Kuriyama et al., 2009). Также есть данные о том, что центриоли в клетках линии СНО, обработанных ГМ, могут многократно реплицироваться в ответ на действие эпидермального фактора роста (Balczon et al., 1995).

Однако вопрос о том, является ли образование центриолярных цилиндров *de novo* сопряженным с синтезом ДНК в клетке, остается неясным. Существуют данные о том, что обработка агентами, подавляющими синтез ДНК (этидием бромидом, митомицином С, а также ГМ), не блокирует образование базальных тел у инфузории *Stentor coeruleus*, таким образом, в данной модельной системе корреляции между этими двумя процессами выявлено не было (Younger et al., 1972).

В настоящей работе было исследовано влияние ГМ на центриоле- и цилиогенез в ресничном эпителии моллюска *L. stagnalis*, а также на дифференцировку и пополнение популяции ресничных клеток. Согласно нашим данным, образование центриолей *de novo* и образование базальных тел в клетках ресничного эпителия *Lymnaea stagnalis* происходит в присутствии ГМ и, таким образом, не зависит от синтеза ДНК.

### Материал и методика

Объектом исследования служил ресничный эпителий ноги моллюска *L. stagnalis* (пресноводная улитка). Улитки размером 15—25 мм были отобраны в подмосковном водоеме и содержались в чистой пресной воде при комнатной температуре. В каждой серии экспериментов использовали 5 особей на точку.

Пролиферативная активность клеток эпителия была исследована методом радиоавтографии. Улиткам в подошву ноги вводили  $^3\text{H}$ -тимидин (80 кБк на 1 г массы) через каждые 6 ч в течение 1 сут. Препараты фиксировали 4%-ным формалином через 6 ч (импульсное мечение) и 24 (продолжительное мечение) после введения изотопа. Гистологические срезы покрывали ядерной эмульсией типа М и экспонировали в течение 45 сут. После проявления препараты окрашивали гематоксилином Карачи и эозином.

Для подавления синтеза ДНК ГМ (10 и 20 мМ) инъецировали в ногу прудовиков каждые 6 ч в течение 1 сут. Для ультраструктурного исследования кусочки ткани фиксировали смесью 2,5%-ного глутар-альдегида с 2%-ным формалином на фосфатном буфере (PBS) в течение 2 ч. После отмывки в PBS препараты дофиксировали 1%-ным  $\text{OsO}_4$  на PBS в течение 1 ч. Затем образцы обезвоживали спиртом и ацетоном и заливали в Эпон-812. Срезы получали на ультрамикротоме LKB-2, контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100В. Измерения центриольных цилиндров проводили в программе Adobe Photoshop CS2.

Для исследования поверхности эпителия перед фиксацией образцы очищали от слизи с помощью ультразвукового диспергатора УЗДМ-1 при 22 кГц на минимальной мощности в течение 10 мин в физиологическом растворе. Кусочки ткани фиксировали 4%-ным формалином, обезвоживали спиртом и ацетоном, высушивали, проводили напыление золотом и палладием и далее исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JEOL JSM-6380 при 20 кВ.

### Результаты

Обработка ГМ подавляет пролиферацию клеток эпителия ноги моллюска. В норме в ресничном эпителии были обнаружены клетки, синтезирующие ДНК. Для ресничного эпителия *L. stagnalis* был отмечен высокий индекс мечения как при импульсном, так и при продолжительном введении изотопа (21 и 35 % соответственно). При этом меченые клетки, как правило, располагались в виде скоплений, или кластеров (рис. 1). Введение ГМ практически полностью блокировало синтез ДНК в клетках эпителиального пласта. Индекс мечения составил не более 1 % как при импульсном, так и при продолжительном мечении.

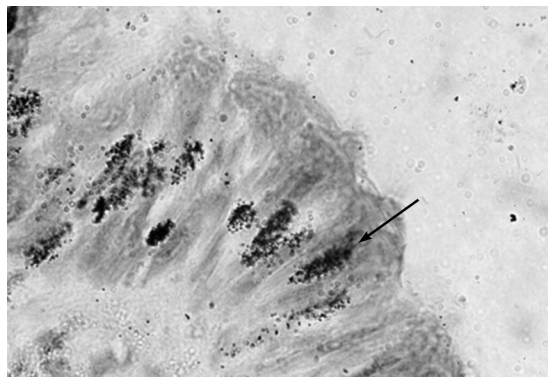


Рис. 1. Эпителий ноги *Lymnaea stagnalis* L. Радиоавтография. Стрелка указывает на радиоавтографическую метку. 1000 $\times$ .

Обработка ГМ приводит к исчезновению нересничных клеток. Поверхность ноги моллюска выстлана ресничным эпителием, участвующим в локомоции. Однако при детальном исследовании с помощью сканирующего электронного микроскопа мы выявили три типа клеток: помимо ресничных были обнаружены зоны нересничных клеток, часто окруженные ворсинчатыми клетками с короткими ресничками (рис. 2, а—в). Такие области располагались, как правило, в складках ноги. Зачастую расстояние между нересничными клетками внутри кластера было увеличено, и между ними не наблюдалось плотного взаимодействия. При воздействии ГМ такие зоны нересничных клеток исчезали, и эпителий становился однородным, ресничным (рис. 2, г, д).

ГМ не влияет на ход цилиогенеза. Электронно-микроскопическое исследование ресничного эпителия ноги моллюска *L. stagnalis* показало, что ГМ не влияет на образование центриольных цилиндров *de novo*. Так же как и в контроле, формирование базальных тел наблюдалось в двух типах клеток (ворсинчатых и ресничных) с участием структур типа дейтеросом. В апикальной части ворсинчатых клеток можно видеть множество центриольных цилиндров на разных стадиях цилиогенеза (рис. 3). Таким образом, ГМ не оказывала видимого влияния на центриоле- и цилиогенез в клетках ресничного эпителия. Воздействие ГМ также не влияло и на линейные размеры базальных тел и центриольных цилиндров. При этом различия в размерах базальных тел в ресничных клетках и в клетках с микроворсинками также не выявлено.

### Обсуждение

Известно, что ГМ обладает двойным эффектом. Помимо блока S-фазы ГМ вызывает и другие эффекты на молекулярном уровне, связанные с регуляцией экспрессии генов, характерных для дифференцированных клеток. Так, например, терминальная дифференцировка под влиянием ГМ показана для ряда линий эритролейкоза человека (HEL) и мыши (MEL) (Gui et al., 1997a, 1997b; Zhang et al., 2001). ГМ-терапия индуцирует стабильную регрессию миелофиброза и изменения мегакариоцитопоэза у больных хроническим миелоидным лейкозом (Thiele et al., 2000a, 2000b) и существенно снижает экспрессию рецепторов адгезии VLA-4 и CD36 при серповидно-клеточной анемии (Style et al., 1997). При эритроидной диф-



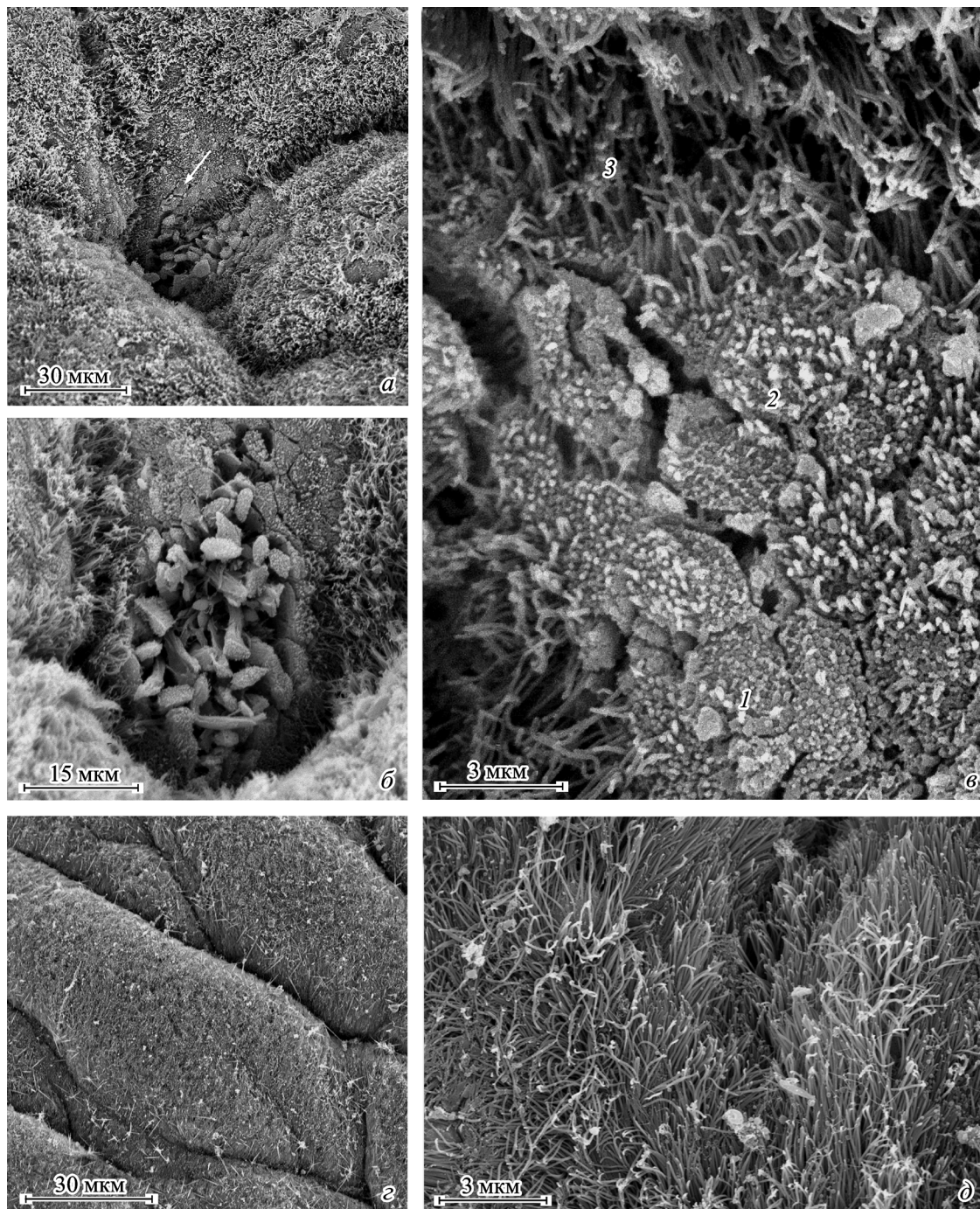


Рис. 2. Поверхность ноги моллюска. Сканирующая электронная микроскопия.

*a–в* — контроль (последовательное увеличение); островок нересничных клеток указан *стрелкой*; *г, д* — обработка 20 мМ гидроксимочевины (ГМ): исчезновение островков нересничных клеток. *1* — нересничная клетка, *2* — ворсинчатая клетка, *3* — ресничная клетка.

ференцировке, индуцированной воздействием ГМ в культурах клеток мышинной эритролейкемии MEL, в процесс дифференцировки может быть вовлечен окислительный стресс (Nagai et al., 2003). Индукция клеточной дифференцировки под воздействием ГМ показана не только для млекопитающих. Так, ГМ индуцирует нитеобразную дифференцировку одноклеточного гриба *S. cerevisiae*, которая сопровождается подавлением синтеза ДНК и активацией белков Mec1, Rad53 и Swe1, являющихся регуляторами пунктов контроля (check points) клеточного цикла (Jiang, Kang, 2003).

В нашей экспериментальной системе мы наблюдали, что ресничный эпителий моллюска в норме характеризуется высокой пролиферативной активностью, и очаги пролиферации локализуются преимущественно в складках ноги. Видимо, в данном случае можно провести аналогию с системой крипта—ворсинка, где малодифференцированные пролиферирующие клетки расположены в глубине крипты (Booth, Potten, 2000). О зональности в распределении пролиферирующих клеток в ресничном эпителии ноги моллюска говорит и тот факт, что на автографах меченые клетки образуют кластеры. Мы полага-



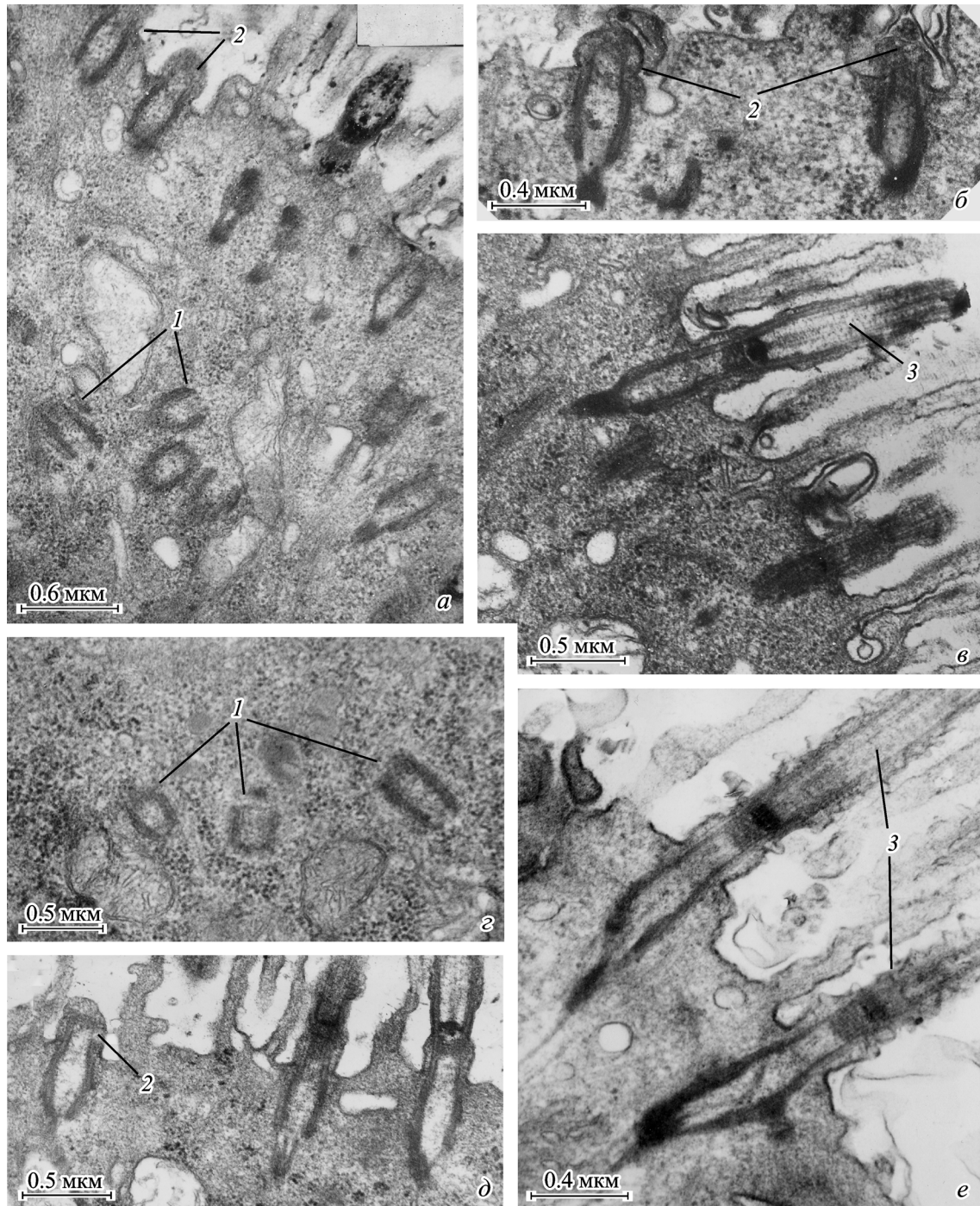


Рис. 3. Различные этапы цилиогенеза в клетках эпителия. Трансмиссионная электронная микроскопия.

*a—в* — контроль; *г—е* — обработка 20 мМ ГМ: в ресничных и ворсинчатых клетках эпителия присутствуют все стадии цилиогенеза. 1 — свободные центриольные цилиндры в цитоплазме, 2 — контакт центриольного цилиндра с плазматической мембраной, 3 — рост аксонемы.

ем, что нересничные клетки, выстилающие складки ноги моллюска, и составляют зоны пролиферативной активности. В пользу этого говорит и то, что при подавлении пролиферации в клетках ресничного эпителия с помощью ГМ одновременно практически полностью исчезают зоны нересничных клеток, т. е. недифференцированных клеток. На основании изложенных данных мы заключаем, что ГМ индуцирует терминальную дифференцировку клеток ресничного эпителия.

Вместе с тем по данным электронной микроскопии, под влиянием ГМ изменений в центриоле- и цилиогенезе

не происходит. Отсутствие морфологических изменений цилиарного аппарата указывает на то, что в клетках ресничного эпителия ноги моллюска *L. stagnalis* образование множественных центриольных цилиндров и последующее образование ресничек происходят независимо от репликации ДНК.

Таким образом, ГМ, по-видимому, способствует терминальной дифференцировке клеток ресничного эпителия. Однако механизм влияния ГМ на дифференцировку клеток ресничного эпителия остается неясным. Полученные нами данные показывают, что ресничный эпителий

ноги моллюска может служить удобной моделью для изучения механизмов дифференцировки клеток ресничного эпителия в дальнейшем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00750).

### Список литературы

- Воробьев В. А. 1982. Морфология митозов и сезонная пролиферация в эпителии желудка морской звезды. Цитология. 24 (5) : 580—585.
- Домарацкий К. Е., Онищенко Г. Е. 2002. Образование базальных тел в ресничном эпителии моллюсков *Buccinum undatum* L. и *Lymnaea stagnalis* L. Онтогенез. 33 (3) : 187—194.
- Anderson R. G., Brenner R. M. 1971. The formation of basal bodies (centrioles) in the Rhesus monkey oviduct. J. Cell Biol. 50 : 10—34.
- Balczon R., Bao L., Zimmer W. E., Brown K., Zinkowski R. P., Brinkley B. R. 1995. Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested chinese hamster ovary cells. J. Cell Biol. 130 : 105—115.
- Booth C., Potten C. S. 2000. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. J. Clin. Invest. 105 : 1493—1499.
- Clarke D. J., Segal M., Jensen S., Reed S. I. 2001. Mec1p regulates Pds1p levels in S phase: complex coordination of DNA replication and mitosis. Nat. Cell Biol. 3 : 619—27.
- Dawe H. R., Farr H., Gull K. 2007. Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. J. Cell Sci. 120 : 7—15.
- Dirksen E. R. 1991. Centriole and basal body formation during ciliogenesis revisited. Biol. Cell. 72 : 31—38.
- Gui C. Y., Jiang C., Qian R. L. 1997a. The role of hydroxyurea in globin gene expression and cell differentiation of human erythroleukemia cell line. Shi Yan Sheng Wu Xue Bao. 30 : 375—382.
- Gui C. Y., Jiang C., Xie H. Y., Qian R. L. 1997b. The apoptosis of HEL cells induced by hydroxyurea. Cell Res. 7 : 91—97.
- Jiang Y. W., Kang C. M. 2003. Induction of *S. cerevisiae* filamentous differentiation by slowed DNA synthesis involves Mec1, Rad53 and Swel checkpoint proteins. Mol. Biol. Cell. 14 : 5116—5124.
- Kriutchkova M. M., Onishchenko G. E. 1999. Structural and functional characteristics of the centrosome in gametogenesis and early embryogenesis of animals. Int. Rev. Cytol. 185 : 107—156.
- Kuriyama R., Bettencourt-Dias M., Hoffmann I., Arnold M., Sandvig L. 2009.  $\gamma$ -Tubulin-containing abnormal centrioles are induced by insufficient Plk4 in human HCT116 colorectal cancer cells. J. Cell Sci. 122 : 2014—2023.
- Kuriyama R., Borisy G. G. 1981. Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole mount electron microscopy. J. Cell Biol. 91 : 814—821.
- Meraldi P., Lukas J., Fry A. M., Bartek J., Nigg E. A. 1999. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. Nat. Cell Biol. 1 : 88—93.
- Nagai T., Tarumoto T., Miyoshi T., Ohmine K., Muroi K., Komatsu N., Sassa S., Ozawa K. 2003. Oxidative stress is involved in hydroxyurea-induced erythroid differentiation. Br. J. Haematol. 121 : 657—661.
- Sorokin S. P. 1968. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. J. Cell Sci. 3 : 207—230.
- Steinman R. M. 1968. An electron microscopic study of ciliogenesis in developing epidermis and trachea in the embryo of *Xenopus laevis*. Amer. J. Anat. 122 : 19—55.
- Style L. A., Lubin B., Vichinsky E., Lawrence S., Hua M., Test S., Kuypers F. 1997. Decrease of very late activation antigen-4 and CD36 on reticulocytes in sickle cell patients treated with hydroxyurea. Blood. 89 : 2554—2559.
- Thiele J., Kvasnicka H. M., Schmitt-Graeff A., Bundschuh S., Biermann T., Roessler G., Wasmus M., Diehl V., Zankovich R., Schaefer H. E. 2000a. Effects of chemotherapy (busulfan-hydroxyurea) and interferon- $\alpha$  on bone marrow morphologic features in chronic myelogenous leukemia. Histochemical and morphometric study on sequential trephine biopsy specimens with special emphasis on dynamic features. Amer. J. Clin. Pathol. 114 : 57—65.
- Thiele J., Kvasnicka H. M., Schmitt-Graeff A., Spohr M., Diehl V., Zankovich R., Niederle N., Leder L. D. 2000b. Effects of interferon and hydroxyurea on bone marrow fibrosis in chronic myelogenous leukaemia: a comparative retrospective multicentre histological and clinical study. Br. J. Haematol. 108 : 64—71.
- Younger K. B., Banerjee S., Kelleher J. K., Winston M., Margulis L. 1972. Evidence that the synchronized production of new basal bodies is not associated with DNA synthesis in *Stentor coeruleus*. J. Cell Sci. II: 621—637.
- Zhang S. B., He Q. Y., Zhao H., Gui C. Y., Jiang C., Qian R. L. 2001. Function of GATA transcription factors in hydroxyurea-induced HEL cells. Cell Res. 11 : 301—310.

Поступила 15 II 2012

### THE EFFECT OF HYDROXYUREA ON THE CILIOGENESIS IN CILIATED EPITHELIUM OF MOLLUSK *LYMNAEA STAGNALIS*

K. E. Domaratskiy, G. E. Onishchenko

M. V. Lomonosov Moscow State University

An active proliferation of the cells of ciliary epithelium in the foot of mollusk *Lymnaea stagnalis* was shown using radioautography. Cells labeled with  $^3\text{H}$ -thymidine were clustered into small groups. Hydroxyurea treatment decreased the proliferation of the epithelial cells. Scanning electron microscopy showed that surface of the mollusk foot was covered by extensive ciliated folds. The clusters of the cells covered with microvilli and with short cilia were localized at the bases of these folds. The cells covered with microvilli and with short cilia disappeared after 24 h of hydroxyurea treatment, ciliary epithelium appeared homogeneous and was composed of only multi-ciliated cells. Transmission electron microscopy showed no effect of the hydroxyurea on the centriole- and ciliogenesis in the multi-ciliated cells. We suggest that hydroxyurea inhibits cell proliferation and induces the differentiation of cells covered with microvilli in multi-ciliated cells.

Key words: mollusk *Lymnaea stagnalis*, ciliary epithelium, hydroxyurea.