

ВЛИЯНИЕ ДОФАМИНА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ КЛЕТОК ВНК-21

© В. С. Шубина,¹ * М. Б. Абрамова,² В. П. Лавровская,² Л. Л. Павлик,²
Э. И. Лежнев,^{1,2} Д. А. Мошков^{1,2}

¹ Пуццинский государственный университет, Московская обл.,

и ² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццино, Московская обл.;

* электронный адрес: shubinavictoria@rambler.ru

Изучено влияние дофамина, вводимого в культуральную среду, на ультраструктуру клеток ВНК-21, находящихся в суспензии или прикрепившихся к подложке. Показано, что ультраструктурные изменения затрагивают главным образом участки клетки с высоким содержанием актина — межклеточные десмосомоподобные контакты, микроворсинки и примембранный кортикальный слой. Цитоплазматические пластины десмосомоподобных контактов гипертрофируются, их электронная плотность повышается, в специализированных контактах появляются шунтирующие фибриллярные мостики. Микроворсинки сливаются друг с другом и с плазматической мембраной соседней клетки, раздваиваются, пронизываются фибриллами. Цитоплазма наполняется хаотично расположенными нитями F-актина и приобретает муаровый вид. Эффект дофамина более выражен в неприкрепленных клетках с недостаточно дифференцированным актиновым цитоскелетом, чем в распластанных клетках, сформировавших стресс-фибриллы. Блокада галоперидолом рецепторов D2 не влияет на ультраструктуру клеток ВНК-21 и на последующее действие дофамина. Данные позволяют предполагать прямое вовлечение актинового цитоскелета во взаимодействие с дофамином.

Ключевые слова: культура клеток ВНК-21, дофамин, галоперидол, ультраструктура, цитоскелет.

В настоящее время имеются данные, которые позволяют предполагать, что нейротрансмиттеры помимо своего основного действия на специфические рецепторы способны оказывать трофическое (неспецифическое) влияние на функцию постсинаптического нейрона (Cantor, 2003; Milutinovic et al., 2007). В частности, получены ультраструктурные свидетельства того, что дофамин (ДА), один из основных возбуждающих нейротрансмиттеров центральной нервной системы, при аппликации на мультнеровские нейроны (МН) золотой рыбки изменяет их функциональное состояние в виде усиления резистентности к утомительной сенсорной стимуляции (Павлик и др., 2004). В результате воздействия ДА на МН наблюдаются вызванные полимеризацией цитоплазматического актина изменения электронной плотности и размеров десмосомоподобных синаптических контактов, содержащих актин (Павлик и др., 2003), и формирование в цитоплазме пучков актиновых нитей в виде стресс-фибрилл. Эти изменения можно считать положительными и благоприятными, усиливающими жизнеспособность клетки (Korichneva, Hammerling, 1999). В параллельных опытах установлено, что полимеризацию мономерного актина вызывает также взаимодействие его с ДА *in vitro* в простом двухкомпонентном растворе и в случае, когда актин предварительно заключали внутрь липосомы, что предполагало проникновение ДА сквозь искусственную фосфолипидную мембрану (Безгина и др., 2006; Павлик и др., 2008). Недавно показано, что ДА действует не только на нервные, но и на соматические клетки, например на культивируемые (фиб-

робластоподобные) клетки сирийского хомячка ВНК-21, которые способны расти как в суспензионном, так и в прикрепленном к субстрату состоянии. Исследование этих клеток показало, что наличие ДА в культуральной среде оказывает на клетки токсическое действие, усиливающееся с ростом концентрации и времени действия ДА (Абрамова и др., 2010). Причем клетки, находящиеся в суспензии, оказались более чувствительными к воздействию ДА, чем клетки, прикрепившиеся к поверхности субстрата, проявившие большую устойчивость к препарату. Известно, что растущие в суспензии клетки имеют слабо-дифференцированный актиновый цитоскелет, актин преимущественно находится в олигомерной и мономерной (глобулярной) формах (G-актин). Распластанные на субстрате клетки, напротив, обладают хорошо развитым актиновым цитоскелетом, в цитоплазме появляются многочисленные стресс-волокна, состоящие из филаментозного актина (F-актина), а также формируются межклеточные десмосомоподобные и фокальные контакты. Экспериментально определено, что ДА охотно взаимодействует с G-актином и практически не взаимодействует с F-актином (Павлик и др., 2008). Видимо, разная токсичность ДА для свободно плавающих и для ползающих по субстрату фибробластоподобных клеток обусловлена разным содержанием актина в их цитоплазме, способного взаимодействовать с ДА: чем выше доля G-актина, тем токсичнее действие ДА. В целом эти данные позволяют предположить, что мишенью действия ДА при взаимодействии с живой клеткой является актиновый цитоскелет.

Для выяснения деталей такого взаимодействия необходимы соответствующие ультраструктурные исследования, которые и стали задачей настоящей работы.

Материал и методика

Культура клеток. Объектом исследования служили клетки ВНК-21, представляющие собой трансформированные фибробласты почки золотистого хомячка, полученные ранее из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали во флаконах Карреля и чашках Петри в среде, содержащей RPMI-1640 и DMEM в соотношении 1 : 1 с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота, при 37 °С в атмосфере O₂ с добавлением 5 % CO₂. Все реактивы приобретены в ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова» РАМН. Для обеспечения стерильности в среду добавляли 80 мкг/мл гентамицина.

Использовали коммерческий ДА (Orion, Pharma, Финляндия) в концентрации 10, 100 или 1000 мкМ. Чтобы исключить окисление ДА в культуральной среде, его разводили в растворе метабисульфита натрия, конечная концентрация которого составляла 200 мкМ (Pedrosa, Soares-da-Siva, 2002). Аптечный раствор галоперидола (ГП) (для инъекций) добавляли из ампул, содержащих 5 мг вещества в 1 мл. ГП использовали в концентрациях 1 и 10 мкМ. Концентрацию ГП рассчитывали так, чтобы была гарантирована блокада всех рецепторов при максимально размножившейся культуре. Предполагаемое общее количество рецепторов, максимально возможное в клеточной культуре, оценивали из следующих соображений. Так, если средний диаметр клетки составляет 10 мкм, то площадь ее поверхности составляет около 315 мкм². Известно, что диаметр экстракционного домена рецептора (например, наиболее изученного ацетилхолинового) составляет около 10 нм (Paas et al., 2003). Поэтому для заполнения всей поверхности клетки данным рецептором потребуется около $5 \cdot 10^6$ его молекул. Так как максимальное число клеток на 3-и сут во флаконе достигает 3 млн, число «свободных рецепторов» должно составить $1.5 \cdot 10^{13}$ (или $2 \cdot 10^{12}$ для чашки Петри при ее максимальном заполнении). В 5 мл культуральной среды при концентрации ГП 10 мкМ присутствует около $3 \cdot 10^{16}$ молекул. Таким образом, их с избытком хватает как для полной блокады данных рецепторов даже при условии заполнения ими всей поверхности клетки, так и для блокады встраиваемых в плазматическую мембрану новых внутриклеточно синтезируемых рецепторов, дополнительно появляющихся взамен заблокированных, утилизируемых клеткой.

Для оценки действия ДА на клетки с разной организацией актинового цитоскелета его вносили в культуру либо одновременно с посевом (до распластывания клеток), либо спустя 6 ч после прикрепления и распластывания клеток. Подсчет клеток проводили с помощью камеры Горяева через 1, 2 и 3 сут после введения ДА, окрашивая их 0.5%-ным раствором трипанового синего. Для подсчета числа клеток их смывали с подложки смесью растворов версена (0.02 %) и трипсина (25 %) в соотношении 1 : 1.

Для электронной микроскопии клетки ВНК-21 отмывали от культуральной среды и фиксировали в течение 2 ч

в смеси 5%-ного глутаральдегида и 2%-ного формальдегида на 0.1 М какодилатном буфере. Затем их дофиксировали в 1%-ном растворе четырехоксида осмия на том же буфере (рН 7.4) в течение 1 ч по принятому в лаборатории методу (Мошков, 1985). Далее препараты обезживали в растворах спиртов возрастающей концентрации и заливали в эпоксидную смолу Эпон-812. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-III (Швеция) или Leica UC6 (Германия). Срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе TESLA-BS 500 при 90 кВ.

Результаты и обсуждение

В прикрепившихся фибробластоподобных клетках полимерная форма актина (F-актин) распределена главным образом в виде тонкого слоя по всему периметру клетки под плазматической мембраной (в кортикальном слое) (Ujihara et al., 2008), а также в микроворсинках, межклеточных десмосомоподобных контактах (ДПК) и в фокальных контактах клетка—матрикс (Gloushankova, 1998). Кроме того, в глубине цитоплазмы он образует пересекающие цитоплазму пучки, так называемые стресс-фибриллы (Lazarides, 1975; Barak et al., 1980). Следует иметь в виду, что для поддержания динамического равновесия в локусах, обогащенных F-актином, определенная доля (около 30 %) приходится на G-актин. Основная масса G-актина (олигомерная форма актина) в основном расположена в цитозоле (Dos Remedios et al., 2003). Поэтому при исследовании структурных изменений в клетках под воздействием ДА мы особое внимание уделяли состоянию ДПК, микроворсинок, кортикального слоя и глубокой цитоплазмы.

Ультраструктура контрольных и подопытных клеток ВНК-21, культивируемых в монослое. Исследование показывает, что типичная ультраструктура интактных клеток (рис. 1, а) и клеток, культивируемых в течение 72 ч в среде, содержащей 200 мкМ метабисульфита натрия (рис. 1, б—г), практически не различается. Ультраструктурный анализ данных препаратов показал, что основными компонентами цитоскелета являются равномерно распределенные в цитозоле микротрубочки, микрофиламенты и промежуточные филаменты. F-актин присутствует в виде слабообразованного кортикального слоя, расположенного под клеточной мембраной, а также в участках прикрепления (адгезии) клеток к субстрату — в фокальных контактах. Видно, что поверхность клеток с микроворсинками имеет обычное классическое строение, то же можно сказать и о межклеточных ДПК. Никаких ультраструктурных различий между интактными и клетками, подвергаемыми влиянию метабисульфита натрия, не обнаружено.

Присутствие в культуральной среде ДА (10, 100 или 1000 мкМ) приводит к ультраструктурным изменениям клеток ВНК-21 (рис. 2), прогрессивно усиливающимся с ростом концентрации. На обзорных снимках фибробластов, находящихся под хроническим воздействием ДА, видно, что кортикальный слой расширяется. Находящиеся в микроворсинках нити F-актина, в контрольных клетках не выходящие за пределы довольно тонкого кортикального слоя, устремляются в глубь клетки. В глубоких областях цитоплазмы появляются многочисленные широкие и протяженные стресс-фибриллы, представляющие собой, как известно, пучки актиновых филаментов

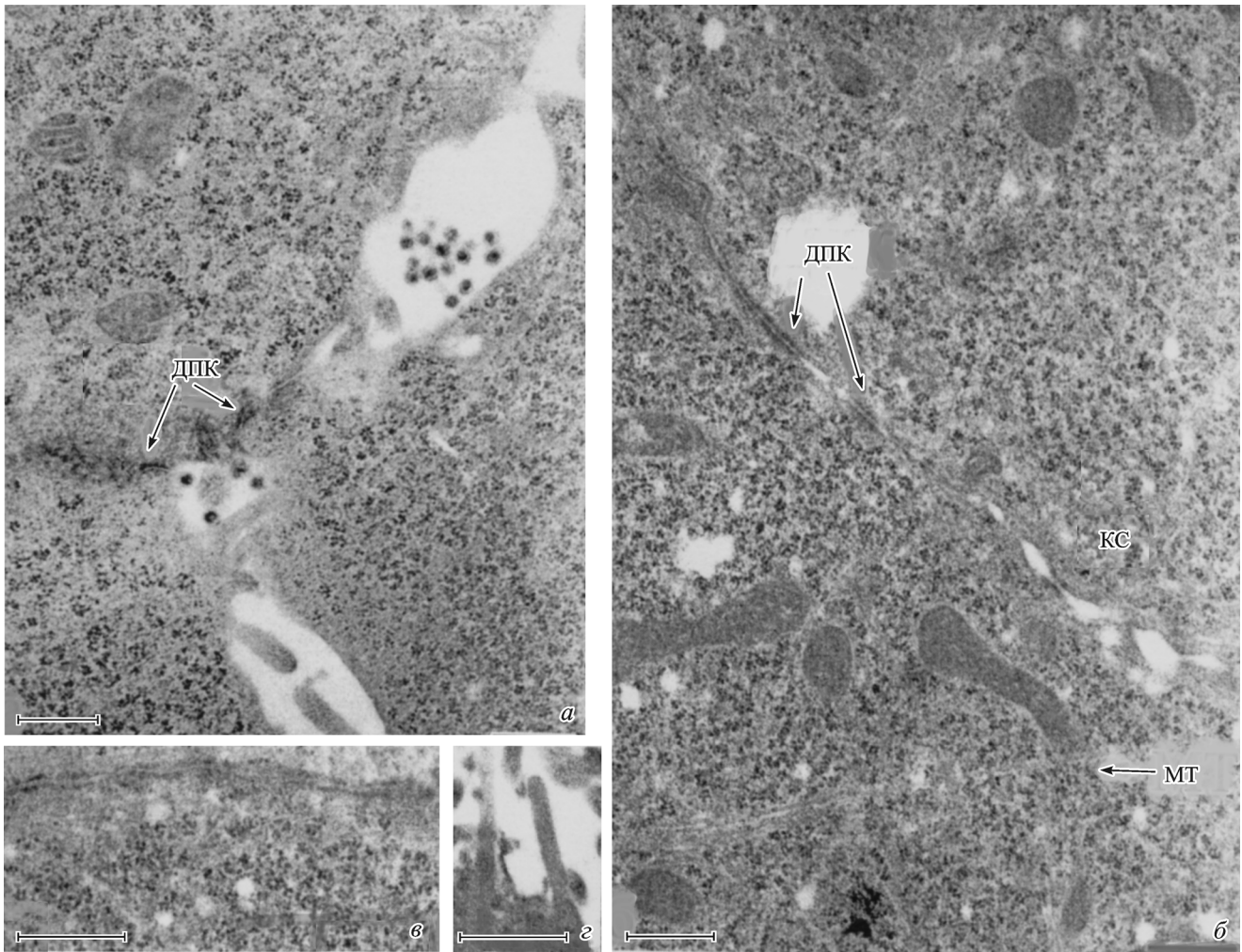


Рис. 1. Ультраструктура распластанных контрольных и подвергшихся действию метабисульфита натрия клеток ВНК-21.

a — интактный препарат. *б–г* — препараты, выращенные в среде, содержащей 200 мкМ метабисульфита натрия: части клетки с участками цитоплазмы и межклеточного контакта (*б*), десмосомоподобный контакт (ДПК) при большем увеличении (*в*) и микроворсинки (*г*). ДПК — десмосомоподобный контакт, КС — кортикальный слой, МТ — микротрубочка. Масштабные линейки — 0,5 мкм.

(Павлик и др., 1997). Цитоплазматический матрикс перестраивается, в нем наблюдается локальное перераспределение электронной плотности: участки с более высокой электронной плотностью, по всей видимости связанные с дополнительной полимеризацией актина, чередуются с узкими просветами с низкой электронной плотностью. В результате в некоторых клетках цитоплазма приобретает «муаровый» вид: она выглядит поделенной на кластеры, имеющие неодинаковую площадь и очертания, окаймленные нерегулярными светлыми границами (рис. 2, *a*). Здесь же вблизи органоидов видны беспорядочно ориентированные нити F-актина, отесняющие от их поверхности на периферию другие структурные компоненты цитоплазмы, такие как рибосомы, включения в виде частиц и вакуолей. Они создают вокруг органоидов, в частности вокруг митохондрий, своеобразный ободок, электронно более прозрачный по сравнению с близлежащей цитоплазмой.

Пластины межклеточных ДПК (примембранные фибриллярные уплотнения) заметно гипертрофируются, возрастает их осмиофильность (рис. 2, *б, в*). Наблюдаются anomalies структуры микроворсинок: их разветвление или слияние (рис. 2, *г*), расщепление (рис. 2, *д*).

Часто обнаруживается образование синцития между двумя соседними клетками (рис. 2, *е*). Иногда в микроворсинках встречаются структурные нарушения, выражающиеся в формировании весьма протяженных выростов, напоминающих филоподии, но построенных из одной или нескольких актиновых нитей, выходящих из апикального конца микроворсинки в окружающее пространство (рис. 2, *ж, з*). В некоторых случаях из плазматической мембраны верхушечной части микроворсинки или из выроста плазматической мембраны одной клетки в сторону другой клетки выступает несколько регулярно расположенных отдельных коротких нитей. Они вклиниваются в плазматическую мембрану соседней клетки и углубляются в цитоплазму, формируя своеобразные мостики-шунты, соединяющие смежные клетки друг с другом (рис. 2, *и, к*). Подобные картины пронизывания липосомальной мембраны нитями актина, сформированными под влиянием ДА, наблюдали ранее в условиях *in vitro* (Павлик и др., 2008). Появление аналогичных мостиков-шунтов (индуцированных ДА), переносящих ионы кальция по своей поверхности и имеющих актиновую природу, наблюдали также в щели ДПК смешанных синапсов МН (Дзеван и др., 2003; Мошков и др., 2003; Павлик и др., 2003). Все

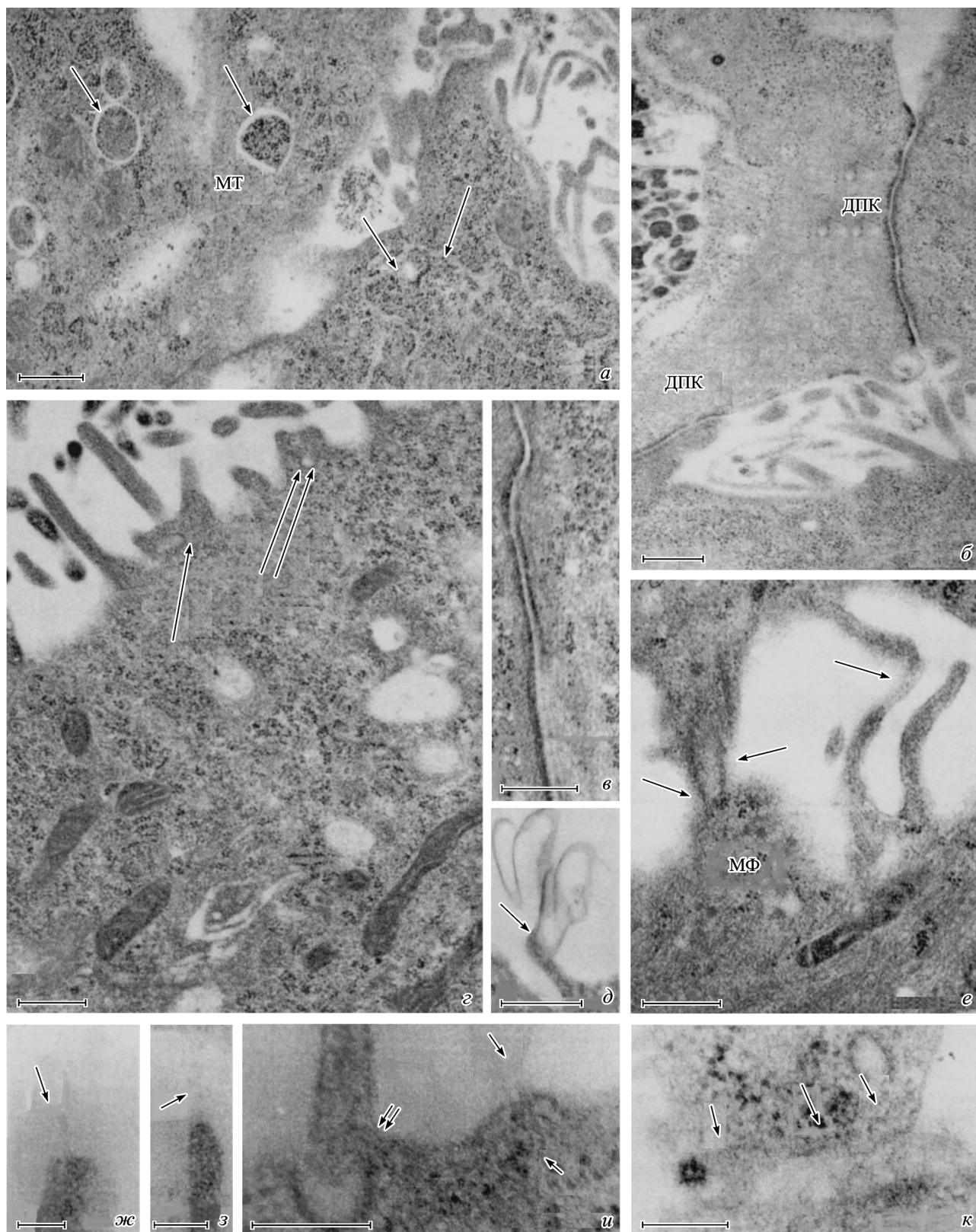


Рис. 2. Ультраструктура распластанных клеток ВНК-21, подвергшихся действию дофамина.

a — формирование «муарового рисунка» цитоплазмы у части клеток за счет появления нерегулярной сетки светлых промежутков, делящих цитоплазму на кластеры (стрелки). *б, в* — увеличение осmioфильности и гипертрофия цитоплазматических пластин ДПК. *г, д* — аномалии в структуре микроворсинок: разделение и слияние (*г*, соответственно стрелка и двойная стрелка), расщепление (*д*). *е* — образование синцития двух соседних клеток (стрелки). *ж, з* — протяженные актиновые нити, выходящие из апикального конца микроворсинки в окружающее пространство (стрелки). *и* — регулярно расположенные отдельные короткие актиновые нити, выходящие из верхушечной части микроворсинки в сторону другой клетки (стрелки), и момент слияния микроворсинки с соседней клеткой (двойная стрелка). *к* — формирование шунтирующих мостиков между соседними клетками: стрелками указаны нити, выходящие из одной клетки и пронизывающие другую. МФ — микрофиламенты; остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабные линейки — 0.5 (*a–e*) или 0.2 (*ж–к*) мкм.

эти данные, вместе взятые, позволяют предположить, что взаимодействие ДА с культивируемыми клетками ВНК-21 способствует образованию локальных аномальных разрывов плазматической мембраны или проницаемости ее актиновыми мостиками-шунтами, аномально изменяющими транспорт ионов.

На наш взгляд, повреждение целостности мембраны и нарушение вследствие этого изоляции цитоплазмы от внешней среды являются одной из причин токсического действия этого нейротрансмиттера на живые клетки.

Присутствие ДА в концентрации 1000 мкМ приводит к округлению клеток и откреплению части из них от субстрата. Анализ ультраструктуры клеток, все еще распластанных на подложке, показал более выраженные структурные изменения, чем те, которые отмечены выше при воздействии ДА меньших концентраций. Особенно заметной становится вакуолизация цитоплазмы (не представлено).

При культивировании клеток ВНК-21 в присутствии ГП в концентрации 10 мкМ не наблюдается никаких морфологических и ультраструктурных изменений, отличающих их от контрольных клеток. Клетки имеют интактный вид, в глубине цитоплазмы умеренно развит цитоскелет, пучки F-актина встречаются только в кортикальном слое, в участках адгезии и межклеточных контактов. Микроворсинки также сохраняют характерные (для интактных клеток) внешний вид и внутреннюю структуру. Не обнаружено изменений электронной плотности в различных локусах цитоплазмы, ее перераспределения, не наблюдается вакуолизации (рис. 3, а, б). В то же время присутствие в культуральной среде молекул ГП, полностью блокирующих ДА-рецепторы клеток, находящихся во флаконе, не ослабляет токсического эффекта, вызванного одновременным действием ДА (10 мкМ) (Абрамова и др., 2010). Изучение ультраструктуры клеток ВНК-21, находящихся под одновременным воздействием ГП и ДА, показало, что в них наблюдаются те же аномалии, которые свойственны клеткам, подвергшимся действию одного ДА в этой концентрации. На обзорных снимках клеток бросается в глаза появление узких ободков с низкой электронной плотностью, ограничивающих участки цитоплазмы с большей осмиофильностью. Цитоплазма выглядит разделенной на кластеры и приобретает «муаровый» вид. Светлая окантовка органоидов образуется и вокруг индивидуальных органоидов, в том числе митохондрий и ядра (рис. 3, в). Заметно повреждаются микроворсинки, в них появляются разрывы мембран, наблюдаются слияния смежных ворсинок (рис. 3, г), выход нитей F-актина за пределы кортикального слоя в глубь клетки. Нити F-актина появляются вблизи органоидов, увеличивается число пересечений F-актина с промежуточными филаментами. Усиливаются осмиофильность и гипертрофия цитоплазматических пластин ДПК (рис. 3, д).

Ультраструктура клеток ВНК-21 в суспензионном состоянии при действии ДА. В связи с тем, что для культивирования в суспензии клетки открепляли от подложки с помощью версена и трипсины, в них разрушались межклеточные контакты и участки адгезии. Поэтому основное наше внимание было сфокусировано на цитоплазме клеток в суспензионном состоянии. На рис. 4, а—в представлена ультраструктура типичных контрольных клеток (рис. 4, а) и клеток, культивируемых в присутствии 200 мкМ метабисульфата натрия (рис. 4, б, в) спустя 72 ч. Клетки в обоих препаратах име-

ют интактный вид, у них умеренно развит цитоскелет (микротрубочки, микрофиламенты, промежуточные филаменты), F-актин встречается преимущественно в кортикальном слое и микроворсинках.

Культивирование клеток в среде, содержащей ДА в концентрации 10 мкМ, приводит к появлению заметно возросшего числа нитей F-актина внутри цитоплазмы, образованию светлых ободков вокруг органоидов и формированию «муарового» рисунка цитоплазмы клетки (рис. 4, з).

Увеличение концентрации ДА до 100 и 1000 мкМ приводит к пропорционально усиливающемуся негативному ультраструктурному эффекту на клетки ВНК-21. Его признаки были заметны уже на гистологическом уровне, что проявлялось в появлении клеток нескольких типов: прикрепленных к поверхности чашки и имеющих практически интактный вид; все еще прикрепленных к подложке, но сильно округлившись; округлившись и не прикрепленных к поверхности флакона (Абрамова и др., 2009). Несмотря на то что остающиеся живыми клетки сохраняли (хотя и сильно редуцированную) способность прикрепляться к субстрату, основная масса клеток относилась к третьему типу. Ультраструктура указанных клеток была сильно повреждена, особенно хорошо это проявляется через 48 ч действия ДА в концентрации 100 мкМ. Такие клетки практически полностью теряют микроворсинки, их поверхность становится гладкой (рис. 4, д). Наряду с этим митохондрии приобретают набухший вид. Несмотря на то что некоторые из клеток претерпевают значительную деструкцию, по ультраструктурным признакам они остаются живыми. В качестве негативных последствий воздействия ДА можно отметить появление в цитоплазме хаотично ориентированных в пространстве нитей F-актина. Иногда обнаруживались локальные слияния цитоплазмы двух соседних клеток через так называемые синцитиальные перфорации, или цитонемы (Сотников, 2008; Sherer, Mothes, 2008). Внутри цитоплазмы образовывалось много вакуолей, между которыми также видны разнонаправленные нити актина (диаметром около 5 нм). В части клеток наблюдаются локальные разрывы плазматической мембраны, приводящие к гибели, о чем свидетельствует присутствие многочисленных фрагментов погибших и разрушенных клеток во внеклеточном пространстве. Культивирование клеток ВНК-21 с 1000 мкМ ДА приводит практически к полной их гибели, появлению клеточных теней, которые, однако, часто содержат нераспавшиеся пучки нитей актина.

Таким образом, добавление ДА к клеткам ВНК-21 до или после их прикрепления к поверхности чашки приводит к появлению нитей F-актина в цитоплазме. Клетки приобретают «муаровый» вид. В них наблюдаются вакуолизация и другие структурные аномалии, в частности гипертрофия цитоплазматических пластин ДПК; тотальное повреждение микроворсинок; появление участков с низкой или, наоборот, повышенной электронной плотностью, связанное с перераспределением пулов актина цитоплазмы, концентрацией F-актина в области стресс-фибрилл и обеднением олигомерного актина в близлежащих локусах. Данные показывают, что не прикрепившиеся к субстрату клетки оказываются более чувствительными к действию ДА, чем уже распластанные, что проявляется в более значительных изменениях ультраструктуры клеток, подвергнутых воздействию ДА в суспензии, чем прикрепившихся к субстрату. По-видимому, это связано с вызванной полимеризацией цитоплазматического моно-

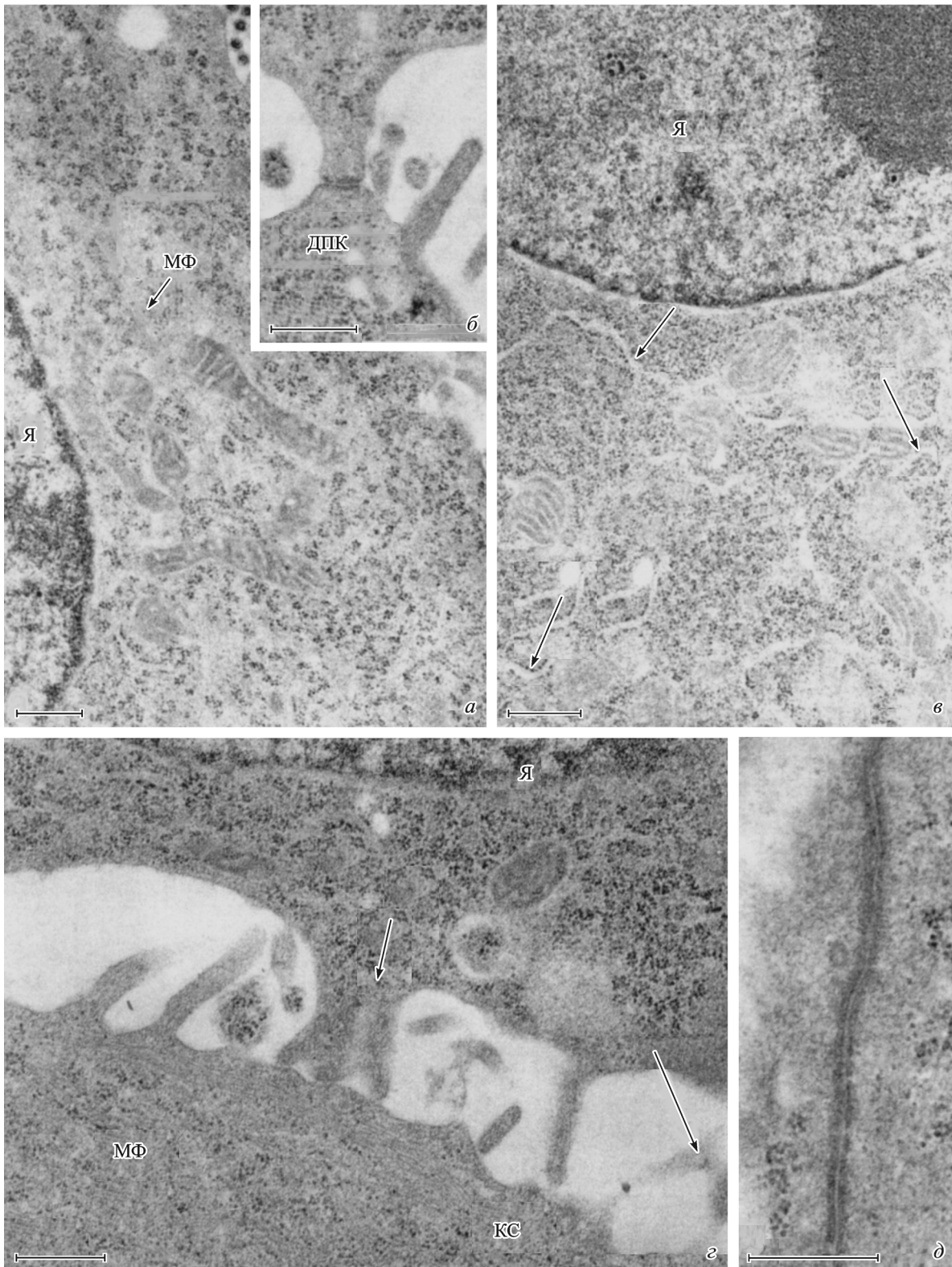


Рис. 3. Ультраструктура расплывчатых клеток ВНК-21, подвергшихся действию дофамина в присутствии галоперидола. *а, б* — структура разных участков клетки в условиях блокады галоперидолом дофаминергических рецепторов; наблюдается видимое сходство контрольных и подвергшихся действию галоперидола клеток; кортикальный слой, ДПК и микроворсинки имеют нормальное строение. *в–д* — изменение структуры клеток под влиянием дофамина на фоне блокады дофаминовых рецепторов, рисунок цитоплазмы «муаровый» (*в, стрелки*); *г* — структурные аномалии микроворсинок (*стрелки*), в частности, слияние микроворсинок, близко расположенных друг к другу; *д* — гипертрофия цитоплазматических пластин ДПК выражена так, как и при действии одного дофамина. Я — ядро; остальные обозначения те же, что и на рис. 1, 2. Масштабные линейки — 0,5 мкм.

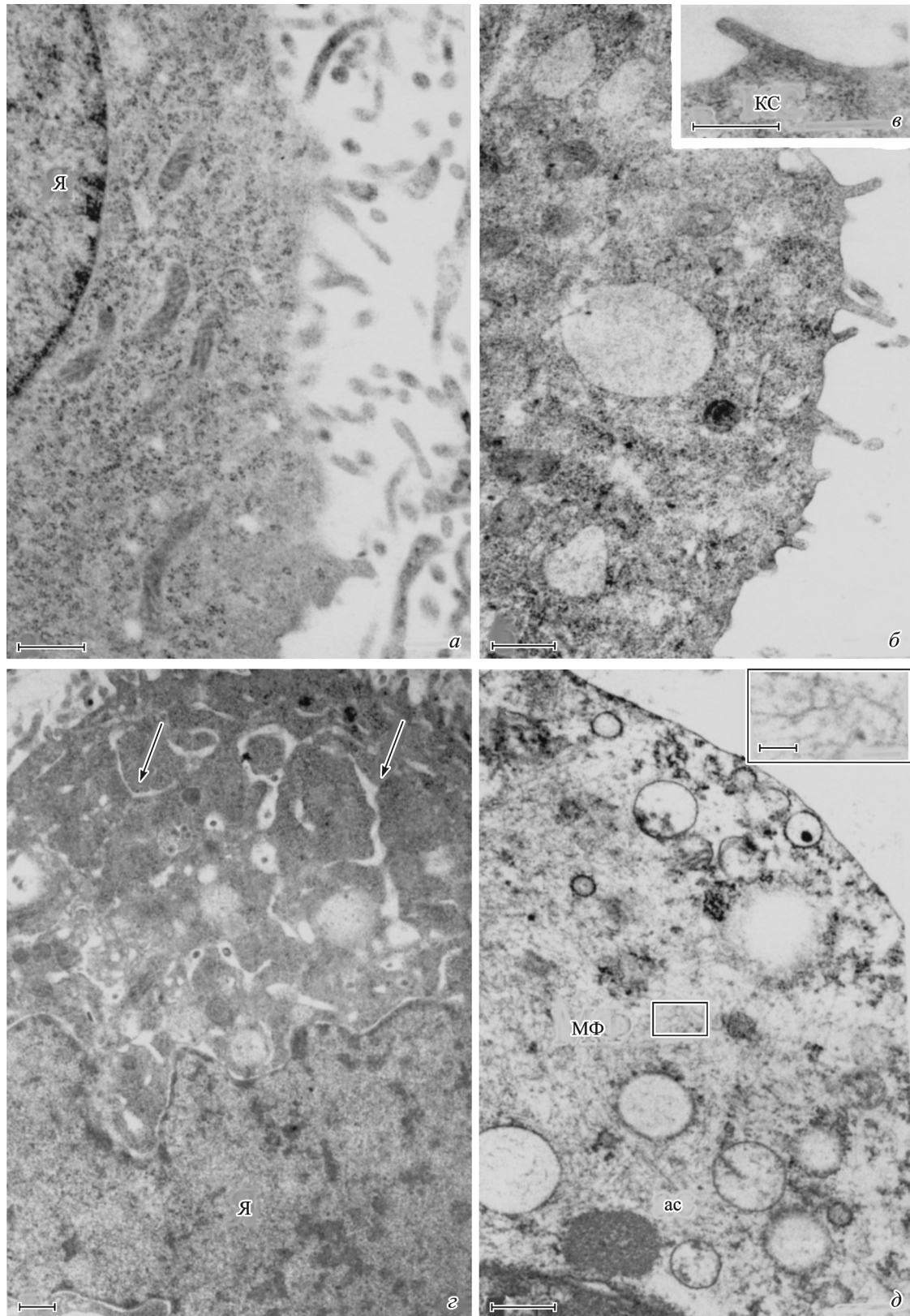


Рис. 4. Ультраструктура клеток ВНК-21 в суспензионном состоянии, подвергшихся действию дофамина.

a — структура intactных клеток. *б, в* — структура клеток, культивируемых в присутствии 200 мкМ метабисульфита натрия; цитоплазма клеток и микроворсинки имеют intactный вид. *г* — «муаровый» рисунок цитоплазмы клетки при действии 10 мкМ дофамина (стрелки). *д* — ультраструктура клеток под действием 100 мкМ дофамина; отмечаются увеличение числа вакуолей, хаотичность расположения нитей F-актина (МФ, ас) в цитоплазме клетки, округление клеток и сглаживание поверхности за счет исчезновения микроворсинок; на *врезке* (*д*) представлен участок цитоплазмы с пересекающимися нитями F-актина при большем увеличении. Обозначения те же, что и на рис. 1—3. Масштабные линейки — 0.5 (*a—д*) или 0.1 (*д, врезка*) мкм.

мерного и олигомерного актина клеток, индуцированной ДА, который проникает внутрь клеток. Различия в степени токсичности ДА для клеток, находящихся в суспензии или монослое, вполне объяснимы различиями агрегатного состояния в них цитоскелетного актина. В суспензии клетки имеют менее развитый цитоскелет по сравнению с клетками, уже прикрепившимися к субстрату и сформировавшими мощный цитоскелет в виде актиновых стресс-фибрилл, которые забрали для своей сборки существенную долю олигомерного актина, главной мишени ДА (Павлик и др., 2004, 2008; Безгина и др., 2006). Так или иначе, очевидно, что мишенью действия ДА является актин, локализованный в микроворсинках, ДПК и в глубине цитоплазмы, который можно наблюдать в виде хаотично направленных тонких нитей. Кроме того, действие ДА на актиновый цитоскелет клеток, по-видимому, не опосредовано его взаимодействием с соответствующими рецепторами. Об этом свидетельствует тот факт, что действие ДА на клетки ВНК-21 не блокируется ГП. Все указанное подтверждает гипотезу о возможности трофического, неспецифического действия ДА на живые клетки, оказывающего прямой эффект на актин цитоскелета.

Авторы благодарны А. С. Беспаловой за помощь при подготовке к печати фотографий и Л. И. Михеевой за техническую помощь по обслуживанию электронного микроскопа.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы «Ведущие научные школы» (НШ217.2008.4), аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (проект 3840), Федеральной целевой программы Федерального агентства по науке и инновациям «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (номер контракта 02.740.11.0301).

Список литературы

- Абрамова М. Б., Шубина В. С., Лавровская В. П., Павлик Л. Л., Лежнев Э. И., Мошков Д. А. 2010. Влияние дофамина на жизнеспособность клеток ВНК-21. Бюл. эксперим. биол. мед. 149 (3).
- Безгина Е. Н., Павлик Л. Л., Михайлова Г. З., Тирас Н. Р., Удадьцов С. Н., Шубина В. С., Мошков Д. А. 2006. Морфофункциональные эффекты аппликации глутамата и дофамина на маутнеровские нейроны золотой рыбки. Нейрофизиология. 38 (4): 320—330.
- Дзедбан Д. А., Мухтасимова Н. Ф., Павлик Л. Л., Мошков Д. А. 2003. Ультраструктура десмосомоподобных контактов смешанных синапсов маутнеровских нейронов при долговременной потенциации. Морфология. 123 (2): 33—38.
- Мошков Д. А. 1985. Адаптация и ультраструктура нейрона. М.: Наука. 200 с.
- Мошков Д. А., Безгина Е. Н., Павлик Л. Л., Мухтасимова Н. Ф., Мавлютов Т. А. 2003. Распределение ионов кальция в смешанных синапсах маутнеровских нейронов золотой рыбки в норме, при утомлении и при адаптации к нему. Морфология. 124 (6): 41—46.

Павлик Л. Л., Безгина Е. Н., Тирас Н. Р., Михеева И. Б., Удадьцов С. Н., Мошков Д. А. 2004. Структура смешанных синапсов маутнеровских нейронов при воздействии веществ, изменяющих проводимость щелевых контактов. Морфология. 125 (2): 26—31.

Павлик Л. Л., Григорьев П. А., Шубина В. С., Бледжанц Д. А., Мошков Д. А. 2008. Исследование взаимодействия дофамина с искусственными фосфолипидными мембранами. Биофизика. 53 (1): 66—72.

Павлик Л. Л., Тирас Н. Р., Мошков Д. А. 1997. Актин в маутнеровских нейронах золотых рыбок после действия фаллоидина и адаптации к длительной стимуляции. Цитология. 39 (12): 1109—1115.

Павлик Л. Л., Тирас Н. Р., Мухтасимова Н. Ф., Пахотин П. И., Дзедбан Д. А., Мошков Д. А. 2003. Участие актина в электротонической проводимости смешанных синапсов маутнеровских нейронов золотой рыбки. Морфология. 123 (1): 41—45.

Сотников О. С. 2008. Статика и структурная кинетика живых асинаптических дендритов. СПб.: Наука. 397 с.

Barak L. S., Jocum R. R., Nothnagel E. A., Webb W. W. 1980. Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole-phalloidin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77: 980—984.

Cantor R. S. 2003. Receptor desensitization by neurotransmitters in membranes: are neurotransmitters the endogenous anesthetics? Biochemistry. 42: 11 891—11 897.

Dos Remedios C. G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I. V., Tsubakihara M., Berry D. A., Nosworthy N. J. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. Physiol. Rev. 83: 433—473.

Gloushankova N. A., Krendel M. F., Alieva N. O., Bonder E. M., Feder H. H., Vasiliev J. M., Gelfand I. M. 1998. Dynamics of contacts between lamellae of fibroblasts: essential role of the actin cytoskeleton. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95: 4362—4367.

Korichneva I., Hämmerling U. 1999. F-actin as a functional target for retro-retinoids: a potential role in anhydroretinol-triggered cell death. J. Cell Sci. 112: 2521—2528.

Lazarides E. 1975. Immunofluorescence studies on the structure of actin filaments in tissue culture cells. J. Histochem. Cytochem. 23: 507—528.

Milutinovic P. S., Yang L., Cantor R. S., Eger E. I. 2nd, Sonner J. M. 2007. Anesthetic-like modulation of a γ -aminobutyric acid type A, strychnine-sensitive glycine, and N-methyl-D-aspartate receptors by coreleased neurotransmitters. Anesth. Analg. 105: 386—392.

Paas Y., Cartaud J., Recouvreur M., Grailhe R., Dufresne V., Pebay-Peyroula E., Landau E. M., Changeux J. P. 2003. Electron microscopic evidence for nucleation and growth of 3D acetylcholine receptor microcrystals in structured lipid-detergent matrices. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100: 11 309—11 314.

Pedrosa R., Soares-da-Siva P. 2002. Oxidative and non-oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine. Br. J. Pharmacol. 137: 1305—1313.

Sherer N. M., Mothes W. 2008. Cytonemes and tunneling nanotubes in cell-cell communication and viral pathogenesis. Trends Cell Biol. 18: 414—420.

Ujihara Y., Miyazaki H., Wada Sh. 2008. Morphological study of fibroblasts treated with cytochalasin D and colchicine using a confocal scanning microscopy. J. Physiol. Sci. 58: 499—506.

Поступила 14 IV 2009

THE INFLUENCE OF DOPAMINE ON THE ULTRASTRUCTURE OF BHK-21 CELLS

V. S. Shubina,^{1,} M. B. Abramova,² V. P. Lavrovskaya,² L. L. Pavlik,² E. I. Lezhnev,^{1,2} D. A. Moshkov^{1,2}*

¹ Pushchino State University, Moscow region,
and ² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region;
* e-mail: shubinavictoria@rambler.ru

The influence of dopamine on the haloperidol of BHK-21 cells being in suspension or attached to substrate was investigated. It was shown that the ultrastructural changes affected mainly the cellular loci enriched by the cytoskeleton actin such as intercellular desmosome-like contacts, microvilli and cortical layer or mesh just beneath the plasmatic membrane. The desmosome-like contacts were hypertrophied, their electron density was increased and fibrillar bridges appeared in specialized contacts. Many microvilli fused with each other and with plasma membrane of the neighboring cells, or, on the contrary, split up. Frequently, the membrane surface between microvilli and particularly their apical parts was seen to be pierced by thin thread, morphologically similar to actin filaments. The cytoplasmatic matrix onto ultrathin sections had blotched appearance and at the ultrastructural level was represented by numerous randomly oriented actin filaments. The effect of dopamine was more pronounced in the BHK-21 cells when being in suspension than in attached to the substrate ones, which presumably occurred due to known lesser differentiation of the cytoskeleton in the formers. Finally, it was established that the preliminary blockade of cellular D2 receptors with haloperidol neither affected the ultrastructure of BHK-21 cells nor prevented the following effect of dopamine. The data obtained suggest the direct interactions of dopamine with the actin cytoskeleton.

Key words: BHK-21 cells, dopamine, haloperidol, cytoskeleton.
