

## ИНВЕРСИЯ ПОЛА У ЭМБРИОНОВ ДОМАШНЕЙ КУРИЦЫ (*GALLUS GALLUS DOMESTICUS*) ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛЕТРОЗОЛА И ТАМОКСИФЕНА

© А. В. Трухина,<sup>1</sup> Н. А. Лукина,<sup>2</sup> Н. Д. Ваккер-Коузова,<sup>1</sup> А. А. Некрасова,<sup>1</sup> А. Ф. Смирнов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра генетики и биотехнологии и <sup>2</sup>кафедра цитологии и гистологии  
С.-Петербургского государственного университета;  
<sup>1</sup>электронный адрес: [trukhina\\_ant@mail.ru](mailto:trukhina_ant@mail.ru)

Реализация программы формирования пола у многоклеточных организмов представляет собой сложный многоступенчатый процесс. Роль индуктора в этом процессе отводится половым гормонам, которые синтезируются клетками формирующейся гонады. Влияние андрогенов на формирование мужского пола в настоящее время хорошо изучено. Однако мало известно об участии эстрогенов в формировании женских гонад и женского пола в целом. В настоящей работе представлены результаты экспериментальной инверсии пола у самок курицы, полученные при ингибировании ароматазы (фермента, участвующего в синтезе эстрогенов) и при воздействии на эмбрион тамоксифена (модулятора эстрогеновых рецепторов). Показан различный маскулинизирующий эффект в зависимости от дозы действующего вещества и количества инъекций. Отмечено, что ингибирование ароматазы не приводит к блоку перехода женских половых клеток в профазу мейоза. Высказано предположение о разных механизмах влияния ретиноидной кислоты и эстрогенов на созревание ооцитов. Впервые показаны белки и нуклеопротеины, которые взаимодействуют с эстрогеновым рецептором 1, и представлена физическая карта расположения их генов в геноме человека и курицы.

Ключевые слова: инверсия пола, курица, летразол, оогонии, тамоксифен, эстрагеновый рецептор, яичник, ESR1.

Принятые сокращения: п. н. — пара нуклеотидов, AR — андрогеновый рецептор, ESR1, ER $\alpha$  и ER $\beta$  — эстрогеновые рецепторы.

Развитие такого сложного признака, как пол многоклеточного организма, контролируется многочисленными генами (Кожухарь, 2012). Так, у птиц экспрессия генов *dmrt1*, *sox9* и *cHEMGN* приводит к формированию семенников (Smith et al., 2009; Nakata et al., 2013), а генов *foxl2*, *wnt4* и *rspo1* — к развитию яичников (Ayers et al., 2013). Экспрессия этих генов находится под контролем различных факторов (Кожухарь, 2012; Eggers, Sinclair, 2012; Gamble, Zarkower, 2012). Первостепенное значение для детерминации и дифференцировки пола имеют гормоны, синтезируемые клетками гипоталамуса, гипофиза и гонад. Такие гормоны, как андрогены, эстрогены и прогестерон, являются конечными продуктами биосинтеза холестерина в организме животных. Соотношение первых двух групп стероидных гормонов является ключевым моментом для правильного формирования пола. Изменение в этом соотношении может привести к аномалиям развития первичных и вторичных половых признаков (Джафаров и др., 2010; Перевозчиков, 2011; Верин, Иванов, 2012).

У плацентарных животных пол будущего поколения изначально определяется генами. Затем на более поздних стадиях эмбрионального развития развитие первичных и вторичных половых признаков контролируется гормонами (Clinton, 1998). У амфибий, рептилий, птиц и даже сумчатых животных в формировании пола почти одно-

временно участвуют и гены, определяющие пол, и стероидные гормоны (Ditewig, Yao, 2005; Nakamura, 2009; Smith, 2010).

Эстрогены у животных синтезируются в клетках внутренней оболочки фолликулов яичников и в гранулезных клетках, формирующих полость фолликулов.

Кроме того, эстрогены синтезируются в желтом теле и плаценте. В небольших количествах эти гормоны синтезируются в клетках Лейдига семенников и в коре надпочечников (Джафаров и др., 2010).

Ранее было показано, что у птиц эстрогены контролируют пролиферацию клеток коры левого яичника и выявляются в гонадах уже на ранних стадиях развития. Эстрогены у млекопитающих в большей степени влияют на дифференциацию, а не на детерминацию гонад (Pask, 2012).

Для изучения роли гормонов в детерминации и дифференцировке половых структур традиционно используют синтетические эстрогены (диэтилстилбэстрол и этинилэстрадиол), антиэстрогены (тамоксифен) и ингибиторы ароматазы (фадрозол и др.). Одним из экспериментальных подходов является индукция инверсии пола с помощью этих веществ, а также изменение баланса половых гормонов посредством ингибирования ферментов, участвующих в стероидогенезе. Так, ранее были проведены эксперименты с использованием фадрозола (ингиби-

тора ароматазы), эстрогенов и их синтетических аналогов (бензоата эстрадиола), в которых наблюдали превращение генетических самок в фенотипических самцов и, наоборот, самцов — в самок (Elbrecht, Smith, 1992; Vaillant et al., 2001; Li-xiu et al., 2013; Nakata et al., 2013). В экспериментах на эмбрионах курицы показано, что при введении эстрогенов на ранних стадиях эмбриогенеза (4—7 сут развития) у генетических самцов (ZZ) наблюдается феминизация гонад; в то же время при использовании ингибитора ароматазы фадразола происходит маскулинизация гонад генетических самок (ZW) (Abinawanto et al., 1996).

Большое значение для поступления эстрогенов в ядро клетки играют его собственные рецепторы ER $\alpha$  и ER $\beta$ . В норме ген рецептора эстрогена альфа (ER $\alpha$ ) экспрессируется в коре гонады у обоих полов до половой дифференциации. Позднее его экспрессия подавляется в обеих гонадах самца и правой дегенерирующей гонаде самки. В ряде работ показана роль веществ, таких как тамоксифен, конкурирующих за эстрогеновые рецепторы в медуллярной области гонад обоих полов. Эти вещества оказывают маскулинизирующий эффект на гонады генетических самок (Gill-Sharma et al., 2001; Brunstrom et al., 2003; Halldin, 2005; Lisowski, Bednarczyk, 2005).

Цель настоящей работы заключалась в том, чтобы выяснить влияние эстрогенов на формирование семенников и яичников у птиц, а также на созревание половых клеток. Для достижения этой цели мы изменяли баланс половых гормонов с помощью ингибирования ароматазы и чувствительность эстрогеновых рецепторов к своему гормону с помощью соответствующего модулятора.

## Материал и методика

Нами была проведена серия экспериментов с ингибитором ароматазы летрозолом (Letrozole, Novartis Pharma, Швейцария) и модулятором эстрогеновых рецепторов тамоксифеном (Австрия). В каждом эксперименте использовали по 20 оплодотворенных куриных яиц кросса Хайсекс Белый (Санкт-Петербург, Тосно, Лисий Нос). В воздушную камеру каждого яйца вводили однократно (на 4-е сут) и двукратно (на 4-е и 11-е сут) инъекции раствора летрозолола или тамоксифена (по 100 мкл на яйцо, концентрация раствора 1 мг/мл). Кроме того, в одном из опытов сначала была произведена инъекция раствора тамоксифена (на 4-е сут), потом — раствором летрозолола (на 11-е сут). Для контроля использовали яйца, в которые вводили по 100 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) без агента. После этого их инкубировали в течение 19 сут при 37,8 °C и влажности 28 %.

Из 19-суточных эмбрионов вынимали гонады, определяли их тип (семенники или яичник) и затем фиксировали в смеси Кларка (смесь этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1). После отмывки гонад от фиксатора и предварительной обработки в серии спиртов повышающейся концентрации (этиловый спирт—изобутиловый спирт—ортоксилон) их заключали в парафин по стандартному методу (Барыкина и др., 2004) для приготовления срезов с помощью салазочного микротомы. Далее препараты срезов освобождали от парафина, окрашивали гематоксилином по Майеру, обезживали спиртами повышающейся концентрации (этиловый спирт—изобутиловый спирт—ортоксилон) и заклю-

чали в канадский бальзам (ДиаМ, Россия). Гистологию гонад анализировали с помощью микроскопа Leica DM6000B (Leica Microsystems GmbH, Германия), оборудованного цветной цифровой CCD-камерой Leica DC500, подключенной к компьютеру, и программного обеспечения Leica QWin v.1.2.

Для определения генетического пола у каждого эмбриона использовали ДНК, выделенную по известному методу (Griffiths et al., 1998). Генетический пол эмбрионов определяли методом ступенчатой полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров для гена *CHD1* курицы: *CHD1F* 5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3' и *CHD1R* 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3' (Ellegren, 2002). Условия ПЦР были стандартными: денатурация в течение 5 мин при 94 °C, постепенное понижение температуры на 1 °C с 60 до 50 °C (по 1 мин в каждом случае) и далее 35 циклов: 30 с при 94 °C, 30 с при 50 °C, 60 с при 72 °C. Последний этап ПЦР проводили при 72 °C 10 мин. Результаты ПЦР проверяли с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Наличие только одного фрагмента (380 п. н.) наблюдали у самца, у самки наблюдали два продукта реакции (500 и 380 п. н.).

Использованные реактивы: летрозол (Novartis Pharma, Швейцария), тамоксифен (Эбеве Фарма, Австрия),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, агароза (Хеликон, Россия), этиловый спирт (Инвест ООО, Россия), ледяная уксусная кислота, изобутиловый спирт (Вектон, Россия), ортоксилон (MERCK, Германия), парафин, гематоксилин (БиоВитрум, Россия), канадский бальзам (ДиаМ, Россия), протеиназа К, РНКаза А, Taq-полимераза, dNTP (Fermentas, Латвия), праймеры для гена *CHD1* (Бигль, Россия), бромистый этидий (Invitrogen, США).

## Результаты

Влияние эстрогенов на развитие гонад эмбрионов курицы оценивали на основании анатомических (парность гонад, их размеры и форма), гистологических и цитологических критериев (наличие семенных канальцев, состояние половых клеток). Результаты экспериментов представлены в табл. 1. У контрольных самок наблюдали типичные левые гонады, состоящие из медуллы и кортекса (рис. 1, а). В кортексе выявляли многочисленные половые клетки на стадии профазы мейоза. У контрольных самцов того же возраста семенники были парными, меньшего размера, с развитой системой семенных канальцев, в которых присутствовали преимущественно сперматогонии, не вступившие в мейотический цикл. Генетический пол контрольных самцов и самок полностью соответствовал фенотипическому.

В морфологии гонад у экспериментальных генетических самок в той или иной степени наблюдали отклонения от нормы. Наибольшие изменения были обнаружены в опытах с летрозолом: изменение толщины кортекса (утончение), появление в медулле структур, напоминающих семенные канальцы (рис. 1, б). Расположение половых клеток в кортексе и их количество сохранялись. Большинство половых клеток яичников вступило в мейоз и было блокировано на стадии профазы мейоза. У генетических самцов, обработанных ингибитором ароматазы (летрозолом), явных изменений не было ни в одной из гонад (рис. 2, а, б).

В экспериментах с тамоксифеном при однократной инъекции изменений в гонадах эмбрионов у обоих полов

Таблица 1

Особенности морфологии и гистологии гонад у экспериментальных самцов и самок

Агент (число инъекций и доза, мкл)	Генетические самцы		Генетические самки		
	наличие АС	наличие профаз мейоза	с двумя гонадами	наличие СК	наличие профаз мейоза
Контроль	—	—	—	—	+
Летрозол (1, 100)	—	—	+	+	+
Тамоксифен (1, 100)	—	—	+	+	+
Тамоксифен (1, 200)	+	—	+	+	+
Летрозол (2, 100)	—	—	+	+	+
Тамоксифен (2, 100)	—	—	+	+	+
Тамоксифен (1, 100) + Летрозол (1, 100)	—	—	+	+	+

Примечание. АС — асимметричные семенники, СК — семенные каналцы.

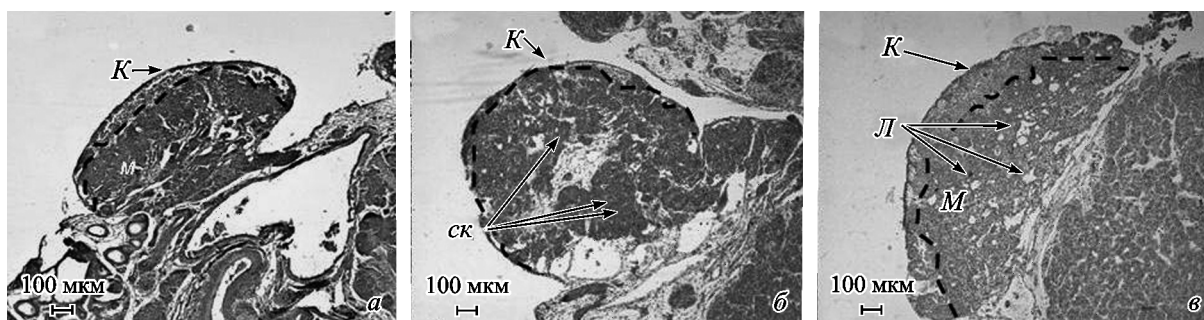


Рис. 1. Гонады эмбрионов генетических самок курицы на 19-е сут развития в контроле (а) и после инъекции летрозола (б) или тамоксифена (в).

На б, в видны структурные изменения гонад по отношению к контролю: уменьшение (б) и увеличение (в) толщины кортекса, увеличение числа лакун (в) и появление структур, похожих на семенные каналцы (б); граница между кортексом (К) и медуллой (М) показана штрихованной линией. СК — структуры, похожие на семенные каналца, Л — лакуны. Масштабные отрезки — 100 мкм.

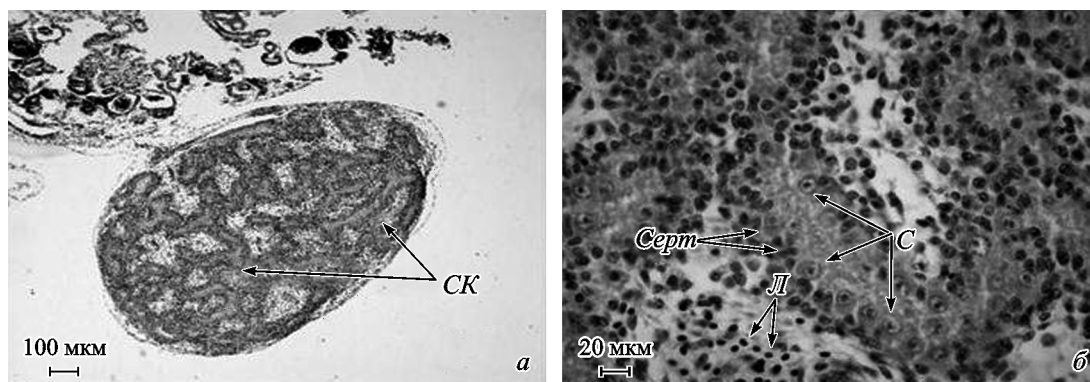


Рис. 2. Морфология гонады эмбриона генетического самца курицы на 19-е сут развития после инъекции летрозола и тамоксифена.

Показаны гонада (а) и срез через нее (б). Л — клетки Лейдига, Серт — клетки Сертоли, С — сперматогонии, СК — семенные каналцы. Масштабные отрезки — 100 (а) и 20 (б) мкм.

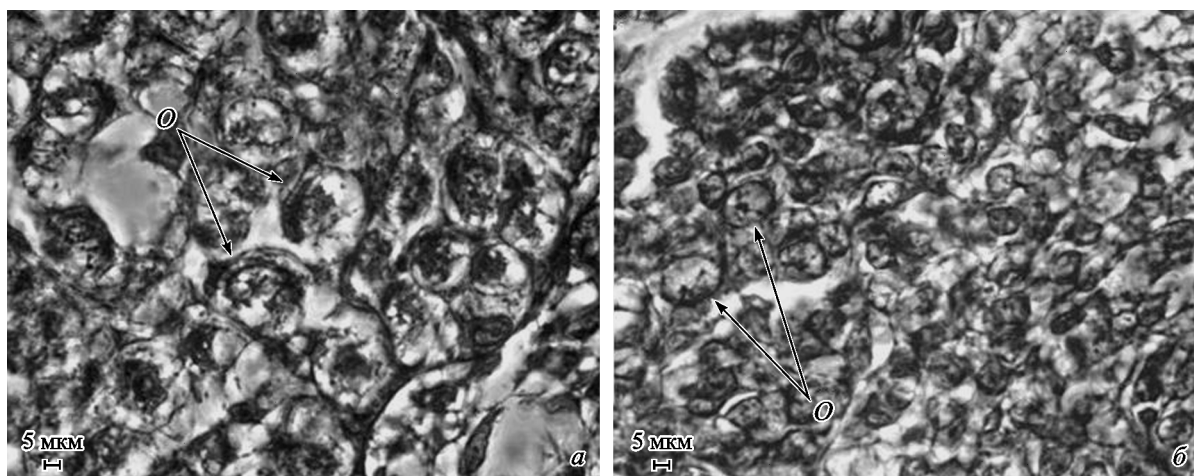


Рис. 3. Срез левой (а) и правой (б) гонад эмбриона самки курицы на 19-е сут развития после инъекции летрозола. а — ооциты (О) находятся на стадии профазы I мейоза, б — половые клетки заблокированы на более раннем этапе клеточного цикла. Масштабные отрезки — 5 мкм.

не обнаружено (табл. 1). Однако увеличение дозы тамоксифена в 2 раза, а также его двукратная инъекция в яйцо привели к незначительным изменениям: у самцов левая гонада гипертрофировалась, а у самок в большинстве случаев сохранялись обе гонады. При этом правая гонада была чуть меньше левой. В обеих гонадах наблюдали увеличение количества лакун в медулле, утолщение кортекса (рис. 1, в), а также структуры, похожие на семенные каналцы, проявление которых было незначительным. Количество половых клеток в левой гонаде на стадии профазы I мейоза стало больше, чем в норме (рис. 3, а), однако в правой гонаде половые клетки не вступали в профазу мейоза (рис. 3, б).

При одновременном использовании тамоксифена и летрозола, но на разных стадиях развития (табл. 1), в семенных каналцах экспериментальных самцов наблюдали значительно большее число половых клеток, чем в контроле. Однако они также были заблокированы до наступления мейоза. У генетических самок похожих изменений не наблюдали.

### Обсуждение

Для нормального функционирования животных и растительных клеток простого обмена веществ и энергии недостаточно. Им также необходима интеграция функций, которая, в частности, осуществляется гормонами. В настоящее время известно несколько десятков различных гормонов животного и растительного происхождения (Джафаров и др., 2010). По химической природе их подразделяют на три группы: белково-пептидные, производные ароматических аминокислот и липидные (стероидные гормоны и производные жирных кислот). В третью группу входят хорошо известные гормоны коры надпочечников и половых желез (Джафаров и др., 2010; Верин, Иванов, 2012).

Биосинтез стероидных гормонов представляет собой многоступенчатый процесс и имеет большое физиологическое значение для животных и растений (Джафаров и др., 2010; Перевозчиков, 2011). Каждый из его этапов происходит под контролем биологических катализаторов — ферментов. Одним из таких ферментов является

ароматаза, которая участвует в превращении тестостерона и андростендиона (мужские половые гормоны) в эстрадиол и эстрон (женские половые гормоны) соответственно. Этот фермент активен у представителей обоих полов, но максимальной активности достигает в женских гонадах (Верин, Иванов, 2012).

Ароматаза является продуктом экспрессии гена *CYP19A1*, который обнаружен как у животных, так и у растений. Ее значение для организма трудно переоценить, поскольку она не только участвует в синтезе эстрогенов, но и в целом относится к ферментам метаболизма холестерина, избыток которого может привести к серьезным последствиям. В настоящее время этот фермент хорошо изучен у большинства видов животных, в том числе и у человека. Часто он является мишенью для лечения злокачественных опухолей, вызванных избыточной продукцией эстрогенов у женщин, а также для изучения роли эстрогенов в формировании женских гонад (Берштейн, 2004; Доброхотова и др., 2009; Волков и др., 2012).

В нашей работе мы ингибировали ароматазу с помощью летрозола: в отличие от других ингибиторов ароматазы (фадразол и др.) он менее токсичен для организма, что наиболее важно при работе с эмбрионами, и имеет нестероидную природу. Мы использовали и другой подход, позволяющий ослабить влияние эстрогенов на развитие гонад у эмбриона, а именно применение тамоксифена в качестве конкурирующего агента за эстрогеновые рецепторы на поверхности специфических клеток. Такие клетки есть в женских и мужских гонадах, в почках, печени и жировой ткани (Джафаров и др., 2010).

Наибольший интерес для нас представляет влияние эстрогенов на формирование гонад у птиц. Этот интерес не только имеет фундаментальное значение, но и связан с возможностью фенотипического переопределения пола у генетических самцов. Это необходимо для более экономичного и эффективного использования ресурсов птицеводческих хозяйств (Weissman et al., 2013).

Как известно, ароматаза участвует в реакции превращения андрогенов в эстрогены. Поэтому ингибирование ароматазы должно приводить к изменению баланса половых гормонов, и следует ожидать, что андрогены будут значительно преобладать над эстрогенами (Джафаров и др., 2010). Мы показали, что при полученном балансе

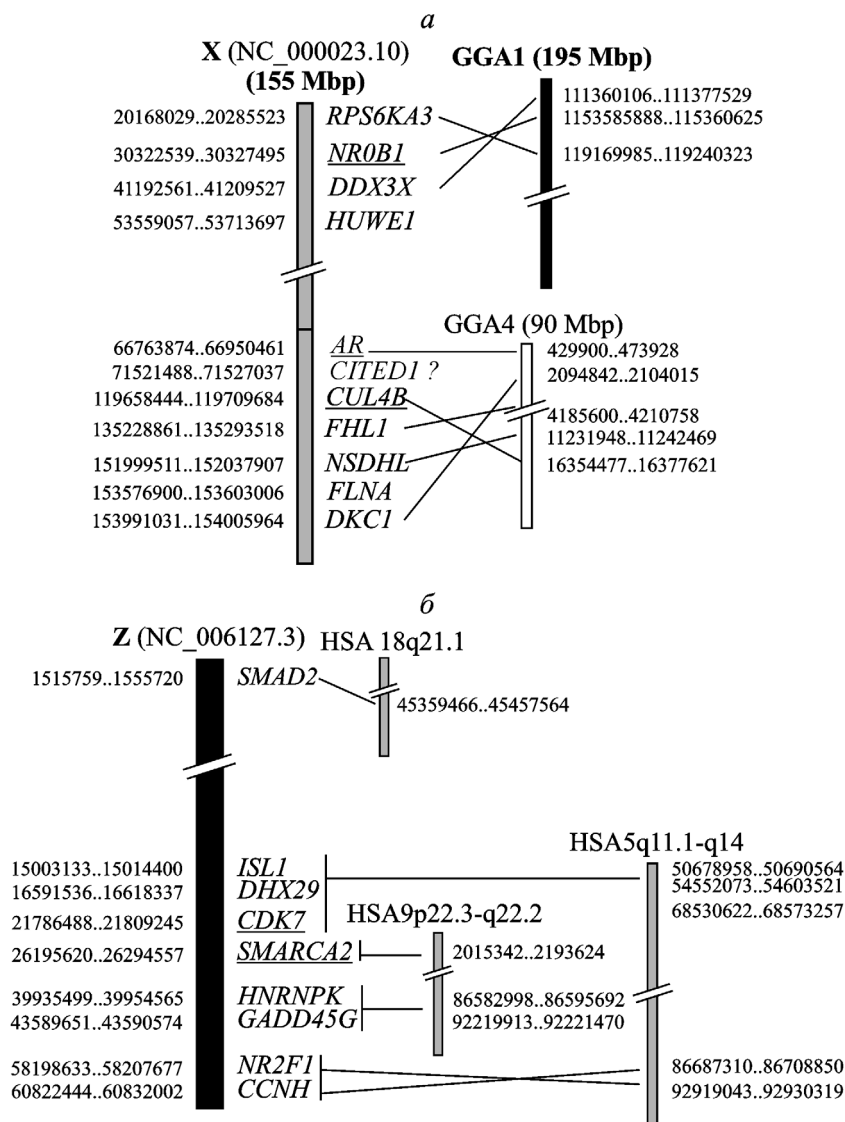


Рис. 4. Схема локализации генов и их гомологов, продукты которых взаимодействуют с рецепторами ESR1 и AR, в геноме курицы и человека.

*а* — в хромосоме X человека (гены) и в хромосомах 1 и 4 курицы (гомологи); *б* — в хромосоме Z курицы (гены) и в хромосомах 5, 9 и 18 человека (гомологи). Функции соответствующих белков приведены в табл. 2. Цифрами указано физическое расположение генов в соответствующих хромосомах. Подчеркнуты названия генов, продукты которых взаимодействуют с эстрогеновыми, и с андрогеновыми рецепторами. Локализация генов-ортологов *HUWE1*, *CITED1* и *FLNA* в геноме курицы до сих пор неизвестна. У гена *DDX3X* человека есть гомолог в хромосоме Y (*DDX3Y*) человека. У курицы этот гомолог не найден.

половых гормонов возможен сдвиг дифференцировки женских гонад в сторону формирования семенников (уменьшение толщины кортекса, появление семенных канальцев в медулле), но он приводит только к развитию гермафродитной железы — овотестиса (рис. 1, б). Возможно, полному развитию семенников у генетических самок препятствуют детерминанты, располагающиеся в W-хромосоме, или контроль за развитием женских гонад на эпигенетическом уровне (Yang et al., 2011; Piferrer, 2013). С нашей точки зрения, ингибирование ароматазы приводит к недостаточному функционированию интерстициальных клеток прогонады, что соответствующим образом сказывается на ее развитии. При этом не следует ожидать не только нормального развития яичника, но и нормального оогенеза. Также нужно отметить, что у генетических самок при ингибировании ароматазы летрозолом сохраняется и продолжает свое развитие правая гона-

да, которая при нормальном развитии должна деградировать. При этом правая гонада по морфологии представляет собой яичник. Вероятно, преобладающее количество производимых клетками прогонады андрогенов приводит к выключению блока развития правой гонады у самки. Механизм такого выключения пока неясен.

Наличие правой гонады и левого овотестиса у генетических самок курицы приводит к ложному эффекту маскулинизации гонад. Такой же эффект был выявлен и другими исследователями при введении фадразола и воразола (ингибиторов ароматазы иной природы, чем летрозол) (Dewil et al., 1998; Vaillant et al., 2001; Yang et al., 2008; Li-xiu et al., 2013; Nakata et al., 2013). При этом ни один из указанных ингибиторов ароматазы не влиял на процесс формирования семенников у генетических самцов (табл. 1; рис. 2). Вероятно, активность ароматазы в данном случае минимальна и находится на таком пороговом

**Функции белков и нуклеопротеинов, взаимодействующих с эстрагеновым рецептором ESR1,  
и результат мутаций их генов у человека**

Белок	Функция	Результат мутации
RPS6KA3	Клеточный рост и дифференциация	Синдром Коффин—Лаури
NR0B1	Доминантно-негативная регуляция транскрипции, антагонист к гену <i>Sry</i>	Врожденная адренальная гипоплазия, X-сцепленная
DDX3X	Инициация трансляции и сплайсинга, сперматогенез, клеточный рост и деление	Нет описания
AR	Транскрипционный фактор	Бульбарная мышечная атрофия (болезнь Кеннеди), полная андрогенная нечувствительность (CAIS)
CUL4B	Протеолиз регуляторов репликации ДНК	Нет описания
FHL1	Регуляция многих клеточных процессов	Миодистрофия Эмери—Дрейфуса
DKC1	Созревание и модификация рРНК	Синдром врожденного дискератога (X-сцепленный), синдром Хойераал—Хрейдарсона
NSDHL	Биосинтез холестерина	Синдром CHILD, нарушение липидного метаболизма (X-сцепленный, доминантный)
FLNA	Ремоделирование цитоскелета	Нодулярная перивентрикулярная гетеротопия (PVNH1 и PVNH4), синдром отопалатодигитальный (OPD1 и OPD2), метафизарная дисплазия (FMD), синдром Мелника—Нидлса (MNS), врожденная остеодисплазия и врожденная кишечная непроходимость (CIPX) (X-сцепленная)
ISL1	Регуляция экспрессии гена инсулина, развитие клеток поджелудочной железы и генерация двигательных нейронов	MODY-диабет
DHX29	Не изучена	Нет описания
CDK7	Прогрессия клеточного цикла	То же
CCNH	Регулятор CDK-киназ	» »
NR2F1	Не изучена	» »
SMARCA2	Регуляция транскрипции путем ремоделирования хроматина	» »
GADD45G	Активация p38/JNK-пути	» »
HNRNPK	Созревание и транспорт мРНК, прогрессия клеточного цикла	» »
SMAD2	Пролиферация и дифференциация клеток, апоптоз	» »
CITED1	Транскрипционный коактиватор	» »
HUWE1	Убиквитинилирование и последующая деградация белков Mc11, p53, коровых гистонов и ДНК-полимеразы-бета	Задержка умственного развития (X-сцепленный)
DDX3Y	Инициация трансляции и сплайсинга, сперматогенез, клеточный рост и деление	Мужское бесплодие, синдром клеток Сертоли или гипосперматогенез

Примечание. Использована база данных NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genec/>

уровне, когда ее ингибирование не имеет особого значения. Полученные данные говорят о том, что наибольшее маскулинизирующее действие ингибирования ароматазы на гонады самок наблюдалось после двукратного введения летрозолола (рис. 1, б).

У курицы мейоз в женских половых клетках начинается во второй половине эмбрионального развития, в то время как в мужских гонадах на этой стадии развития присутствуют лишь сперматогонии. Вступление в мейоз мужских половых клеток у курицы наблюдается после вылупления (Некрасова и др., 2011; Nakamura et al., 2013). Анализ наших данных по половым клеткам в овотестисах маскулинизированных самок показал, что в левой гонаде ооциты находятся на стадиях зиготены-пахитены профазы мейоза (рис. 3, а), а в правой сохранившейся гонаде дифференцировка половых клеток блокирована

(рис. 3, б). Ранее предполагалось, что у самок мейоз индуцируется ретиноидной кислотой, действие которой у самцов ингибирует цитохром CYP26B1. Результаты, полученные Некрасовой с сотрудниками (2011), подтверждают возможное стимулирующее влияние ретиноидной кислоты на вступление половых клеток в мейоз (Некрасова и др., 2011). В нашем случае, вероятно, изменение баланса половых гормонов, синтезируемых клетками гонады, не влияет на активность ретиноидной кислоты и соответственно на переход половых клеток в мейоз. Вопрос о дальнейшей судьбе половых клеток в гонадах у самок после инверсии пола летрозолом требует дополнительного исследования.

Половые гормоны взаимодействуют со своими специфическими рецепторами (ESR1 и AR) и образуют с ними сложные комплексы, способные достигать регуля-

торных участков хроматина в ядре и инициировать транскрипцию чувствительных генов (Джафаров и др., 2010; Перевозчиков, 2011). Существует ряд химических веществ, которые ограничивают взаимодействие гормонов со своими рецепторами. Так, например, тамоксифен является модулятором рецептора эстрогена и конкурирует с эстрогеном за формирование комплекса с одним и тем же рецептором. В результате эстроген не может проникнуть в клетки развивающейся женской гонады или проникает в них в очень небольшом количестве. Мы предположили, что это должно привести к маскулинизации гонады. Действительно, при однократной и двукратной инъекциях раствора тамоксифена (табл. 1) мы наблюдали подобный эффект, но в значительно меньшей степени, чем при использовании летрозолола. Маскулинизирующий эффект тамоксифена показан и в ряде других работ (Scheib et al., 1984; Hutson et al., 1985).

Сравнение полученных в нашем исследовании результатов показало, что эффективность влияния тамоксифена и летрозолола на процесс развития женских гонад различается: летрозолол обладает более маскулинизирующим эффектом, чем тамоксифен. Конкуренция тамоксифена за эстрогеновые рецепторы слабо влияет на дифференцировку пола у птиц. Вероятно, это связано с наличием нескольких типов эстрогеновых рецепторов, которые обладают разным сродством к эстрогену и тамоксифену, или эстрогены одновременно взаимодействуют с небольшим числом рецепторов на поверхности ядра. Следует также отметить, что женская эмбриональная гонада после действия тамоксифена гипертрофирована вследствие накопления полового гормона — эстрогена, который сохраняется в лакунах медуллы (рис. 1, в).

Заслуживают пристального внимания экспериментальные подходы к изучению инверсии пола у птиц в качестве инструмента для описания особенностей генетики пола позвоночных. До сих пор неясно, когда (на 3, 4, 5 или 6-е сут инкубации) и куда лучше всего делать инъекцию (в воздушную камеру, в белок, в желток или же «наслоить» раствор на поверхность желтка в район эмбрионального диска, для того чтобы действующее вещество могло проникнуть в эмбрион через кровеносную систему). Мы предполагаем, что вещество следует вводить через кровеносную систему на 3—4-е сут инкубации. В этом случае достигается непосредственная доставка вещества к органу-мишени, минуя его деградацию пищеварительными ферментами. Кроме того, через кровеносную систему происходит непрерывный поток питательных веществ, а желток и белок потребляется эмбрионом не постоянно. На ранних этапах развития эмбрион питается желтком, а на более поздних — белком.

В заключение мы проанализировали аннотации основной части генов человека, которые представлены в базе данных NCBI (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и чьи продукты взаимодействуют с эстрогеновыми и андрогеновыми рецепторами. Нами выявлены 302 гена, продукты которых взаимодействуют с эстрогеновым рецептором 1 (ESR1), и 167 генов, продукты которых взаимодействуют с андрогеновым рецептором (AR). Кроме того, продукты 81 гена взаимодействуют с рецепторами обоих половых гормонов. Большинство из этих генов имеют соответствующие ортологи в геноме курицы: 251 ген для тех, чьи продукты взаимодействуют с эстрогеновым рецептором, и 77 ген для тех, чьи продукты взаимодействуют с рецепторами обоих половых гормонов. В геноме человека среди выявленных нами генов есть только один,

определяющий пол, который непосредственно взаимодействует с AR, а именно ген *SRY*. AR является посредником между андрогенами и геном *SRY*, который расположен в хромосоме Y. Его гомологом в хромосоме X является ген *SOX3*. Ортолог этого гена был найден в геноме курицы, он имеет гомологию около 72 % и локализуется в хромосоме 4. Вероятно, именно из этой пары аутосом общего предка птиц и млекопитающих произошли половые хромосомы человека. Об этом говорят и другие гены, локализованные в X-хромосоме человека и представленные на рис. 4, а.

На рис. 4, б показаны гены, расположенные в хромосоме Z курицы, чьи продукты функционально связаны с эстрогеновыми и андрогеновыми рецепторами. На рис. 4 не представлены гены, локализованные ранее и указанные в интегрированной консенсусной карте генома курицы, опубликованной в 2000 и 2005 гг. (Schmid et al., 2000, 2005). Цифрами на рис. 4 показано физическое положение генов на хромосомах курицы и человека. Порядок генов совпадает в соответствии с этими величинами. Расстояние между генами относительное. Гены, чьи продукты взаимодействуют и с эстрогеновыми, и с андрогеновыми рецепторами, подчеркнуты.

В табл. 2 показаны основные функции белков и нуклеопротеинов, взаимодействующих с рецептором ESR1, и синдромы, наблюдаемые у человека, вызываемые их мутантной формой. Поскольку наибольший интерес связан с генами, которые располагаются в половых хромосомах, мы ограничились только этими хромосомами. Из данных табл. 2 очевидно разнообразие функций, выполняемых продуктами этих генов. Хотя гены и расположены в половых хромосомах, функционирование их белков и нуклеопротеинов связано не только с полом. Не для всех белков и нуклеопротеинов выявлены эффекты мутаций.

### Список литературы

- Барыкина П. П., Веселова Т. Д., Девятков А. Г., Джалилова Х. Х., Ильина Г. М., Чубатова Н. В. 2004. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд-во МГУ. 311 с. (Barikina R. P., Veselova T. D., Devyatov A. G., Jalilova H. H., Il'ina G. M., Chubatova N. V. 2004. Reference-book of botanical microtechnics. Principles and methods. M.: MSU. 311 p.)
- Берштейн Л. М. 2004. Онкоэндокринология. Традиции, современность и перспективы. СПб.: Наука. 344 с. (Berstein L. M. 2004. Oncoendocrinology. Traditions, contemporary situation and perspectives. SPb.: Nauka. 344 p.)
- Верин В. К., Иванов В. В. 2012. Гормоны и их эффекты. Справочник. СПб.: ООО Фолиант. 136 с. (Verin V. K., Ivanov V. V. 2012. Hormones and their effects. Reference-book. SPb.: Foliant. 136 p.)
- Волков А. Е., Рымашевский А. Н., Хмара Л. Е. 2012. Рецептурный справочник акушера-гинеколога. Ростов н/Д: Феникс. 351 с. (Volkov A. E., Rimashevskii A. N., Hmara L. E. 2012. Prescription reference-book of midwife-gynaecologist. Rostov-na-Donu: Fenix. 351 p.)
- Джафаров М. Х., Зайцев С. Ю., Максимов В. И. 2010. Стероиды. Строение, получение, свойства и биологическое значение, применение в медицине и ветеринарии. СПб.; М.: Лань. 289 с. (Jafarov M. H., Zaicev S. Yu., Maksimov V. I. 2010. Steroids. Structure, receipt, qualities and biological importance, application in medicine and veterinary. SPb.; M.: Lan'. 289 p.)
- Доброхотова Ю. Э., Джобова Э. М., Рагимова З. Э., Герасимович М. Ю. 2009. Синдром гиперандрогении в практике акушера-гинеколога, дерматолога и эндокринолога. М.: ГЭОТАР-Медиа. 112 с. (Dobrokhotova Yu. E., Jobava E. M., Ragimovich M. Yu. 2009. Синдром гиперандрогении в практике акушера-гинеколога, дерматолога и эндокринолога. М.: ГЭОТАР-Медиа. 112 с.)

- gimova Z. E., Gerasimovich M. Yu. 2009.* Syndrome of hyperandrogenia in practice of midwife- gynaecologist, dermatologist and endocrinologist. M.: GEOTAR-Media. 112 p.)
- Кожухарь В. Г. 2012.* SRY и SOX9 — главные факторы генетической детерминации пола у млекопитающих. Цитология. 54 (5) : 390—404. (*Kozhukhar V. G. 2012.* SRY and SOX9: the main genetic factors of mammalian sex determination. *Tsitologiya.* 54 (5) : 390—404.)
- Некрасова А. А., Лукина Н. А., Козикова Л. В., Смирнов А. Ф. 2011.* Влияние ретиноидной кислоты на мейоз у куриного эмбриона (*Gallus domesticus*). Цитология. 53 (8) : 659—664. (*Ne-krasova A. A., Lukina N. A., Kozikova L. V., Smirnov A. F. 2011.* Influence of retinoic acid on meiosis in chick embryo (*Gallus domesticus*). *Tsitologiya.* 53 (8) : 659—664.)
- Перевозчиков А. П. 2011.* Стероиды и их транспорт в развитии и эволюции животных. СПб.: Изд-во СПбГУ. 104 с. (*Perevozchikov A. P. 2011.* Steroids and their transport in development and evolution of animals. SPb.: SPbSU. 104 p.)
- Abinawanto A., Shimada K., Yoshida K., Saito N. 1996.* Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of P450<sub>17α</sub> and P450<sub>arom</sub> messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102 : 241—246.
- Ayers K. L., Sinclair A. H., Smith C. A. 2013.* The molecular genetics of ovarian differentiation in the avian model. *Sex. Develop.* 7 (1—3) : 80—94.
- Brunstrom B., Axelsson J., Halldin K. 2003.* Effects of endocrine modulators on sex differentiation in birds. *Ecotoxicology.* 12 : 287—295.
- Clinton M. 1998.* Sex determination and gonadal development: a bird's eye view. *J. Exp. Zool.* 281 : 457—465.
- Dewil E., Buyse J., Veldhuis J. D., Mast J., DeCoster R., Ducypere E. 1998.* In ovo treatment with an aromatase inhibitor masculinizes postnatal hormone levels, abdominal fat pad content, and GH pulsatility in broiler chickens. *Dom. Anim. Endocrinol.* 15 : 115—127.
- Ditewig A. C., Yao H. H. 2005.* Organogenesis of the ovary: a comparative review on vertebrate ovary formation. *Organogenesis.* 2 : 36—41.
- Eggers S., Sinclair A. 2012.* Mammalian sex determination — insights from humans and mice. *Chromosome Res.* 20 : 215—238.
- Elbrecht A., Smith R. G. 1992.* Aromatase enzyme activity and sex determination in chicken. *Science.* 255 : 467—470.
- Ellegren H., 2002.* Dosage compensation: do birds do it as well? *Trends Genetics.* 18 : 25—28.
- Gamble T., Zarkower D. 2012.* Sex determination. *Curr. Biol.* 22 : R257—R262.
- Gill-Sharma M. K., Balasinor N., Parte P., Aleem M., Juneja H. S. 2001.* Effects of tamoxifen metabolites on fertility of male rat. *Contraception.* 63 : 103—109.
- Griffiths R., Double M. C., Orr K., Dawson R. J. G. 1998.* A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* 7 : 1071—1075.
- Halldin K. 2005.* Impact of endocrine disrupting chemicals on reproduction in Japanese quail. *Dom. Anim. Endocrinol.* 29 : 420—429.
- Hutson J. M., Donahoe P. K., MacLaughlin D. T. 1985.* Steroid modulation of Mullerian duct regression in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 57 : 88—102.
- Lisowski M., Bednarczyk M. 2005.* Effects of tamoxifen dose and nutrition scheme during growth on stimulation of the reproductive system in cornish breed cocks. *Folia biologica (Kraków).* 53 : 1—6.
- Li-xiu F., Rui X., Yi C., Shi-qing X. 2013.* Expression of sex-related genes in chicken embryos during male-to-female sex reversal exposure to diethylstilbestrol. *J. Integrative Agriculture.* 12 : 127—135.
- Nakamura M. 2009.* Sex determination in amphibians. *Seminars Cell Develop. Biol.* 20 : 271—282.
- Nakamura Y., Kagami H., Tagami T. 2013.* Development, differentiation and manipulation of chickengerm cells. *Develop. Growth Differ.* 55 : 20—40.
- Nakata T., Ishiguro M., Aduma N., Izumi H., Kuroiwa A. 2013.* Chicken hemogen homolog is involved in the chicken-specific sex-determining mechanism. *PNAS.* 110 : 3417—3422.
- Pask A. J. 2012.* A role for estrogen in somatic cell fate of the mammalian gonad. *Chromosome Res.* 20 : 239—245.
- Piferrer F. 2013.* Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. *Develop. Dynamics.* 242 : 360—370.
- Scheib D., Mignot Th. M., Guichard A. 1984.* Effects of early tamoxifen treatment on hormonal content of 15-day quail embryo gonads. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56 : 425—432.
- Schmid M., Nanda I., Guttenbach M., Steinlein C., Hoehn M., Scharlt M., Haaf T., Weigend S., Fries R., Buerstedde J. M., Wimmers K., Burt D. W., Smith J., A'Hara S., Law A., Griffin D. K., Bumstead N., Kaufman J., Thomson P. A., Burke T., Groenen M. A., Crooijmans R. P., Vignal A., Fillon V., Morisson M., Pitel F., Tixier-Boichard M., Ladjali-Mohammedi K., Hillel J., Maki-Tanila A., Cheng H. H., Delany M. E., Burnside J., Mizuno S. 2000.* First report on chicken genes and chromosomes. *Cytogenet. Cell Genetics.* 90 : 169—218.
- Schmid M., Nanda I., Hoehn H., Scharlt M., Haaf T., Buerstedde J.-M., Arakawa H., Caldwell R. B., Weigend S., Burt D. W., Smith J., Griffin D. K., Masabanda J. S., Groenen M. A. M., Crooijmans R. P. M. A., Vignal A., Fillon V., Morisson M., Pitel F., Vignoles M., Garrigues A., Gellin J., Rodionov A. V., Galkina S. A., Lukina N. A., Ben-Ari G., Blum S., Hillel J., Twito T., Lavi U., David L., Feldman M. W., Delany M. E., Conley C. A., Fowler V. M., Hedges S. B., Godbout R., Katyal S., Smith C., Hudson Q., Sinclair A., Mizuno S. 2005.* Second report on chicken genes and chromosomes. *Cytogenet. Gen. Res.* 109 : 415—479.
- Smith C. A. 2010.* Sex determination in birds: a review. *Emu.* 110 : 364—377.
- Smith C. A., Roeszler K. N., Ohnesorg T., Cummins D. M., Farlie P. G., Doran T. J., Sinclair A. H. 2009.* The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature.* 461 : 267—271.
- Vaillant S., Magre S., Dorizzi M., Pieau C., Richard-Mercier N. 2001.* Expression of AMH, SF1, and SOX9 in gonads of genetic female chickens during sex reversal induced by an aromatase inhibitor. *Develop. Dynamics.* 222 : 228—237.
- Weissmann A., Reitemeier S., Hahn A., Gottschalk J., Einspänner A. 2013.* Sexing domestic chicken before hatch: a new method for in ovo gender identification. *Theriogenology.* 80 : 199—205.
- Yang X., Zheng J., Na R., Li J., Xu G., Qu L., Yang N. 2008.* Degree of sex differentiation of genetic female chicken treated with different doses of an aromatase inhibitor. *Sex. Develop.* 2 : 309—315.
- Yang X., Zheng J., Qu L., Chen S., Li J., Xu G., Yang N. 2011.* Methylation status of cMHM and expression of sex specific genes in adult sex-reversed female chickens. *Sex. Develop.* 5 : 147—154.



EFFECT OF SEX INVERSION IN EMBRYOS OF DOMESTIC CHICKEN  
(*GALLUS GALLUS DOMESTICUS*) BY INFLUENCE OF LETROZOLE AND TAMOXIFEN

*A. V. Trukhina,<sup>1</sup> N. A. Lukina,<sup>2</sup> N. D. Wackerov-Kouzova,<sup>1</sup> A. A. Nekrasova,<sup>1</sup> A. F. Smirnov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Department of Genetics and Biotechnology  
and <sup>2</sup> Department of Cytology and Histology, St. Petersburg State University;  
<sup>1</sup> e-mail: trukhina\_ant@mail.ru

Realization of program of sex formation in multicellular organisms is a complex multistage process. The role of the inductor in this process is assigned to sex hormones synthesized by cells of the emerging gonads. The action of androgens on the formation of the male is now well understood. However, little is known about the involvement of estrogen the female gonad formation and the formation of a female as a whole. Here we present the results of experimental sex inversion in female chickens produced by aromatase inhibition and by the action of tamoxifen on chicken embryos. We have shown various masculinizing effect depending on the dose of active substance and the number of injections. We have noted that inhibition of aromatase does not block meiotic prophase in oogoniums. We have suggested that there are differences in the mechanisms of action of retinoic acid and estrogens on oogenesis. We have first shown proteins and nucleoproteins that interact with the estrogen receptor 1 and provided maps of their gene localization in human and chicken genomes.

Key words: sex inversion, chicken, letrozole, oogonium, tamoxifen, estrogen receptor, ovary, ESR1.

—————