

## Роль природних ретиноїдів у формуванні серцево-судинної системи птахів

К. В. Костецька, І. Є. Костецький, М. Г. Зіле<sup>1</sup>

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна  
E-mail: igork@imb.org.ua

<sup>1</sup> Мічиганський Державний Університет  
234 FSHN будинок, Іст Лансинг, МІ 48824, США

*Модель ретиноїдного нокауту використано для перевірки біологічної активності деяких природних ретиноїдів під час ембріонального розвитку серцево-судинної системи. Показано, що all-trans-, 9-cis-, 4-оксо- та дидегідро-ретиноева кислоти, а також all-trans-ретинол здатні самостійно підтримувати її нормальний розвиток. Дефіцитні за вітаміном А ембріони розвивалися нормально лише за умови, якщо ретиноїди додавали на ранніх етапах ембріогенезу, не пізніше формування п'ятого соміту. Дефіцит вітаміну А протягом ембріонального розвитку суттєво знижує рівень експресії рецептора ретиноевої кислоти RAR $\beta$  як у серці, так і в центральній нервовій системі. Всі використані нами ретиноїди індують експресію RAR $\beta$  у вітамін А-дефіцитних ембріонів куріпок в тих же ембріональних структурах, що і в нормальних ембріонів, але на різному рівні. Таким чином, наші дані вказують на цілковиту залежність раннього ембріогенезу птахів від наявності відповідних ретиноїдів, а також їхніх рецепторів.*

*Ключові слова: серцево-судинна система, ретиноїди, дефіцит вітаміну А, рецептор ретиноевої кислоти, ранній ембріогенез.*

Вступ. Вітамін А відіграє важливу роль в ембріогенезі під час росту та диференціації. До основних подій, які регулюються ретиноїдами, належать поділ тіла на передню і задню частини та утворення усіх кінцівок [1, 2], розвиток центральної нервової системи [3, 4], м'язів, хрящів [5] і серцево-судинної системи (ССС) [6—8], яка формується однією з перших в ембріогенезі. Надмірна концентрація активних ретиноїдів, а також дефіцит вітаміну А викликають серйозні порушення розвитку серця. Серед останніх варто відзначити закриті судини серця, відсутність омфало-мезенхімних вен та екстраембріональної системи кровообігу [9, 10]. До вітамін А-дефіцитного фенотипу належать також *cardia bifida* — подвоєння серця [9] та *situs inversus* — розташування серця з протилежного боку

стосовно норми [11]. У щурів дефіцит ретиноїдів призводить до аномалій розвитку дуги аорти і міжшлункової перетинки у ембріонів [7] та новонароджених тварин [12].

Надлишок ретиноїдів (локальна обробка передсерцевої зони ретиноевою кислотою) також спричинює вади розвитку ССС, зокрема, переривається формування серцево-судинного півмісяця та утворюється гроноподібне подвійне серце, *cardia bifida* [12]. Ці дослідження підтверджують важливу роль ретиноїдів у формуванні серця, а також вказують на чутливість ранніх стадій ембріогенезу до надлишку чи дефіциту ретиноїдів. У зв'язку з цим беззаперечним стає факт існування точного механізму регуляції розподілу ретиноїдів та їхнього метаболізму упродовж раннього ембріогенезу.

All-trans-ретиноева кислота (at-RA) вважається активною формою вітаміну А [13], вона є

лігандом рецепторів ретиноевої кислоти (RARs), які здатні до транлокації у ядро і виконують функції факторів транскрипції. Окрім *at-RA*, виявлено ще декілька фізіологічних ретиноїдів, що впливають на ембріональний розвиток. Так, у зачатках кінцівок курячого ембріона знайдено дидегідро-ретиноеву кислоту (*dd-RA*) [14]. Основними метаболітами ретинолу у ембріонів *Xenopus* є 4-оксо-*RA*, 9-*cis-RA* і *at-RA* [15, 16]. Дуже збагаченим ретиноїдами є Гензенський вузлик (Hensen's node) на пресомітній стадії розвитку пташиних ембріонів, у якому відбувається метаболізм ретинолу до ретиноевої кислоти [17]. Нами показано, що під час нейруляції ембріон куріпок має фізіологічну кількість *at-RA* і *dd-RA*, а також містить ретинол і ретиналь, які є безпосередніми попередниками біологічно активних кислот, та ефіри ретинолу, причетні до накопичення і зберігання вітаміну А [18]. Ці дослідження підтверджують той факт, що ранні пташині ембріони здатні повністю контролювати метаболізм і функцію вітаміну А.

Загально визнаним є свідчення стосовно того, що ретиноїди проявляють свою біологічну активність через відповідні рецептори, RAR або RXR (ретиноїд X рецептор) [19]. Ці рецептори після зв'язування відповідного ретиноїду переміщуються у клітинне ядро, де й виконують роль факторів транскрипції. На сьогодні відомо більше 200 генів, функція яких контролюється ретиноїдами. Тому можна очікувати, що ретиноїди та їхні рецептори відіграють важливу роль під час раннього розвитку хребетних, у тому числі кардіогенезу [20]. Ця думка отримала підтримку при дослідженні фенотипу нокаутних за *RAR* та *RXR* генами мишей; у цих мишей виявлено аномалії, серед яких порушення розвитку ССС, характерні для вітаміну А-дефіцитного фенотипу [21].

Таким чином, експресія ретиноевих рецепторів в потрібній тканині у відповідний час є важливим чинником передачі сигналу від ретиноїдів протягом ембріогенезу. На жаль, інформація про розповсюдження ретиноевих рецепторів на стадії раннього ембріогенезу є досить обмеженою. У мишей віком від 7,5 до 8,5 днів *RAR $\alpha$*  і *RAR $\gamma$*  експресуються в усіх тканинах [22], у той же час експресія *RAR $\beta$*  обмежена латеральною мезодермою та нейроепітелієм. Подібну локалізацію *RAR $\beta$*  мРНК показано для ембріонів курей [7] і куріпок [23]. Враховуючи те, що ген *RAR $\beta$*  містить регуляторний елемент, який контролюється ретиноїдами [24], рівень експресії цього гена значно залежить від наявності ретиноїдів у тканинах ембріона. Зниження експресії *RAR $\beta$*  в зоні формування серця у вітаміну А-дефіцитних ембріонів [23] вказує на безумовну причетність згаданого гена до кардіогенезу.

Важливі докази необхідності ретиноїдів для раннього ембріогенезу, зокрема, для розвитку ССС отримано нами при використанні дефіцитних за вітаміном А ембріонів куріпок. У зв'язку з цим перевірено широкий спектр натуральних ретиноїдів і всі вони виявили біологічну активність та здатність компенсувати відсутність вітаміну А під час ранніх етапів ембріонального розвитку. Ці дані підтверджують припущення стосовно того, що ретиноеві рецептори можуть компенсувати відсутність натуральних лігандів, використовуючи інші форми ретиноїдів. Не можна також знехтувати взаємоконверсією ретиноїдів у тканинах ембріона, яка призводить до появи фізіологічних концентрацій необхідних лігандів.

**Матеріали і методи. Модель досліджень.** Для вивчення ролі ретиноїдів під час раннього ембріогенезу птахів використано дефіцитну за вітаміном А модель куріпок, створену, як описано в [10]. Суть її полягає в тому, що куріпок годували штучною їжею, яка не мала жодних ретиноїдів, окрім 13-*cis*-ретиноевої кислоти (13-*cis-RA*). Ця кислота є похідним вітаміну А і здатна повністю підтримувати життєдіяльність організму, у тому числі репродуктивну функцію. Але, на відміну від вітаміну А, 13-*cis-RA* не може проходити плацентарний бар'єр і відповідно накопичуватися у жовтку яйця [18]. Крім того, ретиноеві кислоти не відновлюються *in vivo* до ретинолу. Таким чином, куріпки, яких годували подібною дієтою, несуть вітаміну А-дефіцитні яйця. Ембріони, що розвиваються з цих яєць, також є вітаміну А-дефіцитними. Яйця збирали щоденно і зберігали при температурі 13 °С не більше 7 днів перед застосуванням.

**Ретиноїди.** В експериментах використано вітаміну А (ретинол) та його біологічно активні похідні (ретиноеві кислоти). All-trans-ретинол (*at-ROH*) і *at-RA* отримано від фірми «Sigma» (США); 13-*cis-RA* — від «Hoffman-LaRoche» (США); 4-оксо- і 3,4-*dd-RA* надано д-ром А. Баруа (Ун-т штату Айова), 9-*cis-RA* — д-ром Дж. Гріппо (США). Перед використанням чистоту ретиноїдів перевіряли за допомогою хроматографії (ВЖХ) та УФ-спектроскопії. Для запобігання ізомеризації ретиноїдів усі процедури здійснювали при жовтому світлі.

*Введення ретиноїдів in ovo.* Яйця, розміщені в інкубаторі горизонтально, інкубували при температурі 38,5 °С і відносній вологості 98 % протягом 20—26 год. Відкривання яєць та ін'єкцію ретиноїдів проводили згідно з рекомендаціями [25]. Суміш для ін'єкції складалася з таких компонентів: 5 %-й розчин китайських чорнил (Pelikan fount India ink) у фосфатному буфері, 10 %-й гомогенат вітамін А-дефіцитних яєць і 10 нг відповідного ретиноїду. Така концентрація ретиноїдів має високу біологічну активність з незначним тератогенним ефектом. 10 мкл цієї суміші вводили мікрошприцем під бластодерму. Таким чином створювали напівпрозорий фон чорного кольору, який дозволяв визначати морфологічні особливості розвитку ембріонів та стадію їхнього розвитку без додаткового забарвлення. Далі яйця закривали і продовжували їхню інкубацію додатково ще 6—48 год.

*Морфологічні критерії оцінки розвитку ембріонів.* Стадію ембріонального розвитку визначали згідно з критеріями, запропонованими в [4]. Таким чином, сьома стадія ембріонального розвитку птахів відповідає появі першого соміту, на восьмій стадії з'являються ембріони зі сформованими 2—4 сомітами, ембріони дев'ятої стадії мають 5—8 сомітів. Соміти — це первинні сегменти тіла, продукт розділення мезодерми у ембріона, що розвивається.

Після 72 год інкубації ми використовували такі параметри для оцінки розвитку ембріонів: форма і розміри серця, наявність зовнішньої системи кровообігу і циркуляції крові, кількість і розміри сомітів, форма і ступінь загибу голови, рівень розвитку центральної нервової системи. Повернення до нормального стану вітамін А-дефіцитних ембріонів після інкубації їх з ретиноїдами оцінювали, порівнюючи морфологічні ознаки таких ембріонів з відповідними ознаками нормальних, а також вітамін А-дефіцитних ембріонів, що розвивалися за відсутності ретиноїдів. Поверненням до норми вважався ембріон, який мав усі характеристики нормального розвитку. Морфологічні зміни у ембріонів, які є результатом розвитку при відсутності вітаміну А, оцінювали окремо від порушень ембріонального розвитку, спричинених тератогенною дією ретиноїдів чи пов'язаних з *in vitro* маніпуляціями. До останніх ми відносили диспропорційний розвиток окремих частин тіла, втрату або аномалії у розвитку серця, сомітів і центральної нервової системи, які відрізняються від вітамін А-дефіцитного фенотипу.

*Гібридизація in situ.* Вітамін А-дефіцитним ембріонам на сьомій стадії ембріонального розвитку вводили відповідний ретиноїд і продовжували інкубацію яєць. Через 6 год ембріони досягали стадії 8+ розвитку, їх вилучали з екстраембріональної мембрани, промивали холодним фосфатним буфером і фіксували у 4 %-му параформальдегіді протягом ночі при 4 °С. Після дегідратації у збільшуваній концентрації метанолу ембріони використовували для аналізу або зберігали при температурі -20 °С.

Гібридизацію *in situ* проводили із застосуванням цілих ембріонів, як описано раніше [23]. Ембріони промивали розчином PBS/0,1 % твін-20, потім — 6 %-м розчином перекису водню, далі обробляли протеїназою K, фіксували у розчині 4 %-й параформальдегід/0,2 %-й глутаровий альдегід і гібридизували з міченою діоксигеніном пробою при температурі 65 °С протягом ночі. Сенс- і антисенс-рибопроби синтезували з використанням відповідного фрагмента кДНК курячого  $RAR\beta_2$  (nt 1—202) [27]. Далі ембріони відмивали у розчині 0,5 % SSC/1 % SDS (70 °С) і інкубували з антидіоксигеніновими антитілами, з'єднаними з луговою фосфатазою. Після інтенсивного промивання у PBS ембріони фарбували відповідним субстратом (nitroblue tetrazolium і X-phosphate) і фотografування на стереомікроскопі.

*Результати і обговорення. Вплив ретиноїдів на розвиток ССС птахів.* Дефіцит вітаміну А під час раннього ембріогенезу птахів спричинює появу цілої низки серйозних аномалій. Після 72 год інкубації нормальний ембріон має такі основні характеристики: U-подібна форма серця, яке з'єднане з судинами зовнішнього кровообігу, наявність циркуляції крові, голова загнута у напрямку тіла, закінчений поворот тіла (рис. 1, а). На відміну від нормальних серце вітамін А-дефіцитних ембріонів має кулькоподібну форму збільшених розмірів; воно зачинене у місці венозного синусу і не з'єднується з судинами зовнішнього кровообігу і в приблизно 75 % випадків знаходиться з протилежного боку (*situs inversus*). У них також спостерігається порушення розвитку центральної нервової системи, деформована форма голови, зменшена кількість сомітів, затриманий у цілому ембріогенез (рис. 1, б). Таким чином, ембріональний розвиток птахів знаходиться під цілковитим контролем вітаміну А. Мета наших досліджень полягала у вивченні здатності екзогенних ретиноїдів відновлювати нормальний розвиток у таких ембріонів.

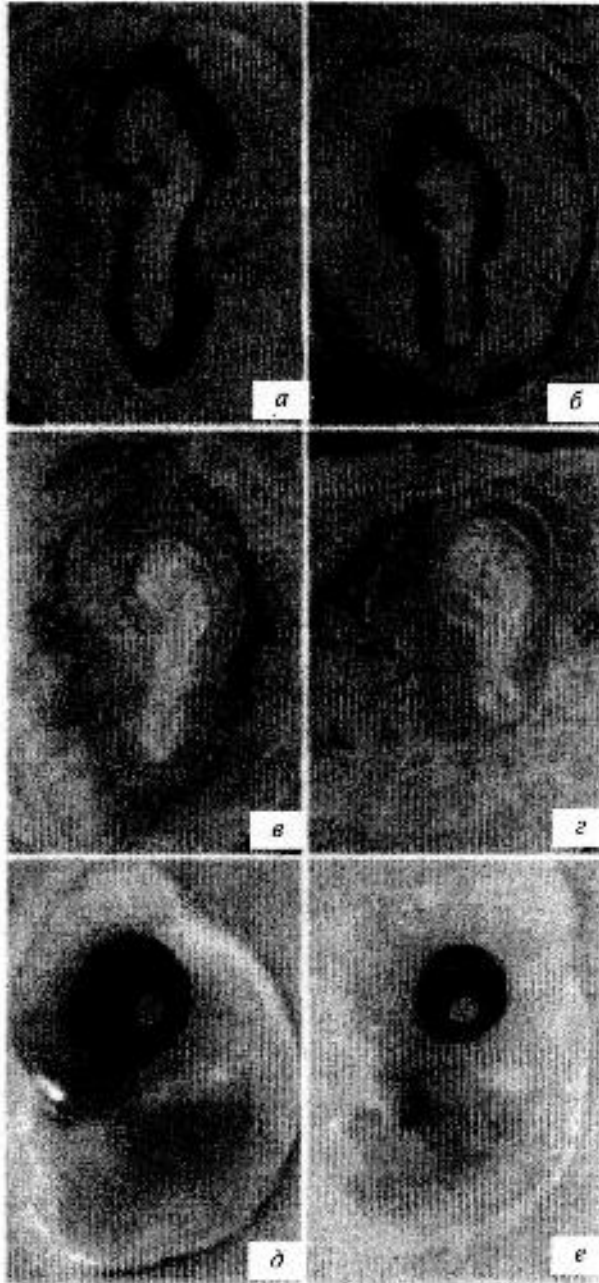


Рис. 1. Ембріони куріпок на 3-й і 6-й день розвитку *in ovo*: а, д — нормальні ембріони після 3 і 6 днів розвитку відповідно; б — вітамін А-дефіцитний ембріон після 3 днів розвитку; в, з, е — вітамін А-дефіцитні ембріони після ін'єкції *at-ROH* (в, е) і *at-RA* (з) на 3-й (в, з) та 6-й (е) дні розвитку. Стрілки вказують на нормальну судинну систему

Нами показано, що введення 10 нг ретиноїду на один ембріон є найефективнішим для нормалізації вітамін А-дефіцитного фенотипу і має мінімальний тератогенний ефект для всіх досліджуваних ретиноїдів. Ін'єкція 1 нг ретиноїдів мала мінімальний біологічний ефект (даних не наведе-

но) і була вилучена з подальшого аналізу. При використанні 100 нг ретиноїду на ембріон спостерігалось зростання ембріональних аномалій, відмінних від вітамін А-дефіцитного фенотипу, при цьому ефективність нормалізації вітамін А-дефіцитного фенотипу зменшувалась у переважній кількості ретиноїдів.

Таким чином, усі подальші дослідження виконували з використанням 10 нг ретиноїдів для ін'єкції. Біологічна активність ретинолу при цьому була схожою з такою дидегідроретиноевої кислоти (рис. 2), його основного метаболіту. Це свідчить про присутність у вітамін А-дефіцитних ембріонах ферментів, здатних метаболізувати вітамін А до його активних компонентів. На відміну від *at-RA* і *dd-RA*, які містяться у нормальних пташиних ембріонах на ранніх стадіях ембріогенезу [18], 4-оксо-*RA* і 9-*cis-RA* за норми у цей період розвитку відсутні. Незважаючи на це, ефективність нормалізації вітамін А-дефіцитного фенотипу після введення 4-оксо-*RA* і 9-*cis-RA* несуттєво відрізняється від ефективності, пов'язаної з ін'єкцією інших метаболітів вітаміну А (рис. 2). Останнє засвідчує, що в умовах дефіциту природних лігандів ретиноеві рецептори здатні використовувати інші форми ретиноїдів і при цьому ефективно функціонувати.

Не виключена також можливість конверсії 9-*cis-RA* в іншу її ізоформу, *at-RA*. Що ж стосується 4-оксо-*RA*, то ймовірність метаболізму її до *at-RA* форми здається незначною через відсутність відповідних ферментних систем.

Вітамін А-дефіцитним ембріонам, обробленим ретинолом, надали можливість розвиватися до 6 днів (рис. 1, д, е), а обробленим кислотами, — до стадії 2 або 3 днів інкубації (рис. 1, в, з). Серед нормалізованих ембріонів ми не зустрічали таких, які б відрізнялися за морфологічними ознаками після інкубування. На відміну від ретиноевих кислот, ретинол може довше підтримувати нормальний розвиток вітамін А-дефіцитних ембріонів. Це можна пояснювати тим, що після ін'єкції частина ретинолу окислюється до активних метаболітів, а решта перетворюється в ефіри ретинолу, які зберігаються у клітині і при потребі метаболізуються. У той же час ретиноева кислота (усі відомі форми) не здатна відновлюватися до ретинолу. Тому одразу ж після ін'єкції вона функціонує з високою ефективністю, оскільки є активною формою вітаміну А, а далі ця активність знижується внаслідок дегра-

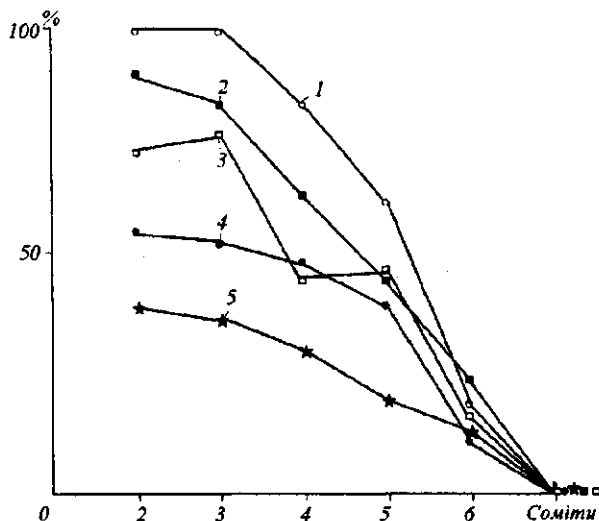


Рис. 2. Біологічна активність природних ретиноїдів, оцінена за їхньою здатністю підтримувати нормальний розвиток вітамін А-дефіцитних ембріонів: 1 — at-ROH; 2 — dd-RA; 3 — 9-cis-RA; 4 — at-RA; 5 — 4-оксо-RA; (по осі y — ембріони з нормальним розвитком серцево-судинної системи; по осі x — стадія ембріонального розвитку при ін'єкції)

дації кислоти. Через деякий час концентрація ретиноевої кислоти падає нижче фізіологічного рівня, за рахунок чого ембріони знову опиняються у середовищі, дефіцитному за вітаміном А, і зупиняють нормальний розвиток.

Біологічна активність ретиноїдів (здатність забезпечувати розвиток вітамін А-дефіцитних ембріонів) залежала від стадії ембріонального розвитку, на якій здійснювали ін'єкцію ретиноїдів. Так, at-ROH виявив найвищу біологічну активність з мінімальним тератогенним ефектом за умови, якщо його вводили на стадії 2—3 сомітів (рис. 2). На стадії 4—5 сомітів активність at-ROH починає знижуватися і різко падає, якщо його вводили на пізніших стадіях ембріонального розвитку. Дія ретиноевих кислот на стадії 2—3 сомітів дещо відрізнялася між собою, але в цілому їхня біологічна активність була нижчою, ніж у ретинолу (рис. 2). Це пояснюється вищим порівняно з ретинолом рівнем аномалій ембріонального розвитку.

Очевидно, ранні пташині ембріони є дуже чутливими до рівня концентрації і типу присутніх ретиноїдів. Тому надлишок ретиноевої кислоти і викликає тератогенну дію. У той же час метаболізм ретинолу на цих стадіях знаходиться під контролем ферментних систем ембріона [22], що виключає появу надлишку біологічно активних ретиноїдів і можливість тератогенної дії. На відміну від ретино-

лу, біологічна активність кислот несуттєво змінюється на стадії 2—5 сомітів, а на стадії 6 сомітів їхня активність також зменшується і практично не відрізняється від ретинолу. Жоден з ретиноїдів не був здатний врятувати вітамін А-дефіцитний фенотип, якщо його вводили на стадії 7 сомітів або пізніше.

Ці дані свідчать про існування вітамін А-залежного етапу ембріонального розвитку, який збігається з формуванням п'ятого соміту у ембріонів. Висока біологічна активність ретинолу на цій стадії, яка відповідає активності його природних метаболітів, засвідчує високу швидкість перетворення ретинолу у його біологічно активні форми.

Таким чином, усі перевірені нами природні ретиноїди здатні повністю нормалізувати розвиток вітамін А-дефіцитних ембріонів за умови, якщо ці ретиноїди привносилися не пізніше стадії утворення п'ятого соміту у ембріонів. Згадана стадія є критичною для формування серця і центральної нервової системи. Зокрема, на ній починається формування серцевої трубки за рахунок злиття пари серцевих зачатків, а також завершується закривання нервової трубки. Отже, стадія ембріонального розвитку, яка відповідає стадії утворення п'ятого соміту у пташиних ембріонів, є ретиноїд-залежним періодом ембріогенезу. Нормальний ембріогенез після цієї стадії можливий лише за наявності біологічно активних ретиноїдів та їхніх рецепторів.

*Індукція ретиноїдами експресії  $RAR\beta_2$ .* На молекулярному рівні біологічну активність ретиноїдів порівнювали, аналізуючи їхню здатність до регуляції експресії генів. Наявність *RARE* (retinoic acid response element) у промоторі *RAR\beta\_2* робить цей ген першим кандидатом для подібного аналізу. Експресію *RAR\beta\_2* у нормальних, вітамін А-дефіцитних та індукованих ембріонів вивчали на стадії 4—5 сомітів за допомогою гібридизації *in situ* цілих ембріонів.

Рецептори ретиноевої кислоти (*RARs* і *RXRs*) активно експресуються в ранніх ембріонах птахів [23, 28]. Зокрема, на стадії первинного формування серця (1—8 сомітів) *RAR\beta\_2* локалізується у нейроепітелії, передсерцевому полі, сомітах і латеральній мезодермі (рис. 3, б). Дефіцит вітаміну А призводить до практично повної відсутності експресії *RAR\beta\_2* у цих структурах (рис. 3, а). Ін'єкція ретиноїдів на ранніх стадіях ембріогенезу спричинює швидку індукцію експресії цього гена, детекція

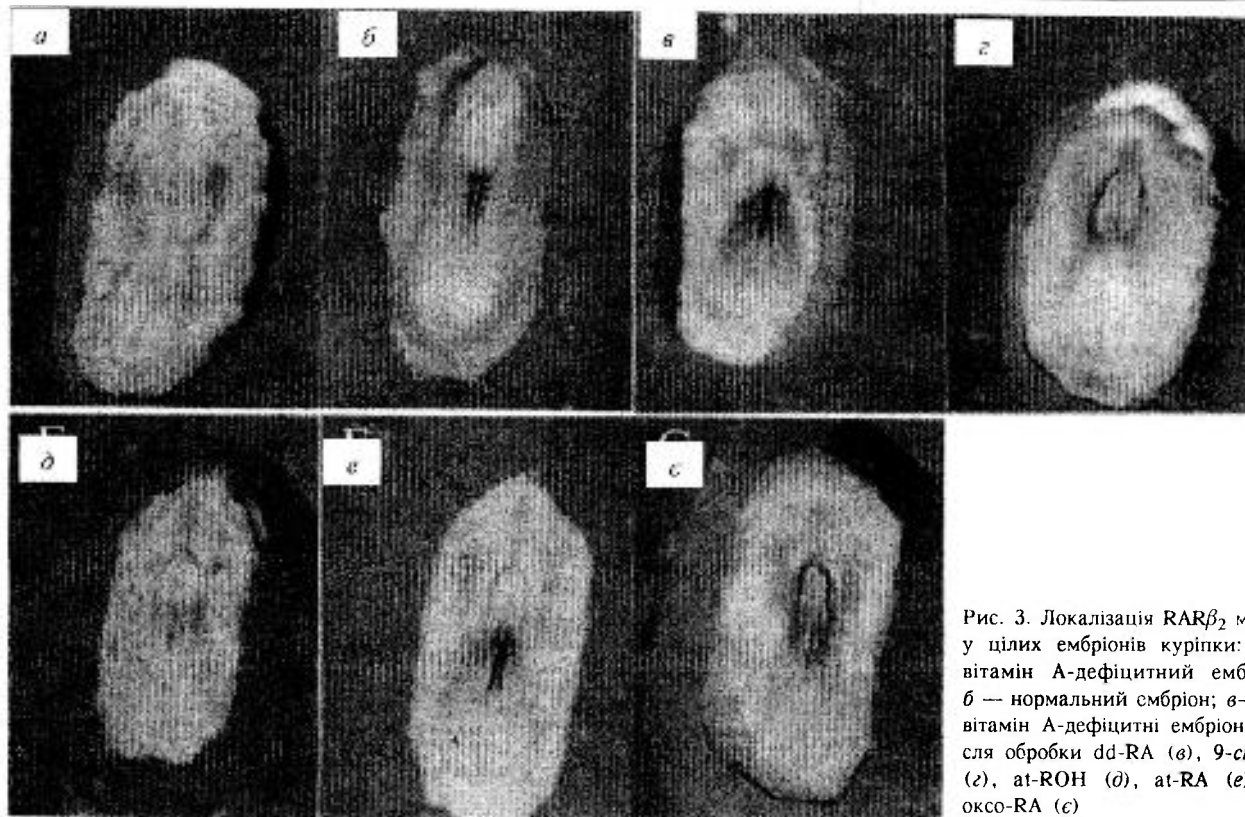


Рис. 3. Локалізація  $RAR\beta_2$  мРНК у цілих ембріонів куріпки: а — вітамін А-дефіцитний ембріон; б — нормальний ембріон; в–г — вітамін А-дефіцитні ембріони після обробки dd-RA (в), 9-*cis*-RA (г), at-RA (д), at-RA (е), 4-оксо-RA (г)

$RAR\beta_2$  мРНК можлива вже через 5 год після введення відповідного ретиноїду. При цьому різні ретиноїди неоднаково впливають на рівень експресії і локалізацію  $RAR\beta_2$  мРНК. Зокрема, введення ембріонам at-RA та dd-RA на стадії формування 1-го соміту призводить до відновлення експресії  $RAR\beta_2$  в усіх структурах, де цей ген у нормі експресується (рис. 3, в, е). При цьому рівень експресії  $RAR\beta_2$  мРНК в індукованих ембріонів був близьким до норми, підвищення експресії спостерігалось лише в латеральній мезодермі у ембріонів, оброблених dd-RA (рис. 3, в). У той же час обробка ембріонів 9-*cis*-RA і 4-оксо-RA призводила до надлишкової експресії  $RAR\beta_2$  мРНК у передсерцевій зоні (рис. 3, г, е), зате експресія цього гена в нейроепітелії та сомітах індукованих ембріонів була значно нижчою, ніж у нормальних.

Наведені дані підтримують ідею стосовно того, що різні за походженням і структурою ретиноїди виконують різні функції у клітині. Це може бути пов'язано з коливаннями в афінності використаних нами ретиноїдів до різних типів ретиноевих рецепторів [29]. Зокрема, 9-*cis*-RA з високою ефективністю зв'язується як з RAR, так і з RXR

рецепторами і індукує утворення активних гомодимерів RXR/RXR і гетеродимерів RXR/RAR, тоді як at-RA і dd-RA зв'язуються лише з RAR рецепторами з утворенням RAR/RAR гомодимерів. Оскільки RAR і RXR рецептори мають різні ділянки розпізнавання на ДНК [30], то і спектр регульованих ними генів також відрізняється.

Більше того, активований 9-*cis*-RA рецептор RXR може утворювати активні комплекси з іншими факторами транскрипції, що належать до родини стероїдних рецепторів, зокрема, з THR (thyroid hormone receptor) або VDR (vitamin D3 receptor) [31]. Такі комплекси здатні до регуляції транскрипції генів, що знаходяться відповідно під контролем THR або VDR. Ми також не виключаємо наявності різних механізмів метаболізму і утилізації для різних ретиноїдів, що призводить до неоднакової стабільності ретиноїдів у клітині, а також можливості взаємної ізомеризації (переходу at-RA в 9-*cis*-RA і навпаки). Однак останнє здається малоімовірним, оскільки місця локалізації  $RAR\beta_2$  мРНК, індукованої at-RA або 9-*cis*-RA, відрізняються між собою. Також неможливим є перехід 4-оксо-RA та dd-RA до їхнього попередника —

at-RA [22], що також повинно обумовлювати специфічність їхньої дії.

Таким чином, ефективність індукції  $RAR\beta_2$  мРНК різними формами ретиноевої кислоти у вітамін А-дефіцитних ембріонів корелює з їхньою здатністю відновлювати нормальний ембріогенез. Так, найближчими до норми були локалізація і рівень експресії  $RAR\beta_2$  мРНК після індукції ембріонів at-RA і dd-RA тими формами вітаміну А, які за норми присутні на цій стадії ембріогенезу птахів [16, 18]. Але на сьогодні не встановлено локалізації цих ретиноїдів на рівні тканин ембріона; більше того, вона не обов'язково повинна збігатися з такою у тканинах, де експресується  $RAR\beta_2$ . У той же час в наших експериментах ретиноїди після ін'єкції потрапляють у клітини ембріонів шляхом пасивної дифузії, тобто вони здатні проникати практично в усі тканини. Проте ми не спостерігали ектопічної експресії  $RAR\beta_2$  мРНК при використанні природних ретиноїдів. Останнє свідчить про те, що експресія  $RAR\beta_2$  у ранніх ембріонів знаходиться під суворим генетичним контролем. Однак ми не виключаємо можливості, що деякі інші гени, які мають RARE у своєму промоторі, будуть активуватися відмінно від норми — за рахунок доступності ліганда (at-RA або dd-RA) в тих тканинах, де вони за норми відсутні.

На противагу біологічно активним формам вітаміну А (ретиноевих кислот) ретинол потребує більше часу для активації відповідних рецепторів. Це пов'язано з необхідністю конверсії ретинолу до відповідних форм та ізомерів ретиноевої кислоти. Тому рівень індукції  $RAR\beta_2$  мРНК ретинолом був дещо нижчим, ніж при використанні ретиноевих кислот, і меншим за норму (рис. 3, д, е). Незважаючи на це, експресія  $RAR\beta_2$  мРНК спостерігалася в усіх структурах, що свідчить про нормальну біологічну функцію ретинолу, а також про наявність на цій стадії ембріогенезу відповідних ферментних систем, які здатні окислювати ретинол до його активної форми. Звичайно, ми не виключаємо можливості утворення більш ніж однієї форми ретиноевої кислоти. Не викликає сумніву також, що конверсія ретинолу до активних метаболітів відбувається координовано і контрольовано, тобто лише у тих тканинах і клітинах, де вона здійснюється в нормі.

**Висновки.** Таким чином, наведені нами дані підтверджують і розширюють наші попередні спо-

стереження стосовно того, що: 1) ретиноїди регулюють експресію  $RAR\beta_2$  під час раннього формування серця у птахів; 2)  $RAR\beta_2$  пов'язаний з раннім розвитком серцево-судинної системи, зокрема, з розвитком задніх сегментів серця; 3)  $RAR\beta_2$  є важливим чинником нормального розвитку центральної нервової системи і м'язів. Важливим також є те, що нами встановлено період ембріонального розвитку, який є вітамін А-залежним. Критичною для нормального ембріогенезу є стадія утворення 5—6-го соміту, протягом якої (і далі) активна форма вітаміну А є абсолютно необхідною.

*E. V. Kostetskaia, I. E. Kostetskii, M. H. Zile*

The role of natural retinoids in the formation of avian cardiovascular system

#### Summary

*The retinoid knockout model system was used to examine the biological activity of various natural retinoids in early cardiovascular development. We have demonstrated that all-trans-, 9-cis-, 4-oxo-, and didehydro-retinoic acids, and all-trans-retinol can maintain alone normal development of cardiovascular system. Vitamin A-deficient embryos developed normally only when retinoids were added during early stages of embryogenesis, not later than at 5-somite stage. Early in development the vitamin A deficiency downregulates the expression of the retinoic acid receptor  $RAR\beta_2$  in the heart and in the developing central nervous system. All tested retinoids induced the expression of  $RAR\beta_2$  in the same embryonic structures of the vitamin A-deficient quail embryos where  $RAR\beta_2$  is normally expressed. But the level of induction differs for different retinoids. Therefore, our studies provide the strong evidence for the complete requirement of avian embryogenesis for retinoids and their receptor.*

*Key words: cardiovascular system, retinoids, vitamin A-deficiency, retinoic acid receptor, early embryogenesis.*

*E. V. Костецкая, И. Е. Костецкий, М. Г. Зиле*

Роль природных ретиноидов в формировании сердечно-сосудистой системы птиц

#### Резюме

*Модель ретиноидного нокаута использовали для проверки биологической активности некоторых природных ретиноидов во время эмбрионального развития сердечно-сосудистой системы птиц. Показано, что all-trans-, 9-cis-, 4-оксо- и дидегидропериноевые кислоты, а также all-trans-ретинол способны самостоятельно поддерживать ее нормальное развитие. Витамин А-дефицитные эмбрионы развивались нормально только при условии, если ретиноиды добавляли на ранних стадиях эмбриогенеза — не позднее формирования 5-го сомита. Дефицит витамина А во время эмбрионального развития существенно снижает уровень экспрессии  $RAR\beta_2$  как в сердце, так и в центральной нервной системе. Все использованные нами ретиноиды индуцировали экспрессию  $RAR\beta_2$  в тех же эмбриональных структурах, что и у нормальных эмбрионов, однако на разном уровне. Таким образом, наши данные указывают на полную зависимость раннего эмбриогенеза птиц от наличия ретиноидов, а также их рецепторов.*

*Ключевые слова:* сердечно-сосудистая система, ретиноиды, дефицит витамина А, рецептор ретиноевой кислоты, ранний эмбриогенез.

## ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dersh H., Zile M. H. Induction of normal cardiovascular development in the vitamin A-deprived quail embryo by natural retinoids // *Develop. Biol.*—1993.—160.—P. 424—433.
2. Dong D., Zile M. H. Endogeneous retinoids in the early avian embryo // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1995.—217.—P. 1026—1031.
3. Selleck M. A. J. Culture and microsurgical manipulations of the early avian embryo // *Meth. Cell Biol.*—1996.—51.—P. 1—22.
4. Hamburger V., Hamilton H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo // *J. Morphol.*—1951.—88.—P. 49—92.
5. Kostetskii I., Linask K. K., Zile M. H. Vitamin A deficiency and the expression of retinoic acid receptors during early cardiogenesis in quail embryo // *Roux's Arch. Develop. Biol.*—1996.—205.—P. 260—271.
6. Noji S., Nohno T., Koyama E., Muto K., Ohyama K., Aoki Y., Tamura K., Ohsugi K., Ide H., Tanigushi S., Saito T. Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud // *Nature.*—1991.—350.—P. 83—86.
7. Hoffman C., Eichele G. Retinoids in development // *The retinoids: biology, chemistry and medicine* / Eds M. B. Sporn, A. B. Roberts, D. S. Goodman.—New York: Raven press, 1994.—P. 382—441.
8. Durston A. J., van der Wees J., Pijnappel W. W. M., Schilthuis J. G., Godsavage S. F. Retinoid signaling and axial patterning during early vertebrate embryogenesis // *Cell. Mol. Life Sci.*—1997.—53.—P. 339—349.
9. Maden M., Gale E., Kostetskii I., Zile M. Vitamin A-deficient embryos have half hindbrain and other neural defects // *Curr. Biol.*—1996.—6.—P. 417—426.
10. Maden M., Gale E., Zile M. H. The role of vitamin A in the development of the central nervous system // *J. Nutr.*—1998.—128.—P. 471—475.
11. Chen Y. P., Solursh M. The determination of myogenic and cartilage cells in the early chick embryo and the modifying effect of retinoic acid // *Roux's Arch. Develop. Biol.*—1991.—200.—P. 162—171.
12. Smith S. M., Dickman E. D. New insights into retinoid signaling in cardiac development and physiology // *Trends Cardiovasc. Med.*—1997.—7.—P. 53—58.
13. Smith S. M., Dickman E. D., Power S. C., Lancman J. Retinoids and their receptors in vertebrate embryogenesis // *J. Nutr.*—1998.—128.—P. 467—470.
14. Zile M. H. Vitamin A and embryonic development: An overview // *J. Nutr.*—1998.—128.—P. 455S—458S.
15. Heine U. I., Roberts A. B., Munoz E. F., Roche N. S., Sporn M. B. Effects of retinoid deficiency on the development of the heart and vascular system in the quail embryo // *Virchows Arch. B.*—1985.—50.—P. 135—152.
16. Zile M. H., Kostetskii I., Yuan S., Kostetskaia E., Amand T. R., Chen Y., Jiang W. Retinoid signaling is required to complete the vertebrate cardiac left/right asymmetry pathway // *Develop. Biol.*—2000.—223.—P. 323—328.
17. Dickman E. D., Smith S. M. Selective regulation of cardiomyocyte gene expression and cardiac morphogenesis by retinoic acid // *Develop. Dyn.*—1996.—206.—P. 39—48.
18. Ross S. A., McCaffery P. Y., Drager U. C., de Luca L. M. Retinoids in embryonic development // *Physiol. Rev.*—2000.—80.—P. 1021—1054.
19. Thaller C., Eichele G. Isolation of 3,4-didehydro-retinoic acid, a novel morphogenic signal in the chick wing bud // *Nature.*—1990.—345.—P. 815—819.
20. Pijnappel W. W. M., Hendrics H. F. J., Folkers G. E., van der Brink C. E., Dekker E. J., Edelenbosch C. V., van der Saag P. T., Durston A. J. The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is the highly active modulator of positional specification // *Nature.*—1993.—366.—P. 340—344.
21. Creech Kraft J., Schuh T., Juchau M., Kimelman D. The retinoid X receptor ligand, 9-cis-retinoic acid, is the potential regulator of early *Xenopus* development // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91.—P. 3067—3071.
22. Hogan B. L., Thaller C., Eichele G. Evidence that Hensen's node is a site of retinoic acid synthesis // *Nature.*—1992.—359.—P. 237—241.
23. Aranda A., Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression // *Physiol. Rev.*—2001.—81.—P. 1269—1304.
24. Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis // *Develop. Biol.*—2003.—258.—P. 1—19.
25. Lee R. Y., Luo J., Evans R. M., Giguere V., Sukov H. M. Compartment-selective sensitivity of cardiovascular morphogenesis to combination of retinoic acid receptor gene mutations // *Circ. Res.*—1997.—80.—P. 757—764.
26. Ulven S. M., Gundersen T. E., Weedon M. S., Landaas V. O., Sakhi A. K., Fromm S. H., Geronimo B. A., Moskau J. O., Blomhoff R. Identification of endogeneous retinoids, enzymes and receptors during early postimplantation development in mouse: important role of retinal dehydrogenase type 2 in synthesis of all-trans-retinoic acid // *Develop. Biol.*—2000.—220.—P. 379—391.
27. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors // *FASEB J.*—1996.—10.—P. 940—954.
28. Zile M. H. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development // *J. Nutr.*—2001.—131.—P. 705—708.
29. Bachmair F., Hoffmann R., Daxelbichler G., Langer T. Studies on structure-activity relationships of retinoic acid receptor ligands by means of molecular modeling // *Vitam. Horm.*—2000.—59.—P. 159—215.
30. Pfahl M. Signal transduction by retinoid receptors // *Skin Pharmacol.*—1993.—6.—P. 8—16.
31. Carlberg C. Lipid soluble vitamins in gene regulation // *Biofactors.*—1999.—10.—P. 91—97.

УДК 577.218 + 591.133.16  
Надійшла до редакції 28.11.03