

УДК 591.465.12.

## АКВАПОРИНЫ В ГАМЕТОГЕНЕЗЕ ПОЗВОНОЧНЫХ<sup>1</sup>

© 2008 г. М. Н. Скоблина

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: skoblina38@mail.ru

Поступила в редакцию 25.12.06 г.

Окончательный вариант получен 13.04.07 г.

Представлен обзор данных о присутствии, локализации и предполагаемой роли аквапориновых водных каналов в ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, оогенезе и созревании костистых рыб дорады *Sparus auratus* и радужной форели *Oncorhynchus mykiss*, в оогенезе и созревании ооцитов крыс и мышей и в сперматогенезе нескольких видов млекопитающих.

**Ключевые слова:** аквапорины, акваглицеропорины, оогенез, созревание ооцитов, оводнение ооцитов, антрум, клетки гранулезы, сперматогенез, сперматоцит, сперматиды, сперматозид, хлористая ртуть.

Вода может проникать в клетки благодаря диффузии через плазматическую мембрану или по аквапориновым водным каналам. Аквапорины (АП) представляют собой семейство небольших гидрофобных интегральных белков мембраны, облегчающих пассивное движение воды. АП состоят из четырех субъединиц, каждая из которых имеет молекулярную массу 25–34 кДа и содержит очень узкий канал, обеспечивающий переход самой маленькой биологической молекулы – молекулы воды. Скорость диффузии очень мала, по каналам вода движется со скоростью, на один-два порядка более высокой. Для осуществления диффузии воды через клеточную мембрану затрачивается много энергии, химические ингибиторы этого процесса неизвестны. Энергия, необходимая для движения воды по каналам, невелика и эквивалентна энергии диффузии воды в массе раствора, а проницаемость большинства АП подавляется соединениями ртути. К закрытию канала приводит взаимодействие ртути с остатком цистеина-189, находящегося внутри канала.

У млекопитающих обнаружено, по крайней мере, 12 АП, локализованных в клетках различных тканей, одни избирательно пропускают воду (аквапорины), другие – воду, глицерин и некоторые нейтральные молекулы (акваглицеропорины) (Agre et al., 2002; Agre, 2006).

Показано, что проницаемость разных АП для глицерина, мочевины, растворов и протонов обусловлена заменами одной или нескольких аминокислот в определенном участке молекулы АП (Beitz et al., 2006).

У растений, микроорганизмов, беспозвоночных и позвоночных животных известна структура более 200 АП, но роль многих из них пока остается невыясненной (Agre et al., 2002).

Что касается участия АП в гаметогенезе, то к настоящему времени оно обнаружено в оогенезе некоторых амфибий, в основном шпорцевой лягушки, оогенезе и созревании ооцитов костистых рыб дорады *Sparus auratus* и радужной форели *Oncorhynchus mykiss*, в оогенезе и созревании ооцитов крыс и мышей и в сперматогенезе нескольких видов млекопитающих. Интерес к исследованию АП у этих объектов понятен. Ооциты шпорцевой лягушки широко используются в качестве модельной системы для изучения экспрессии различных РНК, в том числе и РНК АП самых разных организмов, поэтому необходимо иметь представление об эндогенных АП ооцитов. В процессе созревания ооцитов костистых рыб, особенно откладывающих пелагическую икру, значительно увеличивается их объем за счет поступления воды, что приводит к снижению плавучей плотности и в дальнейшем обеспечивает рассредоточение зародышей. Считается, что оводнение ооцитов костистых рыб в процессе созревания является уникальным явлением среди позвоночных (Wallace, Selman, 1978). У млекопитающих в процессе оогенеза в многослойном фолликуле, окружающем ооцит, образуется заполненная жидкостью полость – антрум. В дальнейшем увеличение размера фолликула происходит главным образом за счет увеличения антрума (Hirshfield, 1991). Образование и увеличение антрума требует поступления воды,

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 05-04-48433).

которая может проникать между клетками или через клетки. В последнем случае речь идет о движении воды по водным каналам в мембранах клеток многослойной зоны гранулезы. Участие АП в сперматогенезе изучено только у млекопитающих. Секретция и реабсорбция жидкости имеют большое значение в физиологии репродуктивного тракта самцов; секретция жидкости необходима для заполнения семявыносящих канальцев, с ее потерей связывают преобразование округлой сперматиды в удлинённую и ряд других процессов (Dadoune, 1994).

### ООГЕНЕЗ

*Акваторины в оогенезе амфибий.* Об АП в оогенезе амфибий известно очень немного. Первые данные о том, что в ооцитах амфибий могут функционировать АП, были получены при измерении осмотического и диффузионного коэффициентов проницаемости плазматических мембран ооцитов у двух видов бесхвостых амфибий: шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и песочной жабы *Bufo arenarum*. Оказалось, что осмотическая проницаемость ( $\text{см/с} \times 10^{-4}$ ) была значительно выше у жабы (при  $6^\circ\text{C} = 12.3 \pm 2.4$ ; при  $18^\circ\text{C} = 20.8 \pm 4.8$ ), чем у шпорцевой лягушки (при  $6^\circ\text{C} = 5.3 \pm 0.3$ ; при  $18^\circ\text{C} = 6.2 \pm 1.6$ ). Соответствующая диффузионная проницаемость ооцитов двух видов отличалась мало: у шпорцевой лягушки она равна  $2.3 \pm 0.3$  и  $4.8 \pm 0.7$ , у жабы –  $2.7 \pm 0.4$  и  $6.0 \pm 0.5$  при  $6$  и  $18^\circ\text{C}$  соответственно. Ионы ртути не влияли на осмотическую проницаемость ооцитов шпорцевой лягушки, но обратимо подавляли ее у ооцитов жабы. Диффузионную проницаемость у обоих видов ионы ртути не подавляли (Carurro et al., 1994).

Сведения об АП получены только для ооцитов шпорцевой лягушки. Шрейбер с соавторами (Schreiber et al., 2000) клонировали гомолог АПЗ шпорцевой лягушки и обнаружили экспрессию мРНК АПЗ в ооцитах, где, по-видимому, экспрессируется и белок АПЗ. С его функционированием авторы связывают небольшое увеличение объема интактных ооцитов в гипотонической среде (Schreiber et al., 1997, 2000). Эндогенный АПЗ в ооцитах шпорцевой лягушки можно активировать. Было показано, что дикий тип трансмембранного регулятора проводимости кистозного фиброза (КФТР) усиливает осмотическую проницаемость ооцитов шпорцевой лягушки для воды под влиянием цАМФ. Ооциты шпорцевой лягушки, экспрессирующие дикий тип КФТР, обрабатывали неспецифическим ингибитором фосфодиэстераз-изобутилметилксантином (1 мМ) и наблюдали увеличение их проницаемости для воды. Стимулированная (но не исходная) проницаемость ооцитов подавлялась ингибиторами АП флоретинном и *p*-хлоромеркури-бензен-сульфонатом (1 мМ) (Schreiber et al., 1997, 2000).

Судя по тому, что проницаемость ооцитов шпорцевой лягушки для воды очень невелика и не

подавляется ингибиторами АП (Carurro et al., 1994; Schreiber et al., 1997, 2000), эндогенного белка АПЗ в ее ооцитах, по-видимому, очень мало. Кроме АПЗ, из ооцитов шпорцевой лягушки клонировали новый АП, который был назван АПх10. Белок обнаруживает наиболее высокую гомологию (39–50%) с акваглицеропоринами. Экспрессия АПх10 увеличивает осмотическую проницаемость ооцитов для воды, ее дальнейшему увеличению способствует щелочной рН среды. Авторы предполагают, что АПх10 представляет собой новый АП, неизвестный у млекопитающих (Virkki et al., 2002).

Итак, низкая проницаемость ооцитов шпорцевой лягушки для воды объясняется, по-видимому, не отсутствием белков АП, а скорее тем, что их экспрессируется очень мало. Почему в ооцитах шпорцевой лягушки экспрессируется мало АП, а в ооцитах песочной жабы (судя по их осмотической проницаемости) – много и какова возможная роль АП на завершающих стадиях оогенеза амфибий, покажут дальнейшие исследования.

*Акваторины в оогенезе рыб.* Участие аквапоринов в оогенезе и созревании ооцитов костистых рыб подробно исследовано только у одного вида – дорады *Sparus auratus* (Fabra et al., 2005, 2006). Вода поступает в ооцит благодаря наличию в нем свободных аминокислот, возникающих в результате протеолиза основных белков желтка (Greely et al., 1986; McPherson et al., 1989; Finn et al., 2002), и поступлению ионов, в основном калия и натрия (Hirose, 1976; Craik, Harvey, 1987; Greely et al., 1991).

Из ткани яичника дорады клонировали ген белка с характерными признаками АП. Экспрессия мРНК этого гена в ооцитах шпорцевой лягушки показала, что полученный белок, подобно АП1 млекопитающих, обеспечивает увеличение проницаемости ооцитов для воды, и это увеличение подавляется хлористой ртутью и восстанавливается  $\beta$ -меркаптоэтанолом. Однако в последовательности аминокислот этого белка мало сходства с другими АП1 позвоночных (от 45 до 54%) и соответствующая мРНК выявляется в основном в яичнике. Авторы назвали новый АП *S. auratus* AQP1 яичника (SaAQP10).

В процессе роста и созревания ооцитов дорады уровень мРНК SaAQP10 не меняется. Иммуноцитохимически SaAQP10 в превителлогенных ооцитах не обнаруживается, на ранних стадиях вителлогенеза он локализован в цитоплазме ооцита – в пузырьках, расположенных в кортикальной ооплазме. На более продвинутых стадиях вителлогенеза SaAQP10 смещается к плазматической мембране. Когда ооцит достигает максимального размера, SaAQP10 концентрируется в тонком слое непосредственно под плазматической мембраной. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что SaAQP10 синтезируется de novo ооцитом в начале вителлогенеза на уже существующей мРНК и в дальнейшем медленно смеща-

ется к плазматической мембране (Fabra et al., 2005, 2006).

Перед обработкой мейозиндуцирующим стероидом 17,20 $\beta$ -дигидропрогестероном (17,20 $\beta$ -ДГП) для стимуляции созревания ооцитов ядро ооцита (зародышевый пузырек, ЗП) расположено в центре, а желточные гранулы распределены равномерно в цитоплазме. Процесс созревания ооцитов у костистых рыб сопровождается слиянием желточных гранул. Фабра с соавторами (Fabra et al., 2006) разделили его на четыре стадии. Слияние желточных гранул начинается на стадии 2 и совпадает с миграцией ЗП к анимальному полюсу. К стадии 3 большинство желточных гранул сливаются, в результате чего на стадии 4 образуется центральная масса желтка. В процессе созревания происходит гидролиз белков желтка (исчезает белок с молекуляр. массой 103 кДа, а молекуляр. масса другого белка снижается с 96 до 90 кДа), и появляются свободные аминокислоты. Гидролиз белков желтка приблизительно совпадает со временем разрушения ЗП между стадиями 2 и 3 и завершается к стадии 4. На протяжении созревания ооцит накапливает ионы калия, но самое большое их поглощение, по-видимому, происходит между стадиями 3 и 4. Хотя объем ооцита постепенно увеличивается при созревании, наибольшее увеличение наблюдается между стадиями 3 и 4. Полное смещение SaAQP1o в микроворсинки плазматической мембраны обнаружено на стадии 3, вскоре после разрушения ЗП и незадолго до завершения гидролиза соответствующих белков и пика поступления ионов калия, которые повышают осмотическое давление, приводящее к опосредованному SaAQP1o транспорту воды. Объем ооцита в процессе оводнения увеличивается на 350%.

Чтобы оценить роль SaAQP1o в процессе оводнения ооцитов доряды, ее окруженные фолликулярными оболочками ооциты, претерпевающие оводнение *in vitro*, обрабатывали хлористой ртутью. Обработка приводила к дозозависимому подавлению оводнения ооцитов. Полученные результаты сходны с результатами изменения проницаемости ооцитов шпорцевой лягушки, экспрессирующими SaAQP1o, и служат еще одним свидетельством участия SaAQP1o в оводнении ооцитов доряды (Fabra et al., 2005). Подавление протеолиза белков желтка ингибитором АТФазы вакуолярного типа (H<sup>+</sup>-АТФазы) приводит к тому, что оводнение ооцитов становится минимальным, но их созревание не нарушается (Fabra et al., 2006).

Осмотическая проницаемость АП млекопитающих подавляется тетраэтиламмонием (ТЕА) (Detmers et al., 2006). Фабра с соавторами (Fabra et al., 2006) обрабатывали ТЕА ооциты шпорцевой лягушки, экспрессирующие SaAQP1o. Использование метода иммунофлуоресценции позволило обнаружить смещение SaAQP1o в плазматическую

мембрану ооцитов шпорцевой лягушки. SaAQP1o, экспрессированный в ооцитах шпорцевой лягушки, оказался способным к транспорту воды, а ТЕА (10 мМ) снижал проницаемость ооцитов для воды на 42%.

Авторы (Fabra et al., 2006) исследовали также влияние ТЕА на индуцированное 17,20 $\beta$ -ДГП созревание ооцитов доряды. Оказалось, что обработка ТЕА не влияет на созревание ооцитов, но снижает их оводнение на 20%. Частичное подавление оводнения ТЕА хорошо согласуется с тем фактом, что ингибитор не полностью блокирует транспорт воды через SaAQP1o. Однако этот факт может также свидетельствовать и о том, что *in vivo* поступление воды из крови и овариальной жидкости частично происходит благодаря диффузии через мембраны фолликулярных клеток и ооцита. Физиологическая роль SaAQP1o может состоять в ускорении поглощения воды. Авторы считают, что для проверки этой гипотезы необходимо использовать другие ингибиторы транспорта воды – специфические антитела или siРНК.

Перемещение SaAQP1o в плазматическую мембрану ооцита наблюдается вскоре после разрушения ЗП, следовательно, регуляция этого процесса, по-видимому, происходит после активации мейозиндуцирующего фактора, который вызывает разрушение ЗП, конденсацию хромосом и образование веретена. Пока неясно, контролируют ли смещение SaAQP1o в плазматическую мембрану мейозиндуцирующие стероид или фактор.

Итак, из ооцитов доряды выделен акваглицеропорин SaAQP1o. О его связи с оводнением ооцитов свидетельствуют следующие факты.

1. Смещение SaAQP1o в плазматическую мембрану непосредственно предшествует максимальному накоплению свободных аминокислот в процессе гидролиза белков желтка и наибольшему поступлению в ооцит ионов калия, которые создают осмотическое давление для опосредованного АП транспорта воды.

2. Обработка ооцитов ингибиторами АП приводит к подавлению оводнения ооцитов.

Есть основания предполагать, что в оводнении ооцитов пресноводных костистых рыб тоже могут участвовать АП. Изменение размера яиц пресноводных костистых рыб исследовано у нескольких видов. У одних рыб оводнение ооцитов обнаружено, у других – нет (Greely et al., 1986). Недавно показано, что у радужной форели *Oncorhynchus mykiss* объем ооцита в процессе созревания и овуляции увеличивается на 24.7% (Milla et al., 2006). В ее яичнике на стадиях поствителлогенеза и созревания ооцитов обнаружена сверхэкспрессия гена АП4 (Vobe et al., 2006), поэтому авторы предполагают, что этот ген может участвовать в оводнении ооцитов пресноводных костистых рыб.

Задачей дальнейших исследований, вероятно, будет выяснение роли АП не только в ооцитах других видов костистых рыб, но и в фолликулярных клетках, поскольку известно, что в отсутствие последних оводнение ооцитов невозможно (McPerson et al., 1989; Wallace et al., 1992).

*Аквапорины в оогенезе млекопитающих.* Механизмы поступления воды в ооциты и зародыши млекопитающих изучали на крысах и мышах. Для оценки вклада процессов диффузии через плазматическую мембрану и аквапориновых водных каналов в проницаемость для воды антральных фолликулов крыс определяли скорость поглощения  $^3\text{H}_2\text{O}$  и  $^{14}\text{C}$ -инулина (сложного сахара, локализованного в межклеточном пространстве). Скорость движения воды была в 3.5 раза выше, чем инулина: это свидетельствует о том, что вода поступает в фолликул главным образом через фолликулярные клетки. Предобработка фолликулов 50 мкМ хлористой ртути снижала скорость поступления воды до скорости поступления инулина, что свидетельствует об участии АП в транспорте воды (McConnell et al., 2002).

Для доказательства присутствия АП в клетках гранулезы авторы использовали гипотоническую среду. Оказалось, что она вызывает набухание клеток, а предобработка фолликулов 50 мкМ хлористой ртути снижает набухание. Используя антитела к АП, авторы показали, что проницаемость антральных фолликулов может быть опосредована присутствием в клетках гранулезы АП7, 8 и 9. Неполное подавление поступления воды при предобработке хлористой ртутью свидетельствует о том, что часть воды, по-видимому, поступает в антрум благодаря диффузии через клеточные мембраны. Кроме того, она поступает и через АП7 – один из АП, проницаемость которых не подавляется ингибитором. Поскольку фолликулы окружены текой, которая, по-видимому, участвует в поглощении ими воды, в дальнейшем авторы предполагают исследовать экспрессию АП в теке.

По мере приближения созревания в ооцитах происходят существенные структурные и функциональные изменения. Ооцит переходит от высокого уровня метаболической активности к низкому. Были изучены (Ford et al., 2000) механизмы движения воды в ооците в этот период. В ооцитах крыс с помощью видеомикроскопии прослеживали изменение объема, индуцируемое осмотическим градиентом. Осмотическая проницаемость для воды в незрелых ооцитах (стадия проэструса) чувствительна к хлористой ртути и флоретину. В отличие от этого зрелые ооциты (стадия эструса) имеют более низкую проницаемость, которая нечувствительна к ингибиторам. Когда ооциты, взятые на стадии проэструса, инкубировали при  $37^\circ\text{C}$ , они спонтанно достигали созревания и их

проницаемость снижалась между 4 и 6 ч после начала инкубации. Были использованы праймеры для всех клонированных генов АП крыс. Авторы обнаружили, что мРНК АП9 присутствует в ооцитах на стадии проэструса, но не эструса. АП9 описан как канал широкой избирательности, ответственный за транспорт воды и нейтральных молекул в метаболически активных клетках. Опыты показали, что ооциты, взятые на стадии проэструса, но не эструса, проницаемы для мантиола. Авторы пришли к выводу о том, что снижение проницаемости ооцитов в процессе созревания связано с исчезновением транскриптов АП9. Это первое исследование, в котором обнаружена связь между проницаемостью для воды и экспрессией мРНК АП в ооцитах млекопитающих

Экспрессию мРНК АП исследовали и в зрелых ооцитах (на стадии метафазы второго деления созревания) и в зародышах мышей. В ооцитах обнаружена мРНК АП3 и 7, а мРНК АП1-6 не обнаружены ни на одной из исследованных стадий (Edashige et al., 2000). В дальнейших работах этих исследователей речь идет только об АП3. Иммунохимическое исследование показало, что АП3 выявляется только в морулах, но не в зрелых ооцитах и 4-клеточных зародышах (Edashige et al., 2006). По-видимому, мРНК АП3, обнаруженная ранее в зрелых ооцитах, не транскрибируется. Данные об отсутствии АП3 в зрелых ооцитах хорошо согласуются с тем, что коэффициент осмотической проницаемости для воды зрелых ооцитов и зародышей на 4-клеточной стадии был низким. Кроме того, флоретин и *p*-хлоромеркури-бензен-сульфонат достоверно снижали проницаемость морул, но не ооцитов. Это свидетельствует о том, что вода проникает в ооциты через плазматическую мембрану посредством диффузии (Edashige et al., 2006). Поскольку в работе исследовали только зрелые ооциты, нельзя исключить того, что у мышей, как и у крыс, в плазматической мембране незрелых ооцитов АП присутствуют.

Исследование локализации АП в ооцитах и зародышах млекопитающих представляет не только научный, но и практический интерес, поскольку в настоящее время широко используется метод замораживания ооцитов и зародышей. АП3 – аквалицеропорин, поэтому исследовали, не улучшает ли искусственная экспрессия АП3 в ооцитах мыши их проницаемость для воды и глицерина и выживание ооцитов после замораживания (Edashige et al., 2003). В незрелые ооциты мыши инъецировали мРНК АП3, культивировали их в течение 12 ч и определяли проницаемость зрелых ооцитов. Проницаемость для воды и глицерина оказалась достоверно выше в инъецированных ооцитах, чем в контрольных. После замораживания в растворе, приготовленном на основе глицерина, выжило (судя по внешнему виду) 74% ооцитов,

инъецированных АПЗ, и ни один, инъецированный водой. После осеменения выживших ооцитов оплодотворилось 40 и дробился 31%. С другой стороны, показано, что гормональная стимуляция значительно снижает экспрессию мРНК АПЗ в ооцитах мыши на стадии метафазы второго деления созревания (Meng et al., 2005; Huang et al., 2006). Есть основания предполагать, что снижение экспрессии мРНК АПЗ может быть одной из причин низкой выживаемости зрелых ооцитов после замораживания (Meng et al., 2005; Huang et al., 2006).

Итак, АП исследованы в ооцитах двух видов грызунов (крыс и мышей) и в клетках гранулызы крыс. Оказалось, что хотя в ооцитах двух видов экспрессируются разные АП (АПЗ и 9), но они принадлежат к акваглицеропоринам и в процессе созревания ооцитов экспрессия соответствующих мРНК снижается (Meng et al., 2005; Huang et al., 2006) или прекращается (Ford et al., 2000). Показательно также, что из трех АП, экспрессирующихся в клетках гранулызы (АП7-9), два тоже являются акваглицеропоринами.

### СПЕРМАТОГЕНЕЗ

Механизмы поступления воды в половые клетки, находящиеся на разных стадиях сперматогенеза, изучали в семенниках человека, барана, кролика, крысы и мыши. Первое исследование было проведено на сперматозоидах человека (Liu et al., 1995). В плазматических мембранах сперматозоидов не было обнаружено экспрессии белка АП1, единственного АП, хорошо изученного к тому времени. Кроме того, оказалось, что осмотическая проницаемость сперматозоидов человека для воды не подавляется хлористой ртутью. Авторы пришли к выводу о том, что высокая проницаемость плазматических мембран сперматозоидов человека для воды обусловлена другим АП, нечувствительным к действию ртути (Liu et al., 1995). Практически одновременно были получены данные об отсутствии АП1 в плазматической мембране сперматозоидов барана, их проницаемость для воды также не подавлялась хлористой ртутью (Curry et al., 1995b). Сперматозоиды человека и барана имеют высокий коэффициент осмотической проницаемости для воды (Liu et al., 1995; Curry et al., 1995b), а сперматозоиды кролика – низкий (Curry et al., 1995a). Показав, что проницаемость сперматозоидов барана и человека (но не кролика) подавляется ингибитором транспортера глюкозы флоретинном, авторы предположили, что именно транспортер глюкозы может играть роль водного канала в сперматозоидах этих животных. В сперматозоидах кролика АП отсутствуют (Curry et al., 1995b).

Позднее в семенниках человека был обнаружен АП7 (Saito et al., 2004). Транскрипты АП7 об-

наружены в сперматозоидах из семенников и семенной жидкости человека, он экспрессируется в сперматиде и хвосте сперматозоида. Белок АП7 определяется также в средней и передней частях хвоста сперматозоидов из семенной жидкости. У некоторых стерильных (infertile) пациентов экспрессия АП7 в сперматозоидах семенной жидкости отсутствует. Подвижность спермиев, у которых АП7 не определяется, значительно ниже, чем у нормальных, но концентрация сперматозоидов в обоих случаях одинакова (Saito et al., 2004).

Участие АП в сперматогенезе наиболее подробно изучено у крысы. На разных стадиях сперматогенеза идентифицированы АП7, 8 и 9. Показано, что экспрессия мРНК АП7 и 8 в ооцитах шпорцевой лягушки приводит к значительному (в 8.5–10 раз) увеличению проницаемости ооцитов для воды (Ishibashi et al., 1997a, b). Однако проницаемость, стимулированная АП8, подавляется 0.3 мМ хлористой ртути, а стимулированная АП7 – не подавляется. Установлено, что экспрессия АП7 в ооцитах шпорцевой лягушки увеличивает их проницаемость для глицерина (в пять раз) и мочевины (в девять раз) (Ishibashi et al., 1997a). Для обоих АП определена локализация и мРНК, и белка. Показано, что транскрипты АП7 выявляются в поздних сперматидеях семявыносящих канальцев (Ishibashi et al., 1997a). Они обнаружены также в сперматозоидах из семенников и эпидидимиса (Calamita et al., 2001b).

Локализация белка АП7 в семенниках крыс описана в нескольких работах, причем данные разных авторов хорошо согласуются (Ishibashi et al., 1997a; Suzuku-Toyota et al., 1999; Calamita et al., 2001a,b). Так, АП7 выявлен в поздних сперматидеях и созревающих сперматозоидах (Ishibashi et al., 1997a; Suzuku-Toyota et al., 1999). Слабую, но определенную реакцию впервые наблюдали в цитоплазме сперматиды, позднее отчетливая реакция выявлялась в плазматической мембране. В головке и дистальной части хвоста, где удлиняющаяся сперматидея имеет совсем немного цитоплазмы, на протяжении всего сперматогенеза реакция не обнаружена. После спермидации в сперматозоидах иммунореактивность АП7 сохраняется в средней части и в цитоплазме. Полученные результаты позволяют предполагать, что АП7 участвует в уменьшении объема сперматиды, поскольку этот белок локализован на плазматической мембране, окружающей конденсирующуюся массу цитоплазмы удлиняющейся сперматиды, а жидкость семявыносящих канальцев – гипертоническая, что способствует оттоку воды (Suzuku-Toyota et al., 1999). Интенсивная экспрессия АП7 в сперматозоидах эпидидимиса позволяет предполагать, что помимо его функции в сперматогенезе этот нечувствительный к хлористой ртути АП может играть роль в созревании и хранении сперматозоидов и быть ответственным за высокую проницаемость для во-

ды, характерную для сперматозоидов млекопитающих (Calamita et al., 2001b).

В отличие от АП7, мРНК и белок которого обнаружены только на поздних стадиях сперматогенеза, экспрессия мРНК АП8 обнаружена с помощью гибридизации *in situ* на всех стадиях сперматогенеза: от первичных сперматоцитов до сперматид в семявыносящих канальцах (Ishibashi et al., 1997b; Calamita et al., 2001b). В сперматозоидах эпидидимуса мРНК АП8 не обнаружена (Calamita et al., 2001b). Иммунофлуоресцентное мечение показало, что АП8 локализован как в цитоплазме (в микросомных пузырьках), так и в плазматической мембране половых клеток на протяжении сперматогенеза. Это свидетельствует о возможности перераспределения (рециклинга) АП8 между внутриклеточными пузырьками и плазматической мембраной. Предполагается, что такое перераспределение может контролироваться гормонально. АП8 может участвовать в конденсации цитоплазмы при преобразовании сперматиды в сперматозоид и образовании жидкости семявыносящих канальцев (Calamita et al., 2001b). Бадран и Хермо (Badran, Hermo, 2002), используя метод иммунохимии, не обнаружили АП8 в половых клетках крыс. Причины такого несоответствия их результатов данным, полученным другими исследователями, неясны.

Тсукагучи с соавторами (Tsukaguchi et al., 1998) обнаружили мРНК АП9 в ранних сперматоцитах семявыносящих канальцев, но в поздних сперматоцитах она не выявлялась.

Исследования АП в сперматогенезе мышей появились лишь в самое последнее время. Речь идет только об АП8. Его локализация (мРНК и белок) в сперматогенезе мышей не отличается от таковой у крыс, он обнаружен в плазматической мембране сперматогоний, сперматоцитов и сперматид (Yang et al., 2005).

Хорошо известно, что клетки Лейдига и Сертоли играют очень существенную роль в сперматогенезе. Клетки Лейдига синтезируют и секретируют тестостерон, а клетки Сертоли выступают посредником в эндокринной регуляции сперматогенеза тестостероном и фолликулостимулирующим гормоном и выполняют немало других функций (Griswold, 1995; Payne, Youngblood, 1995; De Kretser et al., 1998). Все работы, о которых пойдет речь ниже, выполнены на крысах. В клетках Лейдига обнаружена мРНК АП9 (Tsukaguchi et al., 1998) и белок АП9, локализованный в плазматической и внутриклеточных мембранах (Elkjær et al., 2000; Badran, Hermo, 2002). Кроме того, методом иммунохимии на фиксированных в жидкости Буэна срезах с помощью светового микроскопа обнаружен специфический для хрусталика белок АП0 (Hermo et al., 2004). Играет ли этот АП в клетках Лейдига какую-то роль в сперматогенезе, неясно. Бадран и

Хермо (Badran, Hermo, 2002) высказали предположение о том, что АП9, характеризующийся, как уже отмечалось, широкой избирательностью, может играть роль в осуществлении основной функции этих клеток – секреции стероидов, однако серьезных оснований для такого предположения не приведено. В клетках Сертоли иммуноцитохимически обнаружены АП0 (Hermo et al., 2004) и АП8 (Tani et al., 2001; Badran, Hermo, 2002). Их функция в этих клетках тоже неясна. Предполагается, что АП8 принимает участие в секреции жидкости для заполнения каналов, транспортирующих сперматозоиды.

Данные о локализации АП7 в сперматогенезе крысы (Suzuku-Toyota et al., 1999; Calamita et al., 2001a,b) и человека (Saito et al., 2004), полученные разными исследователями, хорошо совпадают. Локализация АП8 оказалась сходной в сперматогенезе крысы (Ishibashi et al., 1997b; Calamita et al., 2001a,b) и мыши (Yang et al., 2005). Однако в семенниках человека АП8 не обнаружен (Koyama et al., 1998). В связи с этим интересно отметить, что у нокаутных мышей, лишенных гена АП8, не выявлено нарушений морфологии сперматозоидов, их количества и оплодотворяющей способности (Yang et al., 2005). Авторы предполагают, что такой эффект обусловлен высокой эффективностью и многократным дублированием механизмов, обеспечивающих созревание сперматозоидов. Он может объясняться также компенсаторными изменениями в экспрессии других АП (Huang et al., 2006).

Итак, одна из существенных черт морфологических изменений половых клеток в процессе сперматогенеза – уменьшение их объема – в значительной степени определяется выходом из клетки воды, который обеспечивают АП. В сперматогенезе обнаружены АП7 (у человека и крысы) и АП8 (у крысы и мыши). Кроме того, АП7 участвует в поддержании подвижности и оплодотворяющей способности сперматозоидов.

Исследования возможной роли АП в гаметогенезе позвоночных животных только начались. Они обнаружены у некоторых видов амфибий, рыб и млекопитающих на разных стадиях гаметогенеза в половых (АП3,7,8, 9, АПх10 и SaAQP10) и в соматических (АП0, 7, 8, 9) клетках, играющих существенную роль в оо- и сперматогенезе. В одних случаях (оводнение ооцитов костистых рыб, откладывающих пелагическую икру, и образование антральной полости в фолликулах млекопитающих) предположение об участии АП более обосновано экспериментально, в большинстве других – требует дальнейшей проверки. Остается непонятным, например, почему проницаемость для воды ооцитов песочной жабы высокая, а ооцитов шпорцевой лягушки – низкая, сперматозоидов человека и барана высокая, а сперматозоидов кролика – низкая. Другими словами, почему в клетках, выполняющих

сходную функцию, в одних случаях, по-видимому, экспрессируется много АП, а в других мало. Случайно ли большинство АП в оо- и сперматогенезе принадлежат к акваглицеропоринам? Можно ли на этом основании предполагать, что заметную роль в гаметогенезе позвоночных играет транспорт мелких нейтральных молекул. Пока мы знаем слишком мало, чтобы ответить на подобные вопросы. Однако, судя по интенсивности исследований в этой области, ответы на многие вопросы будут скоро получены.

*Автор выражает глубокую признательность Б.Ф. Гончарову и А.А. Минину за ценные замечания при подготовке статьи.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Agre P. The aquaporin water channels // Proc. Am. Thorac. Soc. 2006. V. 3. P. 5–11.
- Agre P., King L.S., Yasui M. et al. Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine // J. Physiol. 2002. V. 542. № 1. P. 3–16.
- Badran H.H., Hermo L.S. Expression and regulation of aquaporins 1, 8 and 9 in the testis, efferent ducts and epididymis of adult rats and during postnatal development // J. Androl. 2002. V. 23. P. 358–373.
- Beitz E., Wu B., Holm L. M. et al. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons // Proc. Natl. Acad. Sci. 2006. V. 103. № 2. P. 269–274.
- Bobe J., Montfort J., Nguyen T. et al. Identification of new participants in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocyte maturation and ovulation processes using cDNA microarrays // Reprod. Biol. Endocrinol. 2006. V. 4. P. 39–55.
- Calamita G., Mazzone A., Bizzoca A. et al. Possible involvement of aquaporin-7 and -8 in rat testis development and spermatogenesis // Biopchem. Biohys. Res. Comm. 2001a. V. 288. № 3. P. 619–625.
- Calamita G., Mazzone A., Cho Y.S. et al. Expression and localization of the aquaporin-8 water channel in rat testis // Biol. Reprod. 2001b. V. 64. P. 1660–1666.
- Capurro C., Ford P., Ibarra C. et al. Water permeability properties of the ovarian oocytes from *Bufo arenarum* and *Xenopus laevis*: a comparative study // J. Membr. Biol. 1994. V. 138. № 2. P. 151–157.
- Craik J.C., Harvey S.M. The causes of buoyancy in egg of marine teleosts // J. Mar. Biol. Assoc. 1987. V. 67. P. 169–182.
- Curry M.R., Millar J.D., Watson P.F. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa // Criobiology. 1995a. V. 32. P. 175–181.
- Curry M.R., Millar J.D., Watson P.F. The presence of water channel proteins in ram and human sperm membranes // J. Reprod. Fertil. 1995b. V. 104. № 2. P. 297–303.
- Dadoune J.P. The cellular biology of mammalian spermatozoa: a review // Bull. Assoc. Anat. (Nancy). 1994. V. 78. P. 33–40.
- De Kretser D.M., Loveland K.L., Meinhardt A. et al. Spermatogenesis // Hum. Reprod. 1998. Suppl. 1. P. 1–8.
- Detmers F.J. M., de Groot B.L., Muller E.M. et al. Quaternary ammonium compounds as water channel blockers: Specificity, potency and site of action // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 2. P. 14207–14214.
- Edashige K., Sakamoto M., Kasai M. Expression of mRNAs of the aquaporin family in mouse oocytes and embryos // Cryobiology. 2000. V. 40. № 2. P. 171–175.
- Edashige K., Yamaji Y., Kleinhans F.W. et al. Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation // Biol. Reprod. 2003. V. 68. P. 87–94.
- Edashige K., Tanaka M., Ichimaru N. et al. Channel-dependent permeation of water and glycerol in mouse morulae // Ibid. 2006. V. 74. P. 625–632.
- Elkjaer M.L., Vajda Z., Nejsum L.N. et al. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2000. V. 276. № 3. P. 1118–1128.
- Fabra M., Raldúa D., Power D.M. et al. Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated // Science. 2005. V. 307. № 5709. P. 545.
- Fabra M., Raldúa D., Bozzo M.G. et al. Yolk proteolysis and aquaporin-10 play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption // Devel. Biol. 2006. V. 295. № 1. P. 250–262.
- Finn R.N., Ostby G.C., Norberg B. et al. In vivo oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*); proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx // J. Exp. Biol. 2002. V. 205. Pt. 2. P. 211–224.
- Ford P., Merot J., Jawerbaum A. et al. Water permeability in rat oocytes at different maturity stages: aquaporin-9 expression // J. Membr. Biol. 2000. V. 176. № 2. P. 151–158.
- Greely M.S., Calder D.R., Wallace R.A. Changes in teleost yolk proteins during oocyte maturation: correlation of yolk proteolysis with oocyte hydration // Comp. Biochem. Physiol. 1986. V. 84B. P. 1–9.
- Greely M.S., Hols H., Wallace R.A. Changes in size, hydration and low molecular weight osmotic effectors during meiotic maturation of *Fundulus* oocytes in vivo // Ibid. 1991. V. 100A. P. 639–647.
- Griswold M.D. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis // Biol. Reprod. 1995. V. 52. P. 211–216.
- Hermo L., Krzczunowicz D., Ruz R. Cell specificity of aquaporin 0, 3 and 10 expressed in the testis, efferent ducts and epididymis of adult rats // J. Androl. 2004. V. 25. P. 494–505.
- Hirshfield A.N. Development of follicles in the mammalian ovary // Int. Rev. Cytol. 1991. V. 124. P. 43–101.
- Hirose K. Endocrine control of ovulation in mrdaka (*Oryzias latipes*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*) // J. Fish. Res. Bd. Can. 1976. V. 33. P. 989–994.
- Huang H.F., He R.H., Sun C.C. et al. Function of aquaporins in female and male reproductive systems // Hum. Reprod. Update. 2006. V. 12. № 6. P. 785–795.
- Ishibashi K., Kuwahara M., Gu Y. et al. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea // J. Biol. Chem. 1997a. V. 272. № 33. P. 20782–20786.

- Ishibashi K., Kuwahara M., Kageyama Y. et al.* Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997b. V. 237. № 3. P. 714–718.
- Koyama Y., Ishibashi K., Kuwahara Y. et al.* Cloning and functional expression of human aquaporin-8 cDNA and analysis of its gene // *Genomics.* 1998. V. 54. P. 169–172.
- Liu C., Gao D., Preston G.M. et al.* High water permeability of human spermatozoa is mercury-resistant and not mediated by CHIP28 // *Biol. Reprod.* 1995. V. 52. № 4. P. 913–919.
- McConnell N.A., Yunus R.S., Gross S.A. et al.* Water permeability of an ovarian antral follicle is predominantly transcellular and mediated by aquaporins // *Endocrinology.* 2002. V. 143. № 8. P. 2905–2912.
- McPherson R., Greeley M.S., Wallace R.A.* The influence of yolk protein proteolysis on hydration in oocytes of *Fundulus heteroclitus* // *Devel. Growth Differ.* 1989. V. 31. № 5. P. 475–483.
- Meng Q.X., Xu C.M., Cai J. et al.* Controlled ovarian hyperstimulation significantly decreases the expression of aquaporin-3 in mouse oocytes using semi-quantitative real-time PCR analysis // *Acta Anat. Sin.* 2005. V. 36. P. 381–385 (цит. по: Huang et al., 2006).
- Milla S., Jalabert B., Rime H. et al.* Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and *in vitro* regulation by 17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol // *J. Exp. Biol.* 2006. V. 209. Pt. 6. P. 1147–1156.
- Payne A.H., Youngblood G.L.* Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells // *Biol. Reprod.* 1995. V. 52. P. 217–225.
- Saito K., Kageyama Y., Okada Y. et al.* Localization of aquaporin-7 in human testis and ejaculated sperm: possible involvement in maintenance of sperm quality // *J. Urol.* 2004. V. 172. Pt. 1. P. 2073–2076.
- Schreiber R., Greger R., Nitschke R. et al.* Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates water conductance in *Xenopus* oocytes // *Pflügers Arch. Europ. J. Physiol.* 1997. V. 434. № 6. P. 841–847.
- Schreiber R., Pavenstadt H., Greger R. et al.* Aquaporin 3 cloned from *Xenopus laevis* is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator // *FEBS Lett.* 2000. V. 475. № 3. P. 291–295.
- Suzuku-Toyota F., Ishibashi K., Yuasa S.* Immunohistochemical localization of a water channel, aquaporin 7 (AQP7), in the rat testis // *Cell Tis. Res.* 1999. V. 295. № 2. P. 279–285.
- Tani T., Koyama Y., Nihei K. et al.* Immunolocalization of aquaporin-8 in rat digestive organs and testis // *Arch. Histol. Cytol.* 2001. V. 64. № 2. P. 159–168.
- Tsakaguchi H., Shayakul C., Berger U.V. et al.* Molecular characterization of a broad sensitivity neutral solute channel // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 24737–24743.
- Virkki L.V., Franke C., Somieski P. et al.* Cloning and functional characterization of a novel aquaporin from *Xenopus laevis* oocytes // *Ibid.* V. 277. № 43. P. 40610–40616.
- Wallace R.A., Selman K.* Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. I. Preliminary observations on oocyte maturation *in vivo* and *in vitro* // *Devel. Biol.* 1978. V. 62. P. 354–369.
- Wallace R.A., Greeley M.S., Jr., McPherson R.* Analytical and experimental studies on the relationship between Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and water uptake during volume increases associated with *Fundulus* oocyte maturation *in vitro* // *J. Comp. Physiol. [B]*. 1992. V. 162. № 3. P. 241–248.
- Yang B., Song Y., Zhao D. et al.* Phenotype analysis of aquaporin-8 null mice // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005. V. 288. P. C1161–1170.

## Aquaporins in Gametogenesis of Vertebrate Animals

M. N. Skoblina

*Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119991 Russia*

*E-mail: skoblina38@mail.ru*

**Abstract**—A review of the data on the presence, localization, and supposed role of aquaporin water channels in oocytes of *Xenopus laevis*, oogenesis and maturation of teleosts *Sparus auratus* and *Oncorhynchus mykiss*, oogenesis and oocyte maturation of rats and mice, and spermatogenesis of several mammals.

**Key words:** aquaporins, aquaglyceroporins, oogenesis, oocyte maturation, oocyte hydration, antrum, granulosa cells, spermatogenesis, spermatocyte, spermatid, spermatozoon, mercurous chloride.