

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА III КОНФЕРЕНЦИЮ ОБЩЕСТВА КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

(Санкт-Петербург, 16—18 октября 2012 г.)

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ИНДУКЦИИ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ПРОГРАММЫ ИНГИБИТОРАМИ HDAC ОТ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА GADD45 α . © М. В. Абрамова,¹ О. О. Гнедина,¹ Е. А. Филиппова,¹ С. Б. Светликова,¹ В. А. Поспелов.¹ ¹ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, mav_2004@mail.ru.

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDIs) подавляют пролиферацию опухолевых клеток, индуцируя апоптоз и(или) остановку клеточного деления. Благодаря этому в настоящее время большое внимание уделяется HDIs как новому многообещающему классу противоопухолевых препаратов. Однако точные механизмы антипролиферативного действия HDIs остаются невыясненными. Мы исследовали влияние экспрессии белка Gadd45 α на способность ингибиторов гистоновых деацетилаз (HDIs) вызывать апоптотическую гибель в эмбриональных фибробластах мыши, трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras (клетки mERas). Как было показано ранее, в контрольных трансформантах HDIs вызывали необратимый блок клеточного цикла, индукцию клеточного старения и активацию антиапоптотической NF- κ B-зависимой программы. Однако оказалось, что в клетках с нокаутом по гену-мишени p53, кодирующему Gadd45 α (growth arrest and DNA damage-inducible gene, клетки Gadd45 α -/-), HDIs вызывают апоптотическую гибель. В данной работе был проведен сравнительный анализ влияния HDIs на баланс про- и антиапоптотических факторов в клетках Gadd45 α +/+ и Gadd45 α -/- mERas. Было показано, что отсутствие HDIs-индуцированного апоптоза в клетках mERas обусловлено активацией антиапоптотического транскрипционного фактора NF- κ B. В отличие от клеток Gadd45 α +/+ в клетках Gadd45 α -/- не происходит активации ингибиторами HDAC основных компонентов NF- κ B сигнального пути. Так, антиапоптотические белки XIAP и Bcl-X_L активируются HDIs в контрольных трансформантах, но они не изменяются либо даже снижаются в трансформантах Gadd45 α -/-. Хотя экспрессия проапоптотического гена *Bim* также активируется HDIs в контрольных трансформантах, в клетках Gadd45 α -/- он экспрессируется на высоком конститутивном уровне. HDIs-зависимая экспрессия проапоптотического белка *Bax* также зависит от присутствия Gadd45 α . Так, в контрольных клетках mERas экспрессия *Bax* увеличивается при действии HDIs, тогда как в клетках Gadd45 α -/- наблюдается постоянно высокий уровень белка *Bax*. При этом важно отметить, что в контрольных трансформантах накапливается цитозольный *Bax*, в то время как в

Gadd45 α -/- наблюдается постоянно высокий уровень *Bax*, связанного с митохондриями. Поскольку многие проапоптотические гены, в том числе *Bax*, являются p53-зависимыми генами, его высокое митохондриальное содержание в клетках Gadd45 α -/- позволяет предполагать роль p53 в HDIs-индуцированном апоптозе. Важно, что в клетках Gadd45 α -/- наблюдается повышенное содержание как тотального p53, так и его фосфорилированной формы по Ser-15. Полученные данные позволяют предположить, что делеция Gadd45 α , приводящая к нарушению эксцизионной репарации ДНК, тем самым вызывает активацию сигналинга DDR, в частности фосфорилирование p53. В результате постоянной активности p53 клетки Gadd45 α -/- коммитированы к апоптозу различными факторами, включая HDIs. Поэтому использование HDIs в комбинации с ингибиторами функции Gadd45 может иметь перспективы для терапии рака.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01554-а).

РАЗМЕР ГЕНОМА И СОДЕРЖАНИЕ ДНК В ХРОМОСОМАХ ТРЕХ ВИДОВ СЕРЫХ ХОМЯЧКОВ (RODENTIA, CRICETIDAE, CRICETULUS). © Н. А. Агафонова,¹ В. П. Кораблев,² Г. А. Сакута,¹ Ю. М. Розанов,¹ Б. Н. Кудрявцев.¹ ¹ФГБУН Институт цитологии РАН,¹ bn_kudryavtsev@mail.ru, и ²ФГБУН Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток.

Определен размер генома и измерено содержание ДНК в индивидуальных хромосомах трех близкородственных видов хомячков группы «barabensis». Размер диплоидного генома, измеренный с помощью проточной цитометрии в пикограммах — пг (10⁻¹² г) ДНК на ядро, составил у самцов *Cricetulus barabensis* (2n = 20) — 6.366 пг, *C. griseus* (2n = 22) 6.660 пг и *C. pseudogriseus* (2n = 24) — 6.718 пг, а у самок 6.435, 6.746 и 6.819 пг соответственно. Пластинки метафазных хромосом получали из костного мозга животных. Для определения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах вначале их идентифицировали, используя дифференциальное Q-окрашивание с помощью флуоресцентного красителя Hoechst 33258, а затем те же хромосомы после удаления красителя Hoechst окрашивали по Фельгену, используя в качестве реактива типа Шиффа этидиум бромид-SO₂. Микрофлуориметрию содержания ДНК в индивидуаль-

ных хромосомах хомячков проводили с помощью анализатора изображений. Суммарное содержание ДНК в акрицентрических хромосомах, предположительно принимавших участие в робертсоновских транслокациях, оказалось выше ($P < 0.001$), чем в соответствующих метацентрических хромосомах, образовавшихся путем центрических слияний. Содержание ДНК в большинстве гомологичных хромосом *C. barabensis*, *C. griseus* и *C. pseudogriseus* оказалось сходным. Однако в хромосоме 1, трех наиболее мелких хромосомах и X-хромосоме оно у разных видов значительно различалось. Подобная вариабельность в содержании ДНК в хромосоме 1, по-видимому, не связана с колебаниями количества гетерохроматина, поскольку его блоки в хромосомах у всех исследованных видов очень небольшие и расположены не на всех хромосомах. Возможно, колебания содержания ДНК обусловлены дупликациями, возникшими в мейозе при неравном кроссинговере. Вариабельность содержания ДНК в мелких хромосомах, наоборот, скорее связана с изменчивостью прицентромерных блоков гетерохроматина, а у X-хромосомы — с гетерохроматиновым длинным плечом. Полученные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на повышенный уровень вариабельности содержания ДНК в отдельных хромосомах, различия в размере генома у исследованных видов хомячков определяются прежде всего центрическими слияниями. Этот факт, а также то, что число хромосомных плеч в кариотипе исследованных видов хомячков постоянно ($NF = 38$), указывает на важную эволюционную роль робертсоновских транслокаций.

ТЕПЛОВОЙ ШОК ВЫЗЫВАЕТ ОСТАНОВКУ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И ИНДУЦИРУЕТ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ СТАРЕНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. © Л. Л. Алексеева, И. И. Фридлянская, В. В. Зенин, В. И. Земелько, Т. М. Гринчук, Н. Н. Никольский. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Использование мезенхимных стволовых клеток (МСК) для лечения широкого спектра заболеваний обусловлено доступностью материала для выделения этих клеток, их пролиферативной активностью в культуре, высоким дифференцировочным потенциалом, возможностью использования МСК для аллогенных трансплантаций и способностью к направленной миграции МСК в места поражения тканей.

Представляет интерес ответная реакция МСК на различные эндогенные и экзогенные стрессовые факторы. Действие экзогенных стрессовых факторов в зависимости от интенсивности воздействия могут приводить к преждевременному старению, апоптозу или некрозу в различных типах клеток. Что происходит с МСК при тепловом шоке, который является сильным индуктором апоптоза, в настоящее время до конца не выяснено.

В связи с этим целью настоящей работы является изучение воздействия повышенной температуры (45 °С, 30 мин) на МСК из дескваминированного эндометрия, которые в процессе культивирования *in vitro* проходят более 45 удвоенной популяции и сохраняют генетическую стабильность.

Исследование апоптоза окрашиванием эндометриальных МСК ДНК-связывающим красителем DAPI и методом проточной цитофлуориметрии при окраске аннексином-V показало, что через 4 ч после воздействия клеток с

апоптотическими ядрами в культуре обнаружено не было.

Распределение эндометриальных МСК по фазам клеточного цикла проводили методом проточной цитофлуориметрии. Результаты исследования показали, что через 24 ч после теплового шока количество клеток в фазе G₂/M увеличивается на 20 % по сравнению с контролем. Через 48 и 72 ч после теплового воздействия распределение клеток по фазам клеточного цикла остается неизменным. Данные о том, что эндометриальные МСК перестают пролиферировать при воздействии температуры (45 °С, 30 мин), были подтверждены построением кривых роста и методом иммуноцитохимии с помощью антител против Ki67, который является маркером пролиферации.

Клетки, подверженные преждевременному старению, выявляли по изменению их морфологии и усилению активности ассоциированной со старением β-галактозидазы. Обнаружено, что уже через 24 ч после термического воздействия количество X-Gal-позитивных клеток увеличивается на 10 % по сравнению с контролем и через 72 ч достигает 60 %.

Таким образом, данные наших исследований показали, что сублетальный термический шок вызывает не апоптоз МСК, а их преждевременное старение.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГР 16.512.11.2191.

АКТИНОВЫЙ «ЦИСТО-СКЕЛЕТ» КОМПЛЕКСА ООЦИТ—ПИТАЮЩИЕ КЛЕТКИ В ОВАРИОЛАХ *CALIPHORA ERYTHROCEPHALA* (MG.). © Т. В. Ананьина, В. Н. Стегний. Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета, tany_a@list.ru.

У двукрылых насекомых начальной стадией формирования ооцита является образование цист — кластеров из соединенных между собой цитоплазматическими мостиками клеток. Одна из клеток цисты дифференцируется как ооцит, другие клетки (трофоциты) начинают выполнять вспомогательную функцию, обеспечивая ооцит необходимыми рРНК, иРНК, многими белками и митохондриями. Физическая целостность цисты и функциональное единство образующих ее клеток поддерживается благодаря наличию общего «цисто-скелета», включающего в себя кольцевые каналы, единую сеть микротрубочек, соединяющих все клетки цисты через кольцевые каналы, и актиновые филаменты, выстилающие внутреннюю поверхность плазматических мембран клеток. Изменения, происходящие в актиновом цитоскелете отдельных клеток цисты, направлены на достижение общей цели — обеспечение правильного формирования ооцита (de Cuevas et al., 1997; Huynh, 2006).

Мы изучали изменение актинового цитоскелета в клетках цист *C. erythrocephala* на разных стадиях оогенеза. Овариолы окрашивали фаллоидином, конъюгированным с FITC. Актиновый цитоскелет клеток цист в овариолах *C. erythrocephala* состоит из кортикального слоя — непрерывной сети актиновых филаментов, выстилающей внутреннюю поверхность плазматических мембран трофоцитов и ооцита, актиновых фибрилл, находящихся в цитоплазме, и кольцевых каналов. В цистах гермария наиболее интенсивно окрашиваются кольцевые каналы, а кортикальный слой выявляется слабо. Кольцевые каналы

одной цисты различаются по размеру. Размер кольцевого канала зависит от того, в результате какого из четырех митозов он образовался. Разница в диаметрах кольцевых каналов от разных митозов может достигать 1 мкм. Максимальный размер имеют кольцевые каналы, образовавшиеся после первого митоза (4.5 ± 0.3 мкм). В отделившемся от гермария фолликуле диаметр кольцевых каналов увеличивается, при этом разница в размерах кольцевых каналов от разных митозов практически полностью исчезает при дальнейшем росте фолликула. В среднем оогенезе выстилка внутренней поверхности клеточных стенок становится неравномерной. Участки скопления F-актина в виде мелких глыбок чередуются с участками, где этот слой выражен слабо. По мере увеличения объема ооцита в цитоплазме трофоцитов начинают появляться конгломераты из F-актина. Они свободно располагаются в цитоплазме или ассоциируются со слоем кортикального актина на плазматической мембране. Начинают укрепляться области вокруг кольцевых каналов. Формирующийся вокруг кольцевого канала ореол из F-актина придает каналу дополнительную прочность и не позволяет ему деформироваться. Особого внимания заслуживают области цитоплазмы возле кольцевых каналов, соединяющих ооцит и трофоциты. Вокруг них по направлению к ядрам трофоцитов начинает формироваться сеть из толстых актиновых филаментов. Эти «амортизирующие конусы» удерживают ядра трофоцитов на расстоянии от кольцевых каналов. Конструкция из актиновых филаментов настолько прочна, что в зоне контакта с ядром трофоцита последнее начинает деформироваться. По мере увеличения объема ооцита актиновые конусы деформируются, но продолжают удерживать ядра контактирующих с ооцитом трофоцитов на значительном расстоянии от кольцевых каналов, соединяющих их с ооцитом. Изменения, происходящие в актиновом цитоскелете трофоцитов в позднем оогенезе, направлены на обеспечение правильного протекания процесса демпинга — быстрого выброса цитоплазмы трофоцитов в ооцит.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01059а).

ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ НЕОНАТАЛЬНОГО КРИПТОСПОРИДИОЗА ДЛЯ КАРДИОМИОЦИТОВ ВЗРОСЛЫХ КРЫС. © О. В. Анацкая, Н. В. Сидоренко, И. В. Матвеев, М. В. Харченко, [Т. В. Бейер], А. Е. Виноградов. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, anatskaya@mail.cytspb.rssi.ru.

Специалисты медицинского профиля все чаще подчеркивают важность анализа и синтеза онтогенетических, сравнительных, эволюционных и полногеномных исследований для поиска новых факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. Сопоставление сведений медицинской статистики и межвидовой транскриптомки кардиомиоцитов с данными сравнительной биологии онтогенезов позвоночных привело нас к предположению о том, что серьезным фактором риска заболеваний сердца могут быть гастроэнтериты, которые вызывают отток ресурсов от сердечно-сосудистой системы у взрослого и тем более растущего организма. Результаты представленной работы не только подтвердили это предположение, но и показали, что такого относительно слабого воздейст-

вия, как умеренный гастроэнтерит, достаточно для того, чтобы вызвать в кардиомиоцитах крыс сильную и долговременную полиплоидизацию и изменение состава основных сократительных белков. С помощью конфокальной микроскопии, анализа изображений, ПЦР в реальном времени и иммуноцитохимии мы показали, что у 2- и 6-месячных крыс, перенесших в 10—14-дневном возрасте умеренный 4-дневный криптоспориоз, наблюдаются гиперполиплоидизация кардиомиоцитов желудочков и сдвиг соотношения изоформ тяжелых цепей α - и β -миозина на уровне белка и на уровне мРНК в сторону изоформы β . Интересен тот факт, что через 6 мес после окончания заболевания оба эффекта были выражены сильнее, чем через 2 мес, что указывает на особенную опасность отдаленных последствий гастроэнтерита для ослабленного или стареющего организма. Учитывая тот факт, что тяжелая цепь медленного β -миозина обладает в несколько раз меньшей АТФазной активностью, чем тяжелая цепь α -миозина, а значит, способна обеспечивать сокращения гораздо меньшей силы, найденная взаимосвязь может быть интересна медикам.

ВЛИЯНИЕ ГЕНОМНЫХ ДУПЛИКАЦИЙ НА ТРАНСКРИПТОМ КАРДИОМИОЦИТОВ И ГЕПАТОЦИТОВ ПО ДАННЫМ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА. © О. В. Анацкая, А. Е. Виноградов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, anatskaya@mail.cytspb.rssi.ru.

Уровни плоидности кардиомиоцитов и гепатоцитов здоровых людей сильно варьируют: одни люди живут с преимущественно тетраплоидным сердцем и диплоидной печенью, другие — с октаплоидным или даже гексадекаплоидным сердцем и тетраплоидной печенью. Физиологическое значение и генез этих различий пока неизвестны. Для того чтобы выяснить, каким образом геномные дупликации отражаются на функции сердца и печени, мы сравнили уровни плоидности кардиомиоцитов и гепатоцитов у более чем 100 видов позвоночных с разной аэробной способностью сердца и разным функциональным потенциалом печени. Наши данные показали, что избыточная полиплоидизация связана со снижением функционального потенциала обоих органов, и вдохновили нас исследовать изменения транскриптома кардиомиоцитов и гепатоцитов, ассоциированные с полиплоидизацией. Используя методы модулярной биологии и полнотранскриптомного анализа, мы сравнили сердце и печень человека и мыши. Наши данные показали, что в обоих органах геномные дупликации усиливают биологические пути, продляющие жизнь клетки, повышают устойчивость к разного рода стрессам и приводят к изменению структуры цитоскелета. Наиболее сильным эффектом, однако, оказалась перестройка энергетического метаболизма, подобная эффекту Варбурга, т. е. активация анаэробного обмена и подавление анаэробного. В соответствии с этими изменениями тканеспецифические функции клеток были переключены на режим экономии энергии. В сердце мы обнаружили замещение энергетически емких сократительных белков белками, энергетически менее затратными. В частности, замещение тяжелой цепи α -миозина (быстрой и энергоемкой) тяжелой цепью β -миозина (медленной и энергетически выгодной). В печени мы обнаружили индукцию генов, вовлеченных в иммунитет, детоксикацию свободных радикалов и ксенобиотиков, а также многочисленные адаптации к длитель-

ному недостатку АТФ. Таким образом, наши данные позволяют предположить, что соматическая полиплоидия позволяет сделать физиологию клетки более гибкой, поскольку по сравнению с диплоидными клетками полиплоидные клетки могут одновременно запускать резервные пути производства энергии и усиливать специфические функции, переключая их на режим экономии энергии.

ДЕКОМПАКТНОЕ СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНА МЕЖДИСКА 3С6/С7 ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ КОРОТКОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ ДНК. © О. В. Андреевков, Е. И. Волкова, С. А. Демаков, В. Ф. Семешин, акад. РАН И. Ф. Жимулев. ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск.

Междиски политенных хромосом дрозофилы являются участками деконденсированного хроматина. Вопрос о причинах их декомпактного состояния и функциональном значении этих структур до сих пор остается открытым. Нами предложен перспективный подход для изучения структуры и функции междисков, основанный на использовании системы сайт-специфической гомологичной рекомбинации FRT/FLP между двумя транспозонами, содержащими FRT-сайты. Метод заключается в следующем. Изучаемая последовательность ДНК встраивается в геном дрозофилы в составе донорного транспозона rFRTV, содержащего сайты специфической рекомбинации. Акцепторный транспозон rCon(dv), расположенный в районе 84F, состоит из последовательностей ДНК, образующих одиночный диск. При сведении этих транспозонов в одном геноме с источником рекомбиназы FLP происходят вырезание тестируемой последовательности из состава донорного транспозона и ее интеграция в акцепторный транспозон по сайту FRT. Электронно-микроскопический анализ полученных линий позволяет выявить образование нового междиска в районе 84F. На примере различных последовательностей ДНК междиска из района 3С6/С7 X-хромосомы нами была показана возможность формирования автономного междиска в новом генетическом окружении. В частности, было показано, что фрагмент ДНК длиной около 900 п. н., удаляемый мутацией *fa^{swb}* из района 3С6/С7, является необходимым и достаточным для формирования автономного междиска. Последовательность длиной приблизительно 1250 п. н. этого района, из которой был удален фрагмент около 250 п. н., содержащий ДНКазal-гиперчувствительный сайт, не приводила к формированию междиска. В то же время сам по себе короткий фрагмент в 250 п. н. формировал автономный междиск в районе 84F. Таким образом, нами было показано, что декомпактное состояние хроматина междиска 3С6/С7, по-видимому, определяется присутствием последовательности в 250 п. н., содержащей ДНКазal-гиперчувствительный сайт. Тот факт, что столь короткая последовательность ДНК позволяет визуально выявить междиск в новом генетическом окружении, по-видимому, свидетельствует о том, что данная последовательность содержит элементы, запускающие декомпактизацию хроматина, прилегающего к месту встраивания.

Малые размеры данной последовательности позволяют приступить к поиску возможных факторов, ответственных за открытое состояние хроматина в междиске 3С6/С7. Согласно данным проекта modEncode, в районе

3С6/С7 наблюдается локальное снижение сигнала нуклеосомной плотности. Кроме того, в этом районе отмечены значимые пики связывания ряда инсульторных белков — CP190, CTCF и MOD(MDG4), причем максимумы предшественности этих белков во всех случаях совпадают с изучаемой нами короткой последовательностью. Вопрос о том, какие из локализуемых в этом районе белков отвечают за происходящее изменение структуры хроматина, требует дальнейшего изучения.

ДИНАМИКА СТРУКТУРНЫХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ ХРОМАТИНА В ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ СПЕРМАТИДАХ ЧЕЛОВЕКА. © Е. А. Арифудин, Е. Е. Брагина, Г. И. Кирьянов, С. А. Голышев, В. Ю. Поляков. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

В работе изучена динамика ремоделирования хроматина сперматид в процессе спермиогенеза человека. С этой целью исследованы на ультраструктурном уровне образцы спермы инфертильных доноров, в эякуляте которых присутствуют сперматиды на различных стадиях дифференцировки и материал тестикулярных биопсий, взятый у доноров с азооспермией (отсутствие сперматозоидов в эякуляте). Для идентификации стадий спермиогенеза при анализе ультратонких срезов использовали общепринятые критерии, такие как форма и размер сперматид, а также степень созревания акросомного и жгутикового компартментов.

В структурном отношении процесс ремоделирования хроматина в дифференцирующихся сперматозоидах человека можно условно разделить на 3 этапа — декомпактизация, замещение гистонов протаминами и рекомпактизация.

Первый этап, связанный с ацетилизацией гистонов и включением транзиторных белков, завершается полной декомпактизацией хроматина.

На втором этапе, связанном с заменой гистонов на протамины, в ядрах дифференцирующихся сперматид возникают локальные участки компактизации, представленные глобулярными «макрокомплексами». На основе данных иммуноцитохимии (Prigent et al., 1996) можно предположить, что высокая электронная плотность этих комплексов создается за счет структурных белков — транзиторных белков и(или) белков ядерного матрикса, в том числе топоизомеразы, и протаминов, замещающих эти белки. Ограниченное время существования этих комплексов показывает, что они являются скорее транзиторными элементами, чем структурно-функциональными доменами хроматина. На этом основании глобулярные «макрокомплексы» можно условно назвать «фабриками ремоделирования».

На третьем этапе, этапе компактизации, структурная организация хроматина существенно перестраивается. Транзиторные глобулярные комплексы значительно уменьшаются в размерах, границы между ними «размываются», в результате хроматин приобретает преимущественно фибриллярное строение с толщиной фибрилл около 40 нм. По аналогии с известными субдоменами нуклеогистонов хроматина интерфазных ядер (Zatsepina et al., 1983) мы называем фибриллы толщиной 40 нм в ядрах сперматид и сперматозоидов «нуклеопротаминовыми хромонемами». Эксперименты по гибридизации сперма-

тозоидов с культивируемыми клетками показывают, что основу нуклеопротаминовых хромомем составляют «элементарные» фибриллы толщиной около 8 нм.

Завершается этап компактизации в эпидимусе, где нуклеопротаминовый хроматин за счет формирования межмолекулярных дисульфидных связей переходит в состояние однородной по плотности массы, в которой не удастся идентифицировать отдельных структурных элементов.

Попытки реконструировать глобулярные комплексы с помощью искусственной декомпактизации ядер зрелых сперматозоидов не привели к положительному результату, что свидетельствует о кардинальной «переупаковке» хроматина после завершения работы «фабрик ремоделирования».

Полученные в работе данные позволяют предложить динамическую модель организации нуклеопротаминового хроматина в сперматозоидах человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект: 09-04-01430-а).

СПОСОБНОСТЬ АНТИЯДРЫШКОВЫХ АУТОАНТИТЕЛ ПРОНИКАТЬ В ЯДРА ЖИВЫХ КЛЕТОК ПРИ АУТОИММУННЫХ ПАТОЛОГИЯХ У МЫШЕЙ.
© А. С. Арефьева, М. С. Красильщикова, О. В. Зацепина. ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, quality4@rambler.ru.

Для моделирования аутоиммунных патологий человека в лабораторных условиях обычно используют генетически однородных инбредных мышей, предрасположенных к развитию аутоиммунных процессов, а в последнее время — генетически разнородных мышей аутбредных стоков, которых регулярно подвергают воздействию сублетальных доз $HgCl_2$. Одними из основных признаков аутоиммунных патологий в обоих случаях являются повышение уровня сывороточных иммуноглобулинов классов IgG1 и IgE и выработка аутоантител к антигенам ядрышка, в первую очередь фибрилларину. Однако вопрос о цитотоксичности аутоиммунных антител остается открытым, а данные о возможности их проникновения в живые клетки различных органов и тканей — противоречивыми.

В настоящей работе для ответа на эти вопросы мы проанализировали локализацию иммуноглобулинов в клетках почек, печени и селезенки инбредных мышей линии SJL/J и мышей аутбредного стока CFW. Для этого мышам опытных групп инъекцировали $HgCl_2$ (на физиологическом растворе) в концентрации 1.6 мг/кг дважды в неделю. Животных умерщвляли через 6 нед после начала эксперимента, что соответствует пику аутоиммунного ответа. В качестве контроля использовали мышей, которым инъекцировали только раствор NaCl и у которых аутоантитела не вырабатывались. В ходе аутопсии выделяли почки, печень и селезенку, которые с помощью криомикротомы при $-20\text{ }^\circ\text{C}$ резали на срезы толщиной 5 мкм. Криосрезы фиксировали в 4%-ном параформальдегиде, инкубировали с ФИТЦ-конъюгированными антителами к суммарным (IgG+IgM+IgA) иммуноглобулинам мыши, докрашивали красителем ДАПИ на хроматин и изучали в эпифлуоресцентном микроскопе.

Полученные результаты показали, что в ядрах клеток всех органов, полученных от аутоиммунных аутбредных мышей, присутствуют гомогенноокрашенные яркофлуоресцирующие локусы. Для идентификации локусов криосрезы дополнительно обрабатывали кроличьими поликлональными антителами к фибрилларину, а затем антителами к IgG кролика, конъюгированными с Техасским красным. Микроскопический анализ препаратов показал полное совпадение локусов с ядрышками. В клетках животных контрольных групп в ядрышках IgG мыши отсутствовали. На специфичность локализации иммуноглобулинов указывал также тот факт, что в клетках органов инбредных мышей IgG в ядрышках не выявлялись.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о способности аутоантител, вырабатывающихся у аутбредных мышей в ответ на инъекции хлорида ртути, проникать внутрь клеток, ядер и ядрышек различных органов. Отсутствие тканеспецифичности в локализации аутоантител говорит о том, что у аутбредных животных рецепторы, связывающие антитела, присутствуют в разных типах клеток, а в клетках инбредных мышей они отсутствуют. Логично предположить, что аутоантитела, проникающие внутрь клеток, могут обладать большей цитотоксичностью по сравнению с таковыми у аутоиммунных инбредных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Госконтракт № 14.740.11.0116).

ВЗАИМОРАСПОЛОЖЕНИЕ РАЙОНОВ ПРИКРЕПЛЕНИЯ X-ХРОМОСОМЫ И ХРОМОСОМЫ 3 К ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКЕ ТРОФОЦИТОВ И КЛЕТОК ФОЛЛИКУЛЯРНОГО ЭПИТЕЛИЯ МАЛЯРИЙНОГО КОМАРА *ANOPHELES MESSEAE* FALL. © Г. Н. Артемов, С. М. Бондаренко, В. Н. Стегний. Томский государственный университет, center_cu@res.tsu.ru.

Хромосомы во внутриядерном пространстве упорядочены и занимают дискретные хромосомные территории (Cremer et al., 2002, 2003, 2006), богатые генами хромосомы расположены ближе к центральной части ядра, а хромосомы с небольшим числом генов — ближе к периферии (Croft et al., 1999). Подобным образом в пределах одной хромосомной территории располагаются субхромосомные домены (Kupper et al., 2007). Упорядоченное расположение хромосом во внутриядерном пространстве обеспечивается взаимодействием хромосом со структурными элементами ядра и прежде всего с ядерной оболочкой. Изучение механизмов возникновения, поддержания и изменения этих контактов имеет большое значение, так как позволит выявить, каким образом пространственная организация ядерного генома обеспечивает его функционирование. В трофоцитах яичников малярийных комаров хромосомы взаимодействуют с ядерной оболочкой районами, которые имеют дискретные морфологические признаки (Стегний, 1979). У *Anopheles messeae* Fall. только X-хромосома и хромосома 3 крепятся к ядерной оболочке трофоцитов, в то время как хромосома 2 не имеет выраженных контактов с оболочкой (Стегний, 1979). Целью настоящей работы было определить, как организованы в пространстве районы прикрепления X-хромосомы и 3R-хромосомы относительно друг друга в клетках генеративной и соматической систем. Для оценки простран-

ственной организации был использован метод 3D FISH ДНК из районов прикрепления X-хромосомы и 3R-хромосомы трофоцитов *An. messeae* (Артемов и др., 2010, 2011) с хроматином недавних ядер трофоцитов (генеративная система) и фолликулярного эпителия (соматическая система). Результаты гибридизации регистрировали с помощью люминесцентного микроскопа AxioImager Z1 (Carl Zeiss, Германия) с модулем ApoTome и программным обеспечением AxioVision 4.8.1 (Carl Zeiss, Германия). В полученных трехмерных реконструкциях ядер были определены координаты точек центра ядра и точек прикрепления хромосом к ядерной оболочке. Так как ядра трофоцитов и фолликулярного эпителия значительно различаются по размеру, с целью оценки расстояния между районами прикрепления хромосом были измерены угол между прямыми, соединяющими центр ядра, и соответствующий район прикрепления (Артемов и др., 2010). Таким образом, были получены значения углов для ядер трофоцитов и фолликулярного эпителия. У трофоцитов значения углов варьировали в довольно широких пределах: 51 ± 3 % ядер имели угол $60\text{--}120^\circ$, 17 ± 2.5 % ядер — $121\text{--}180^\circ$ и лишь 32 ± 3 % ядер — $0\text{--}59^\circ$. В фолликулярном эпителии распределение углов имело несколько иной характер. Большинство ядер (96 ± 2 %) имело угол $0\text{--}120^\circ$ и лишь 4 ± 2 % — $121\text{--}180^\circ$. Интересно также, что если в трофоцитах у 3R хромосомы гомологи в центромере асинаптируют и мы наблюдали два локальных сигнала, соответствующие районам прикрепления, то в некоторых ядрах фолликулярного эпителия сигналы были диффузно распределены у периферии. В среднем более сближенное расположение районов прикрепления X-хромосомы и хромосомы 3 в соматических клетках может быть связано с Рэбл-ориентацией хромосом. Различия в пространственной организации хромосом в трофоцитах и клеток фолликулярного эпителия авторы связывают с различиями в функциональном статусе и эволюционном значении клеток генеративной и соматической систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ по государственной поддержке молодых ученых — кандидатов наук (проект МК-4158.2012.4) и гранта поддержки молодых ученых компании ОПТЭК.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА У *NEUROSPORA CRASSA*. © Т. А. Белозерская, Н. Н. Гесслер, Е. П. Исакова, Ю. И. Дерябина. ФГБУН Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, tab@inbi.ras.ru.

Окислительный стресс запускает процессы дифференцировки у грибов. Увеличение концентрации внутриклеточных АФК, предшествующее дифференцировке клеток, происходит под действием внешних стрессорных агентов. Наиболее подробно исследованными являются светозависимые процессы дифференцировки (формирование репродуктивных структур, биосинтез каротиноидных пигментов) у гриба-аскомицета *Neurospora crassa*. Гетеродимерный фоторецепторный комплекс White collar complex (WCC) в клетках этого гриба контролирует все реакции на свет в сине-фиолетовой области спектра (350—500 нм). Он состоит из двух мультидоменных белков White collar-1 (WC-1) и White collar-2 (WC-2). Белок WC-1 содержит LOV-домен (Light, Oxygen, Voltage), не-

ковалентно связывающий ФАД и непосредственно осуществляющий фоторецепторную функцию, а WC-2 выполняет в комплексе стабилизирующую роль (Крицкий и др., 2005). У мутантов *white collar-1* и *white collar-2* (*wc-1* и *wc-2*) ингибируются все известные реакции на действие света в сине-фиолетовой области спектра, включая синтез каротиноидов и стимуляцию полового и бесполого воспроизведения. WCC контролирует также некоторые темновые процессы, главным из которых является регуляция циркадных ритмов (Крицкий и др., 2005). В ходе трансдукции сигнала света, приводящего к дифференцировке, должен быть обеспечен внутриклеточный баланс АФК за счет функционирования антиоксидантных защитных механизмов (АЗ).

Ранее нами было показано, что у мутантов по фоторецепторному комплексу (*wc1* и *wc2*) по сравнению с диким типом реакция АЗ различалась не только на свет, но и на действие других стрессорных факторов, повышающих внутриклеточный уровень оксидантов (тепловой шок, менадион). Мутантные штаммы характеризуются повышенной активностью каталазы и разнообразием ее молекулярных форм (Гесслер и др., 2006), а также более весомым вкладом альтернативной оксидазы в общее дыхание клеток (Исакова и др., 2010). Целью настоящей работы было сравнение уровня АФК в клетках дикого типа и мутантов с нарушенным фоторецепторным комплексом.

Об уровне внутриклеточного уровня АФК судили по флуоресценции окисленной формы 2'-7'-дихлородигидрофлуоресцеина диацетата (H_2 -DCFDA) 2'-7'-дихлородигидрофлуоресцеина (DCF).

Индуцированное внутриклеточными АФК окисление H_2 -DCFDA у дикого типа гриба не менялось в течение 120 мин измерения и было значительно ниже, чем у *wc-1* и *wc-2*, в 6 и 17 раз соответственно.

Таким образом нарушение функционирования фоторецепторного комплекса в клетках *N. crassa* оказывает влияние как на процессы дифференцировки, так и существенным образом отражается на накоплении кислородных радикалов в клетках гриба.

Список литературы

- Крицкий М. С., Белозерская Т. А., Соколовский В. Ю., Филиппович С. Ю. 2005. Молекулярная биология. 39 : 602—617.
 Гесслер Н. Н., Леонович О. А., Рабинович Я. М., Рудченко М. Н., Белозерская Т. А. 2006. Прикладная биохимия и микробиология. 43(3) : 332—337.
 Исакова Е. П., Дерябина Ю. И., Гесслер Н. Н., Белозерская Т. А., Рабинович Я. М. 2010. Прикладная биохимия и микробиология. 46(3) : 348—354.

ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНЫЙ АППАРАТ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК. © Е. В. Бигдай,^{1,3} В. О. Самойлов,^{1,3} С. А. Панов,² Б. А. Дудич.³ ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, cell@infran.ru, ² Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, и ³ С.-Петербургский государственный политехнический университет.

Обонятельные клетки всех видов животных на апикальной поверхности снабжены жгутиками (ОЖ), обладающими подвижностью как вне, так и под действием пахучих стимулов (одорантов).

Роль опорно-двигательного аппарата ОЖ в их движениях исследовали методом прижизненной телевизионной

микроскопии в реальном времени на изолированной обонятельной выстилке лягушек *Rana temporaria*, белых лабораторных крыс и человека. Данные видеоизображения анализировались с помощью визуального анализа, а также с помощью уникальных компьютерных программ, позволивших получить объективные критерии оценки перехода неупорядоченного движения ОЖ в упорядоченное. Этими критериями служили анализ Фурье, расчет показателей энтропии и построение траектории движения дистального отдела ОЖ в плоскости, перпендикулярной его движению (фигуры, подобные фигурам Лиссажу).

Для исследования участия тубулин-динеиновой молекулярной системы в подвижности ОЖ препараты обонятельной выстилки инкубировали в растворе колхицина (1 мМ), а актин-миозиновой — в растворе цитохалазина (4 мкг/л).

Визуальный анализ видеоизображения показал, что в отсутствие одорантов движения ОЖ неупорядоченны и напоминают движения кнута в руке погонщика. Вместе с тем дистальные отделы жгутика проявляли и кратковременные направленные активные движения. Фармакологический анализ двигательной активности ОЖ выявил, что неупорядоченные движения обеспечиваются функционированием тубулин-динеиновой молекулярной системы подвижности, сосредоточенной в проксимальном отделе жгутика, поскольку после ее разрушения колхицином движения ОЖ прекращаются. Вместе с тем дистальный отдел лишен полноценного цитоскелета. Следовательно, в основе кратковременного упорядочения движений ОЖ в отсутствие одорантов лежит реорганизация цитоскелета в дистальном отделе жгутика: происходит поляризация G-актина. Этот вывод подтверждается данными фармакологического анализа, когда при ингибировании полимеризации актина под влиянием цитохалазина энтропия увеличивалась, что свидетельствует об увеличении степени неупорядоченности. Под действием одорантов характер двигательной активности ОЖ меняется: движения упорядочиваются. При этом дистальный конец приобретает направленное движение в градиенте концентрации одорантов. Мы показали, что упорядочение обеспечивается полимеризацией актина, инициируемой одорантами. Это подтверждается при инкубации обонятельной выстилки цитохалазином, когда упорядочение исчезает.

Таким образом, опорно-двигательный аппарат обонятельных жгутиков включает в себя две молекулярные системы подвижности — тубулин-динеиновую и актин-миозиновую. Теперь выяснилось, что и вне действия одорантов актиновые филаменты формируются, но они не способны обеспечить активные движения дистального отдела ОЖ в сторону источника запаха. Однако их непрерывное образование и распад создают предпосылки для полимеризации F-актина при появлении в среде одоранта. Сложный процесс перестройки цитоскелета направлен на обеспечение направленного движения клеток в градиенте концентрации химических веществ, т. е. хемотаксис. Можно предположить, что обонятельные клетки, не имея возможности мигрировать, определяют градиент сигнальных молекул посредством упорядоченного движения своих ОЖ.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИ-

КОВ IN VITRO В УСЛОВИЯХ ПОНИЖЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОРОДА. © П. И. Бобылева, И. В. Андрианова, Е. Р. Андреева, Л. Б. Буравкова. ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, blastoblast@gmail.com.

В ряде исследований, проведенных в том числе и в нашей лаборатории, показано, что понижение концентрации кислорода способствует изменению свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК), в частности дифференцировочного и пролиферативного потенциалов ММСК. Менее изученным остается вопрос о влиянии концентрации кислорода на связанные с поддержанием гемопозитических предшественников стромаобразующие свойства ММСК. В данной работе в модели *in vitro* изучалось взаимодействие ММСК из жировой ткани (жтММСК) и гемопозитических клеток из фракции мононуклеаров пуповинной крови (пкМНК) при различной концентрации O₂.

жтММСК и пкМНК сокультивировали 72 ч при 20 и 5 % O₂ в среде культивирования. Видеомикроскопическое исследование проводили на микроскопе Nikon Eclipse TiU (Япония). При помощи проточного цитофлуориметра Beckman Coulter EPICS XL анализировали экспрессию молекул адгезии (после иммуноцитохимического окрашивания) и жизнеспособность (после окрашивания Annexin V и Propidium Iodide). Количество коммитированных гемопозитических предшественников среди неадгезированных пкМНК оценивали по образованию колоний в полужидкой среде MethoCult H4434 (StemCells, США).

Прикрепление пкМНК к жтММСК происходило в 1-е сут сокультивирования с одинаковой эффективностью при 5 и 20 % O₂ и сопровождалось повышением интенсивности экспрессии молекул адгезии CD44 и CD54 на стромальных клетках. В дальнейшем количество прикрепленных пкМНК практически не изменялось. Темпы экспансии жтММСК при обеих концентрациях кислорода были сходными. Сокультивирование при 5 и при 20 % O₂ не влияло на жизнеспособность жтММСК, а доля живых пкМНК была высокой среди как адгезированных, так и неадгезированных клеток, тогда как в отсутствие мезенхимного фидера наблюдалась высокая доля погибших пкМНК. Исследование колониеобразования показало, что сокультивирование с жтММСК при 5 и при 20 % O₂ в одинаковой мере способствовало поддержанию гемопозитических предшественников. При этом бурстобразующие единицы (БОЕ-Э) значительно преобладали над миелоидными предшественниками. При 5 % O₂ происходило снижение доли миелоидных КОЕ и увеличение доли БОЕ-Э, и эти значения выравнивались с таковыми для 20 % O₂, а сокультивирование при 20 % O₂ приводило к увеличению количества КОЕ-Г. После 72 ч сокультивирования среди неприкрепленных пкМНК увеличивалась доля Т-клеток, уменьшалась доля В-лимфоцитов и ЕК-клеток. Клетки Т-ЕК и HLA-DR⁺ (активированные Т-лимфоциты) как до, так и после сокультивирования практически отсутствовали. Доля Т-клеток, экспрессировавших CD25 и CD69 (маркеры ранней активации), сохранялась на низком уровне, а доля клеток CD45⁺CD14⁺ (моноцитов) снижалась.

Таким образом, как при 5, так и 20 % O₂ жтММСК обеспечивали эффективное прикрепление и распластывание пкМНК за счет экспрессии специализированных молекул адгезии и поддерживали жизнеспособность прикрепленных и оставшихся в суспензии пкМНК, не

вызывая активации зрелых лимфоцитов. Сокультивирование с жтММСК способствовало поддержанию коммитированных гемопоэтических предшественников, направление дифференцировки которых зависело от концентрации кислорода в среде культивирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01158-а).

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАТЕРАЛЬНЫХ ПЕТЕЛЬ ХРОМАТИНА В МЕЙОТИЧЕСКОЙ ХРОМОСОМЕ ЧЕЛОВЕКА © Ю. Ф. Богданов,¹ В. Е. Спангенберг,¹ И. И. Витязева,² С. В. Боголюбов,² С. Я. Дадашев,¹ О. Л. Коломиец.¹
¹ФГБУН Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН и ²ФГБУ Эндокринологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, Москва.

Для исследования способа прикрепления ДНК к латеральным элементам синаптонемного комплекса (СК) в сперматоцитах человека были использованы коммерческие образцы ДНК. Они представляли собой два фрагмента: один длиной 90 т. п. н. с геном *LIS1* и маркером *D17S2067* из района 17p13 и второй длиной в 160 т. п. н., из района 17p11.2 с геном *RAI1* и маркером *D17S620*.

Методом FISH на препаратах распластанных СК, полученных из материала биопсии семенников пациентов, мы установили, что зонд длиной 90 т. п. н. образует тельце хроматина в субтеломерной области СК короткого плеча хромосомы 17, окрашенного флуоресцентными антителами к белку SYCP3. Морфология этого тельца мало меняется по ходу профазы I мейоза от стадии лептотены до диплотены. Такое «закрытое» состояние хроматина весьма характерно для субтеломерных районов хромосом.

Зонд 160 т. п. н. ДНК также образует латеральное тельце хроматина на СК хромосомы 17, но в проксимальной части короткого плеча. В зависимости от субстадии профазы I мейоза конфигурация этого латерального тельца хроматина была различной. Во время зиготены флуоресцентный сигнал зонда формировал по одной палочке длиной около 6 мкм на обеих сторонах СК и перпендикулярных продольной оси СК. В ранней пахитене каждая палочка трансформировалась в глобулу. В поздней пахитене каждая глобула превращалась в две рыхлые глобулы, содержащие клубки нитей. В диплотене глобулы, наконец, превращались в тонкие петли ДНК (хроматина), длина которых от основания до вершины петли составляла приблизительно 10 мкм с периодическими утолщениями (бусинами) по длине этой петли. В результате этих динамических превращений по каждую сторону от СК хромосомы 17 на стадии диплотены формировались по две петли хроматина – петли сестринских хроматид. Таким образом, в данном сайте бивалента хромосомы 17 наблюдались петли полного набора четырех хроматид (Богданов и др., 2012).

В результате мы впервые наблюдали истинные латеральные петли открытого хроматина в профазе I мужского мейоза у человека вместо традиционно постулируемых «петель» в тех исследованиях, где наблюдались конденсированные палочковидные или щетинковидные «выросты» хроматина на латеральных элементах синаптонемных комплексов (Pigozzi, 2007, и др. публикации). Открытые конфигурации петель хроматина, наиболее

вероятно, зависят от активации транскрипции во время поздней пахитены и диплотены и напоминают в миниатюре петли хромосом-ламповых щеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00666-а).

Список литературы

Богданов Ю. Ф., Спангенберг В. Е., Дадашев С. Я., Витязева И. И., Боголюбов С. В., Коломиец О. Л. 2012. Морфологическое проявление в профазе I мейоза человека уникального сегмента ДНК. Цитология. 54 (8) : 603—608.

Pigozzi M. I. 2007. Localization of single-copy sequences on chicken synaptonemal complex spreads using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). 119 (1—2) : 105—112.

ДИНАМИКА ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ КАРИОСФЕРЫ ООЦИТОВ ДВУХ ВИДОВ ЖУКОВ-ЧЕРНОТЕЛОК. © Д. С. Боголюбов, Ф. М. Баталова, А. М. Киселев, И. С. Степанова, [В. Н. Парфенов]. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, dmitr@mail.cytspb.rssi.ru.

Кариосфера, или кариосома, — уникальная структура ядер ооцитов многих беспозвоночных и позвоночных животных, включая человека. Она формируется на стадии диплотены мейоза за счет объединения всех хромосом в ограниченном участке крупного ядра ооцита. Процесс формирования кариосферы, который, как принято считать, является отражением инактивации транскрипционной активности хромосом, обычно сопровождается конденсацией хроматина. В ряде случаев хромосомы, объединенные в кариосферу, оказываются изолированными от остальной нуклеоплазмы особой экстрахромосомной капсулой. Мы исследовали морфологические особенности и динамику развития кариосферы в ооцитах двух видов лабораторных насекомых — *Tenebrio molitor* и *Tribolium castaneum* (Coleoptera-Polyphaga: Tenebrionidae). Для характеристики транскрипционной активности хромосом применяли микроинъекции в ооциты бромо-УТФ, а также иммуноэлектронную микроскопию с использованием антител к РНК-полимеразе II, белку ТВР (ТАТА-связывающей субъединице транскрипционного фактора TFIID) и транскрипционному фактору TFIIN — одному из ведущих компонентов голоэнзима. У исследованных видов выявлены неожиданные различия как в структурной организации кариосферы, так и в уровне транскрипционной активности хромосом. У *T. molitor* происходит значительная конденсация хроматина; при этом индивидуальные хромосомы постепенно перестают морфологически различаться, объединяясь в единую массу. Типичная фиброзная капсула кариосферы отсутствует; тем не менее хроматин ассоциирован с фибриллярно-гранулярным материалом, содержащим, по нашим прежним данным (Vogolyubov, Parfenov, 2001), некоторые молекулярные компоненты кластеров интерхроматиновых гранул. Опыты с инъекциями бромо-УТФ показали, что хромосомы ооцитов *T. molitor* транскрипционно активны лишь на стадиях, предшествующих формированию кариосферы (ранний превителлогенез, стадии 2—3 по: Ullmann, 1973). В ходе развития кариосферы их активность резко снижается вплоть до практически полного выключения из процесса

транскрипции. Иную динамику демонстрируют хромосомы ооцитов *T. castaneum*. Несмотря на формирование компактной кариосферы, значительной конденсации хромосом не наблюдается. Опыты с бромо-УТФ продемонстрировали сохранение хромосомами ооцитов *T. castaneum* их транскрипционной активности вплоть до позднего вителлогенеза (стадии 7—8 по нашей классификации). Обработка препаратов антителами (в том числе на ультраструктурном уровне) выявила в перихроматиновых зонах кариосферы ооцитов *T. castaneum* гиперфосфорилированную (элонгирующую) форму РНК-полимеразы II, а также базальные транскрипционные факторы TFIIID и TFIIH. Эти данные служат дополнительным свидетельством в пользу сохранения хромосомами транскрипционной активности на заключительных этапах роста ооцитов *T. castaneum*. В отличие от *T. molitor* развитие кариосферы в ооцитах *T. castaneum* сопровождается образованием сложной экстрахромосомной капсулы. Не исключено, что капсула формируется для изоляции транскрипционно активного хроматина и отсутствует, если хромосомы инактивированы. Однако, почему возникают различия в строении и функциональной динамике кариосферы в ооцитах видов, принадлежащих к одному семейству и характеризующихся сходными особенностями строения женских гонад и биологии в целом, пока неясно.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01258) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.
© А. В. Бородинкина, А. Н. Шатрова, Н. А. Пуговкина, Е. Б. Бурова. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В последнее время бурно развиваются фундаментальные исследования как эмбриональных, так и тканеспецифичных стволовых клеток в связи с их возможным применением в регенеративной медицине. Стволовые клетки обладают высоким пролиферативным потенциалом, способностью к самообновлению и при определенных условиях дифференцируются в различные специализированные клетки. Однако перспективы терапевтического использования стволовых клеток во многом зависят от их устойчивости к стрессовым воздействиям различного рода. Одним из наиболее распространенных типов стресса у живых организмов является окислительный стресс, который вызывает различные окислительные повреждения белков и ДНК, в итоге приводящие к старению, апоптозу и (или) опухолевой трансформации клеток. В данной работе исследовали реакцию на окислительный стресс эмбриональных и тканеспецифичных (из десквамированного эндометрия) стволовых клеток человека, полученных и охарактеризованных сотрудниками нашего отдела. В то время как проблема устойчивости эмбриональных стволовых клеток на стресс широко дискутируется в литературе, в отношении стволовых клеток эндометрия такие данные отсутствуют. Окислительный стресс в исследуемых клетках моделировали действием перекиси водорода (H_2O_2) в широком диапазоне концентраций (50—2000 мкМ) в течение 1 ч с последующим удалением

H_2O_2 из среды. Долю клеток, выживших после окислительного стресса, определяли с помощью МТТ-теста по уровню дегидрогеназной активности митохондрий живых клеток, а также методом проточной цитофлуориметрии по окрашиванию ДНК погибших клеток иодистым пропидием. Жизнеспособность на первом этапе исследований традиционно оценивали по величине LD_{50} , соответствующей концентрации H_2O_2 в ростовой среде, при действии которой через 24 ч выживает 50 % клеток. В ходе экспериментов было обнаружено, что H_2O_2 в одинаковой концентрации по-разному влияла на выживаемость в зависимости от количества клеток на чашке. При посеве стволовых клеток эндометрия в количестве $1.2 \cdot 10^5$ величина LD_{50} составила 1000—1500 мкМ, тогда как для $2.8 \cdot 10^4$ клеток — 650—700 мкМ. Такая же закономерность наблюдалась для эмбриональных стволовых клеток: при посеве $1 \cdot 10^6$ и $4 \cdot 10^5$ клеток значения LD_{50} определены как 600—700 и 350—400 мкМ соответственно. Причина наблюдаемых различий в выживаемости клеток в наших экспериментах стала понятной при расчете удельного количества H_2O_2 на клетку, которое в зависимости от количества клеток оказалось разным при одних и тех же молярных концентрациях. Поэтому в дальнейшем для оценки эффекта H_2O_2 на жизнеспособность клеток мы использовали параметр LD_{50} , соответствующий количеству H_2O_2 в расчете на клетку (пМ/кл.), при действии которой через 24 ч выживает 50 % клеток. Используя этот подход, для стволовых клеток эндометрия была определена величина $LD_{50} = 11—14$ пМ/кл. (метод проточной цитометрии) и 16—18 пМ/кл. (МТТ). Эмбриональные стволовые клетки оказались более чувствительными к действию H_2O_2 : $LD_{50} = 0.9—1.2$ и $1.0—1.2$ пМ/кл. (методы проточной цитометрии и МТТ соответственно). На основании полученных результатов мы заключаем, что стволовые клетки эндометрия характеризуются гораздо большей устойчивостью к действию H_2O_2 по сравнению с эмбриональными стволовыми клетками. Высокая степень резистентности стволовых клеток эндометрия позволяет рассматривать их в одном ряду с описанными в литературе мезенхимными стволовыми клетками из костного мозга и их реакцией на окислительный стресс.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01581-а).

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ СИНТЕЗА И СЕКРЕЦИИ ANP В ГРАНУЛАХ ПРЕДСЕРДНЫХ МИОЦИТОВ КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ФАКТОРОВ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ. © М. Л. Бурова,¹ Д. А. Абросимов.²
¹Центральная научно-исследовательская лаборатория Нижегородской государственной медицинской академии, marysmir@mail.ru, и ²Биологический факультет Нижегородского государственного университета.

Предсердный натрийуретический пептид (ANP), вырабатываемый в миоцитах правого предсердия (ПП), является одним из регуляторов сердечно-сосудистого гомеостаза, способный быстро снижать уровень артериального давления (АД) благодаря своему диуретическому, натрийуретическому и вазодилататорному действию. Кроме того, ANP снижает концентрацию ренина и альдостерона в крови, обладает противовоспалительным и кар-

диопротекторным свойствами. По соотношению и количеству гранул разных типов, содержащих пептид, можно оценить интенсивность синтеза и секреции ANP в миоцитах ПП: гранулы А-типа («зрелые»), имеющие четко очерченную мембрану и осмиофильное содержимое, и гранулы В-типа («растворяющиеся») с «размытой» периферией и менее электронно-плотным содержимым. Несмотря на 30-летний опыт исследований ANP, вопрос о влиянии различных факторов на его синтез и секрецию остается актуальным.

Цель исследования — оценить интенсивность процессов синтеза, накопления и секреции ANP в предсердных миоцитах крыс под воздействием факторов ишемии/реперфузии после 10-минутной остановки кровообращения.

Эксперименты проведены на 15 белых нелинейных крысах-самцах, массой 200—250 г. Тотальную ишемию (10 мин) моделировали путем пережатия сердечно-сосудистого пучка по методу В. Г. Корпачева. Электронно-микроскопический анализ образцов ткани ПП интактных и экспериментальных животных (первые минуты реперфузии и 60 мин постреперфузионного периода) проводили по стандартной методике. Материал фиксировали в 2.5%-ном растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (рН 7.4) и в 1%-ном растворе OsO₄ с последующей заливкой в смесь Эпона с Аралдитом. Клеточную локализацию ANP выявляли на ультратонких срезах с помощью поликлональных антител к ANP (Rabbit anti-Atrial Natriuretic Factor (1-28) (rat), Peninsula Laboratories, LLC, Bachem) и вторых антител Protein-A/Gold (15 nm) (EM Grade, Electron Microscopy Sciences). После проведения реакций срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе Morgagni 268D фирмы FEI. Гранулы А- и В-типов с пептидом в миоцитах ПП считали в полях зрения (38×38 мкм). Результаты оценивали с помощью критерия Манна—Уитни ($P < 0.05$).

В первые минуты реперфузии, несмотря на резкий скачок АД, количество гранул А- и В-типов с ANP — иммунореактивным материалом — достоверно не отличалось от интактной серии. Полученные результаты противоречили общепризнанному мнению о мгновенном выбросе ANP в ответ на стимуляцию барорецепторов при кратковременном повышении АД.

На 60-й мин постреперфузионного периода морфометрический анализ показал увеличение числа гранул А-типа на 30 %, гранул В-типа на 45 % и их общего количества на 36 % соответственно, что свидетельствовало об интенсивном синтезе и секреции ANP в этот период. Из экспериментальных данных, полученных нами ранее, известно, что АД в этот период стабилизировалось, поэтому не могло влиять на выброс пептида. В то же время, по данным литературы, показано стимулирующее влияние гипоксии и ишемии на выброс ANP.

Таким образом, выявлено доминирующее влияние факторов ишемии/реперфузии на интенсивность процессов синтеза и секреции ANP в условиях целостного организма.

РОЛЬ КИСЛОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОГО И ИММУНОМОДУЛЯТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛОВ СТРОМАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК. © Л. Б. Буравкова. ФГБУН ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва.

Широкий спектр физических и химических факторов микроокружения *in vivo* определяет пластичность и гетерогенность популяций прогениторных клеток в различных тканевых нишах взрослого организма. Моделирование некоторых из этих факторов может быть использовано для модификации дифференцировочного потенциала и неспецифической субселекции этих клеток из гетерогенной популяции, получаемой при выделении из различных тканевых источников. При этом в более ранних предшественниках может запускаться транскрипционная программа дифференцировки и старения. В настоящее время можно с большой долей уверенности сказать, что контроль самоподдержания и мультипотентности стволовых клеток осуществляется при пониженном энергообеспечении, в том числе и за счет низкого уровня кислорода в среде, которое поддерживает так называемые первичные сигнальные пути и транскрипционные факторы, что позволяет стволовым клеткам успешно выживать и воспроизводиться, при этом коммитирование и дифференцировка тормозятся. Необходимо отметить, что такое торможение развивается не по принципу «все или ничего», а является обратимым.

Интересным с точки зрения формирования тканевых ниш является взаимодействие стволовых клеток разного генеза и степени коммитирования между собой и с дифференцированными клетками микроокружения. Именно такое взаимодействие определяет самоподдержание прогениторных клеток и(или) направление их дифференцировки. На модели сокультивирования аллогенных прогениторных клеток показано, что в условиях пониженного содержания кислорода мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) *in vitro* активно поддерживают гемопоэз и усиливают образование очагов кроветворения с последующей дифференцировкой гемопоэтических предшественников. При этом повышается доля стромальных клеток, экспрессирующих VCAM-1 и активируется продукция интерлейкинов (IL-6 и IL-8).

Известно, что ММСК обладают уникальными иммуномодулирующими свойствами, обусловленными их неиммуногенностью и способностью к подавлению пролиферации и активации лимфоцитов. При сокультивировании с ММСК происходило изменение популяционного состава иммунокомпетентных клеток за счет уменьшения доли ЕК- и ТЕК-клеток, увеличения доли CD34⁺-клеток, а также снижение активации Т-клеток. Понижение содержания кислорода дополнительно подавляет способность Т-клеток к презентации антигенов HLA-DR. Анализ собственных и литературных данных указывает на то, что при межклеточном взаимодействии ММСК и различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток задействованы механизмы как контактного, так и опосредованного взаимодействия. Динамические изменения уровня цитокинов, факторов роста и кислорода создают уникальные ниши при таком взаимодействии.

Межклеточные контакты прогениторных и дифференцированных клеток сопровождаются существенными сдвигами в соотношении про- и противовоспалительных медиаторов в сторону последних (ФНО- α , ИЛ-1- β vs. ИЛ-10, ИФН- γ), что в свою очередь может изменять паракринную регуляцию иммунного ответа лимфоцитов, приводя в конечном итоге к его подавлению. При отсутствии непосредственных контактов «клетка—клетка» эти иммуномодулирующие изменения были менее выражены. Стоит отметить, что взаимодействие с иммунными

клетками существенно модулирует пролиферативные и дифференцировочные потенции ММСК.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РАЙОНОВ ПРИЦЕНТРОМЕРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА ХРОМОСОМ В ЯДРАХ ТРОФОЦИТОВ *DROSOPHILA VIRILIS*. © И. Э. Вассерлауф, К. Е. Усов, В. Н. Стегний. Томский государственный университет, gene@res.tsu.ru.

Гетерохроматин эволюционно лабилен и является наиболее быстро изменяющейся частью генома эукариот, так как состоит главным образом из повторяющихся последовательностей и содержит многочисленные копии мобильных генетических элементов. Предполагают, что видовые различия в архитектонике хромосом могут предопределяться видовыми различиями в количестве гетерохроматина (Стегний, 1996). Чем больше локализовано гетерохроматинового материала в прицентромерных участках политенных хромосом, тем большая вероятность образования общего хромоцентра. Для *D. virilis* характерен общий хромоцентр, состоящий из α - и β -гетерохроматина, как в ядрах слюнных желез (Прокофьева-Бельговская, 1986), так и в ядрах трофоцитов (Стегний и др., 1996; Вассерлауф, 2008), что связано с наличием большого количества прицентромерного гетерохроматина. Хромоцентральная организация хромосом трофоцитов характеризует наиболее древние (стволовые) виды (Стегний, 1993). Согласно известным филогенетическим схемам группы *D. virilis* (Throckmorton, 1982; Spicer, Bell, 2002), именно *D. virilis* и *D. kanekoi* занимают анцестральное положение. Ранее у 12 видов группы *D. virilis* нами были выявлены четыре морфологических типа архитектоники ядер трофоцитов: с хромоцентральной организацией, с диффузным хромоцентром, с хромосомами, рассредоточенными в пространстве ядра, и с хромосомами, имеющими контактирование прицентромерными участками хромосом с оболочкой ядра (Вассерлауф, 2008). Эти результаты были получены на «полудавленных» препаратах, и поэтому можно было оценивать только наличие или отсутствие хромоцентральной организации и ассоциацию хромосом по отношению друг к другу. Поэтому целью настоящих исследований являлось изучение трехмерной организации районов прицентромерного гетерохроматина хромосом в трофоцитах *D. virilis* на протяжении всех стадий политенизации — от первичных политенных ядер с ретикулярной структурой к оформленным политенным хромосомам и к вторичным политенным ядрам с ретикулярной структурой. В связи с этим была проведена микродиссекция хромоцентра из политенных хромосом слюнных желез и создана районспецифичная ДНК-библиотека (Dvir3). Далее была проведена *in situ* гибридизация Dvir3 с хромосомами слюнных желез и трофоцитов *D. virilis*. В результате была выявлена локализация ДНК-зонда в β -гетерохроматине хромоцентра клеток слюнных желез и в прицентромерных районах хромосом трофоцитов, а также в прителомерном районе хромосомы 2. В α -гетерохроматине хромоцентра трофоцитов ДНК-зонд не выявлялся, возможно из-за плотной компактизации хроматина. 3D FISH Dvir3 с хроматином трофоцитов *D. virilis* позволила установить, что на протяжении всех стадий политенизации сохраняется хромоцентральная организация ядер трофоцитов. На стадии первичных ретикулярных ядер выявляется ярко окрашенный DAPI блок α -гетерохроматина и β -гетерохрома-

тин хромоцентра, тотально помеченный Dvir3. В пространстве ядра β -гетерохроматин локально располагается и тесно контактирует с блоком α -гетерохроматина. На сформированных политенных хромосомах Dvir3 выявляется в прицентромерных районах каждой хромосомы и в прителомерном районе хромосомы 2. На стадии вторичных ретикулярных ядер β -гетерохроматин располагается несколько отдаленно от блока α -гетерохроматина и в большей степени рассредоточивается в пространстве ядра. Таким образом, на протяжении всех стадий политенизации α -гетерохроматин остается компактным и не метится ДНК-зондом. В то же время β -гетерохроматин интенсивно метится и проявляет некоторую динамику в расположении в пространстве ядра по отношению к α -гетерохроматину.

ВЛИЯНИЕ ЦИТОХАЛАЗИНА В НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПОВРЕЖДЕННОГО НЕЙРОНА. © Н. Ю. Васягина,¹ С. С. Сергеева,¹ О. С. Сотников,¹ Л. И. Арчакова,² С. А. Новаковская.² ¹Лаборатория функциональной морфологии и физиологии нейрона ФГБУН Института физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, ossotnikov@mail.ru, и ² Центр световой и электронной микроскопии Института физиологии НАН Беларуси, Минск.

В последнее время естественная двигательная активность нервных отростков привлекает все большее внимание. Малоизученной остается ретракция нейритов, вызванная их повреждением. Затормозить спонтанную ретракцию нервных отростков можно с помощью ингибиторов актинового цитоскелета цитохалазинов. Однако механизм влияния цитохалазина на патологическую ретракцию изучен слабо. Поскольку сокращение травмированных нервных волокон является одним из важных факторов увеличения диастаза между центральными и периферическими культиями при перерезке нерва, мы считали целесообразным попытаться выявить принципиальную возможность ингибирования такой разновидности ретракции с помощью цитохалазина В (ЦВ), проанализировав при этом электрогенез нервной клетки. Исследование сокращения травмированных нервных отростков проводили на живых изолированных нейронах пресноводных моллюсков *Lymnaea stagnalis*. Выделение одиночных нейронов осуществляли с помощью проназы и повторного пипетирования. Для блокирования актиновых филаментов ганглии помещали в раствор ЦВ с концентрацией 0.02 или 0.2 мМ и затем пипетировали. Полученные отдельные нервные клетки помещали в микрокамеру и исследовали в фазовом контрасте с помощью компьютерной цейтраферной микровидеоустановки.

При действии на нервные клетки 0.02 мМ ЦВ отмечалось ингибирование сокращения нервных волокон. Не ретрагировали даже самые тонкие боковые ответвления инициального отростка. Колба ретракции чаще всего не образовывалась, но даже при ее формировании сокращения нейрита не наблюдалось. Эксперименты с 0.02 мМ ЦВ показали, что клеток с сократившимися отростками было в 2 раза меньше, чем в контроле, а половина отростков исследованных нейронов не сокращалась вообще. Латентный период сокращения в среде, содержащей 0.02 мМ ЦВ, составил от 20 мин до 2 ч 20 мин. При этом процесс сокращения отростков мог продолжаться в среднем 5 ч, в то время как в контроле время полного сокра-

щения отростков равнялось в среднем 1 ч 30 мин. При действии 0.2 мМ ЦВ ингибирование сокращения было выражено более четко. Так количество несократившихся нейронов увеличилось в 10 раз по сравнению с контролем. При ретракции отдельных отростков латентный период был самым продолжительным и составил около 4 час.

Для изучения влияния 0.2 мМ ЦВ на электрогенез нейрона использовали нейроны Ретциуса медицинской пиявки. Ганглий, выделенный из тела пиявки, закрепляли на дне камеры, заполненной раствором 0.2 мМ ЦВ. Электрическую активность одного из нейронов регистрировали экстраклеточно. При влиянии 0.2 мМ ЦВ на электрическую активность нейрона наблюдается достоверное увеличение частоты фоновой импульсной активности в среднем с 0.30 до 0.56 имп/с. Амплитуда спонтанного спайка увеличивались в среднем с 46.9 до 51.8 мВ, длительность — с 5.9 до 8.8 мс. Наряду с одиночными высокоамплитудными импульсами при действии 0.2 мМ ЦВ появляются сдвоенные низкоамплитудные спайки первые амплитудой 36.9 мВ, длительностью 6.0 мс и вторые амплитудой 18.5 мВ, длительностью 6.1 мс. Порог клетки на синаптическое раздражение возрастал в среднем на 48 %. Латентный период ответа на раздражающий стимул увеличивался в среднем с 25.0 до 37.6 мс. При действии 0.02 мМ ЦВ достоверных изменений в электрогенезе нейрона не обнаружено.

Эксперименты с ЦВ показали, что актиновые микрофиламенты играют важную роль в механизме ретракции поврежденных нервных отростков и что применение ЦВ не имеет катастрофических последствий для электрогенеза нервных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-90001-Бел_а).

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ 3Т3-SV40 ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИОКСИДАНТОВ. © *Е. А. Вахромова, О. Г. Люблинская, И. А. Гамалей.* ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vakhromova.cath@gmail.com.

Известно, что активность целого ряда внутриклеточных молекул зависит от соотношения окисляющих и восстанавливающих эквивалентов в клетке. По данным литературы, редокс-чувствительностью обладают и белки актинового цитоскелета — как структурные (актин), так и регуляторные (тропомозин). Особый интерес представляют данные о прооксидантном действии антиоксидантов. Поэтому задача данного исследования — найти корреляцию между изменением внутриклеточного уровня активных форм кислорода (АФК) и перестройкой актинового цитоскелета клетки при прямом действии антиоксидантов. Исследовали действие двух разных антиоксидантов — N-ацетилцистеина (НАС) и альфа-липоевой кислоты (АЛА). Сравнивали ответы клетки на введение антиоксиданта и на обработку пероксидом водорода (прямого оксиданта). Уровень АФК оценивали методом проточной цитометрии с использованием двух разных зондов (DCF и carboxy-DCF). Актиновый цитоскелет визуализировали с помощью родамин-фаллоидина. Показали, что уже через 15 мин после введения антиоксиданта НАС или АЛА уровень АФК в клетках 3Т3-SV40 меняет-

ся. При действии АЛА (в диапазоне концентраций от 0.7 до 3.0 мМ) содержание АФК возрастало в 2—2.5 раза, что свидетельствует о ее прооксидантном действии в данных концентрациях. При действии НАС (5—10 мМ) уровень АФК снижался, причем степень выраженности изменений зависела от используемого зонда. Повышенный уровень АФК в клетках при действии АЛА сохраняется в течение 20—24 ч после начала обработки. Измененный уровень АФК при введении НАС полностью восстанавливается до исходного (контрольного) через 20—24 ч. Ранее мы показали, что введение антиоксиданта НАС в среду культивирования через 20—24 ч приводит к дезинтеграции клеточного монослоя, сильному округлению и поджатию клеток, полной разборке актиновых филаментов и агрегации актина по всей цитоплазме. Изменение морфологии клеток при действии другого антиоксиданта — АЛА — были не столь значительны, но микрофиламенты в этих клетках практически полностью исчезали, в ряде случаев сохранялся кортикальный актиновый цитоскелет. При действии пероксида водорода (50—1000 мкМ) внутриклеточный уровень АФК повышается, при этом клетки заметно поджимаются, формируют многочисленные филоподии, а актиновые филаменты в них разбираются. Сопоставление данных по изменению внутриклеточного уровня АФК с данными по реорганизации актинового цитоскелета при действии антиоксидантов и пероксида водорода указывает на отсутствие прямой корреляции между этими изменениями. Важно отметить, что перестройки актинового цитоскелета происходят при любом сдвиге редокс-баланса клетки (как в пользу окислителя, так и в пользу восстановителя), но характер разборки актиновых филаментов определяется спецификой действия агента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00935).

ЭНДОМИТОТИЧЕСКОЕ РАЗОБЩЕНИЕ ГОМОЛОГОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОСОМОВ У ДВУКРЫЛЫХ НАСЕКОМЫХ. © *А. Е. Ведерников,¹ В. Н. Стегний.¹* ¹Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета, genes51@mail2000.ru.

В трофоцитах яичников в ходе развития на ранних стадиях оогенеза происходит разобщение политенных хромосом на хромосомные элементы — эндометафазные или эндохромосомы. Последние представляют собой сильно компактизованные мелкие (~1 мкм в толщину и ~3 мкм в длину) парные палочковидные образования. Очевидно, они являются гомологами политенных хромосом, синтезированных в процессе предшествующих эндомитотических циклов репликации. В результате подсчета нами было установлено, что каждая помпоновидная хромосома (за исключением половой) разобщается на 64 пары эндометафазных хромосом. Следует учесть, что теоретически возможное количество эндохромосом, на которое разобщается каждая помпоновидная хромосома, равняется 2^{n+1} , где n — число эндоциклов. Соответственно ploidyность ядра на этой стадии политенизации составляет 128С количества ДНК.

Согласно современным исследованиям, проведенным на дрозофиле, хроматиды в парах являются сестринскими

по происхождению и удерживаются вместе за счет наличия недореплицированных участков ДНК (Dej, Spradling, 1999). При этом было доказано, что недорепликация возникает лишь в эндоцикле, предшествующем разобщению. На всех более ранних стадиях хромосомы реплицируются полностью. В противном случае объединение хроматид происходило бы не в пары, а в большие по численности группы.

Половая хромосома сохраняет свою структуру на всем протяжении функциональной активности трофоцита, остальные хромосомы подвергаются эндомитотическим преобразованиям, что в конечном итоге приводит к формированию 64-плоидного политенного ядра с ретикулярной структурой хроматина (скрытая политения), в котором сестринские хроматиды попарно удерживаются вместе за счет наличия общих недореплицированных участков ДНК. Примечательно, что сходные эндомитотические преобразования ядер трофоцитов *Drosophila* приводят к формированию 32-плоидного политенного ядра. На основе полученных результатов и литературных данных следует заключить, что пять эндоциклов трофоцитов *C. erythrocephala* характеризуются полной репликацией хроматина. Последующий, шестой, эндоцикл характеризуется укороченной синтетической фазой. В результате оказываются недопредставленными позднореплицируемые домены хромосом. Это и приводит к парному спариванию хроматид.

Таким образом, в данной клеточной системе двукрылых насекомых важное значение имеет этап расхождения синтезированных в ходе эндоциклов сестринских хроматид. Однако среди представителей отряда *Diptera* может варьировать количество эндоциклов, предшествующих расхождению: у *Drosophila* — 5, у *C. erythrocephala* — строго 6.

ЭКСПРЕССИЯ КАСПАЗ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ИНДУКЦИИ ФЕНОТИПА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ © Т. О. Волкова,¹ Н. С. Зыкина,¹ Н. Н. Немова,¹ А. Н. Полторак.^{1,2} ¹Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия, ²Тафтский университет, Бостон, США, VolkovaTO@yandex.ru.

В настоящее время хорошо известно, что при ступенчатой селекции на устойчивость к некоторым цитотоксическим агентам клетки опухолевых линий *in vitro* приобретают перекрестную резистентность к целому ряду цитостатиков, различающихся как по структуре и происхождению, так и по действию на разные клеточные мишени. Спектры препаратов, к которым развивается перекрестная устойчивость, а также механизмы, ее обеспечивающие, могут различаться в зависимости от выбора селективного агента. Нами были получены сублинии клеток *K562*, резистентные к *2-DQO* и *4-NQO* (*K562/2-DQO* и *K562/4-NQO*), и охарактеризованы по способности подвергаться индуцированному апоптозу под действием структурно-различных химических реагентов по сравнению с клетками родительской линии. Определение жизнеспособности клеток родительской линии и полученных из нее сублиний, инкубированных в течение 2 сут в присутствии различных концентраций химических реагентов, показало существенное различие в токсическом действии используемых ксенобиотиков на опухолевые клетки. Клетки *K562/4-NQO* оказались высокоустойчивыми к

бромистому этидию (EC_{50} 39.8 мкМ) и *2-DQO* (EC_{50} 398.2 мкМ), но были чувствительны к колхицину (EC_{50} 0.0004 мкМ). Напротив, клетки *K562/2-DQO* показали достаточно высокую устойчивость к колхицину (EC_{50} 0.12 мкМ) и *4-NQO* (EC_{50} 79.0 мкМ), в меньшей степени к бромистому этидию (EC_{50} 7.9 мкМ). EC_{50} клеток родительской линии *K562* к этидию бромиду, колхицину, *4-NQO* и *2-DQO* составила 2.5, 0.002, 1.06 и 79.7 мкМ соответственно.

Параллельно в клетках полученных сублиний была проведена оценка экспрессии генов каспаз-3, -6 и -9, а также изменения ферментативной активности данных белков. Из полученных результатов следует, что экспрессия мРНК указанных каспаз в клетках *K562/4-NQO* и *K562/2-DQO* достоверно снижена ($P < 0.05$) по сравнению с родительскими *K562*, что может быть одним из объяснений развития устойчивости опухолевых клеток к *4-NQO* и *2-DQO*. При обработке клеток колхицином имело место достоверное повышение экспрессии мРНК каспаз-3, -6 и -9 в родительской линии *K562* и *K562/4-NQO*, в клетках регистрировался апоптоз. В клетках *K562/2-DQO* экспрессировалась только каспаза-6. Культивирование опухолевых клеток с этидием бромидом приводило к увеличению экспрессии мРНК трех исследуемых каспаз в родительских клетках, в клетках *K562/2-DQO* экспрессировалась каспаза-3, в линии *K562/4-NQO* достоверного изменения экспрессии мРНК каспаз не регистрировалось. Изменение ферментативной активности коррелировало с экспрессией на уровне мРНК.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что полученные клеточные сублинии приобрели кросс-резистентность к химическим реагентам группы множественной лекарственной устойчивости, и подобная резистентность может быть связана в том числе с изменением экспрессии каспаз.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства РФ (Постановление 220) № 11.G34.31.0052 (ведущий ученый А. Н. Полторак), и гранта президента РФ для поддержки ведущих научных школ № 1642.2012.4.

ВЛИЯНИЕ НАНО- И МИКРОЧАСТИЦ ЦЕОЛИТИТОВ РАЗНЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ НА ЭПИТЕЛИОЦИТЫ КИШЕЧНИКА МЫШИ. © К. С. Голохваст,^{1,2} Н. Н. Киселев,¹ В. В. Чайка,¹ А. М. Паничев,^{1,3} П. А. Никифоров,¹ А. Н. Гульков.¹ ¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, ²Владивостокский филиал ДНЦ физиологии и патологии дыхания СО РАМН — НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения и ³Тихоокеанский институт географии ДВО РАН, Владивосток.

Целью данного исследования было изучение особенностей гистологического строения кишечника при пероральном введении частиц цеолитов разных месторождений и разных видах измельчения. В эксперимент были взяты цеолиты Люльинского, Вангинского, Куликовского, Холинского и Шивертуйского месторождений. Минералы измельчали в ультразвуковом дезинтеграторе Bandelin Sonopulse 3400 (Bandelin, Италия) (фракция от 2—15 мкм) (микрочастицы) и в планетарной мельнице Fritch Pulverisette 4 (Fritch, Германия) до размеров от 100 нм до 1 мкм (наночастицы). Мыши *Mus musculus* по-

лучали цеолит перорально в дозировке 3—5 % от массы тела. Животные были разделены на 9 экспериментальных групп по 8 особей в каждой, в том числе: К — животные, которые не получали цеолита; КМ и КН — мыши, которые получали цеолиты Куликовского месторождения после механической и планетарной обработок соответственно; ВН — получали цеолиты Вангинского месторождения с обработкой в планетарной мельнице; ЛН — получали цеолиты Люльинского месторождения с обработкой в планетарной мельнице; ШН — получали цеолиты Шивертуйского месторождения с обработкой в планетарной мельнице; ХМ и ХН — получали Холинские цеолиты после механической и планетарной обработок соответственно; ЧМ — получали цеолиты Чугуевского месторождения после механического дробления. Полутонкие срезы ткани кишечника окрашивали гематоксилин-эозином. Фотографирование препаратов проводили на микроскопе Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, Германия). Статистическую обработку вели с использованием программ Statistica 6.0.

Морфометрические параметры эпителиоцитов в группе «Контроль» и группах с измельченными цеолитами приводятся ниже в таблице.

Данные морфометрии говорят о токсическом поражении кишечника вследствие, видимо, прямого механического действия частиц минералов. Также токсичность частиц можно объяснить меняющимися при измельчении физико-химическими свойствами, в частности изменением на поверхности кристаллической решетки электрического заряда, который при измельчении до нанодиапозона возрастает до критических значений, что провоцирует повышение перекисидации липидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы 2009—2011» (№ госрегистрации 01201156998).

ПОДАВЛЕНИЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ В УСТОЙЧИВЫХ К АПОПТОЗУ, BCL-2 ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ТРАНСФОРМАНТАХ МОДУЛЯТОРАМИ КИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ mTOR. © С. А. Гордеев,¹ Т. В. Поспелова.^{1,2}
¹ С.-Петербургский государственный университет и

² ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, s.a.gordeev@hotmail.com, tvpgroup@mail.ru.

Современные подходы к терапии рака связывают с индукцией в опухолевых клетках программ необратимого подавления пролиферации, к которым относятся старение и аутофагическая гибель клетки. В связи с этим киназа mTOR является уникальной мишенью исследования, так как показано, что она контролирует процессы старения и аутофагии.

Около половины известных опухолей человека проявляют устойчивость к лучевой и химиотерапии, а также плохо отвечают на индукцию апоптоза. Это связано с повышенной экспрессией в таких опухолевых клетках онкогена *bcl-2*, блокирующего апоптоз, путем взаимодействия с белками *bak/bax* на внешней мембране митохондрий, что препятствует выходу цитохрома *c* в цитоплазму и инициации каскада событий, индуцирующих апоптоз и приводящих к фрагментации генетического материала каспазозависимыми ДНКазами.

Цель нашего исследования связана с изучением в Bcl-2, экспрессирующих трансформированных фибробластах грызунов E1A+cHa-ras+Bcl-2, возможности активации программы старения ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия (NaBut), а также возможности подавления пролиферации путем активации программы аутофагической гибели ингибиторами TOR-киназных комплексов: рапамицина (ингибитор TORC1) и pp242 (ингибитор TORC1 и TORC2).

Показано, что NaBut способен вызвать блок клеточного цикла, однако необратимый блок, аутофагию и экспрессию маркера старения (SA-b-Gal) он вызывает только у клеток, чувствительных к индукции апоптоза.

Ингибитор TORC1 рапамицин эффективно подавляет фосфорилирование одной из мишеней TORC1 рибосомального белка S6, тогда как другая, непосредственная, связанная также с белковым синтезом мишень — ингибитор фактора eIF4E — 4E-BP-1 — остается фосфорилированной, т. е. неактивной. На фоне подавленного белкового синтеза клетки сохраняют высокий пролиферативный потенциал, согласно данным по кривым роста.

Ингибитор обоих mTOR-содержащих киназных комплексов (TORC1 и TORC2) pp242 подавляет фосфорилирование S6 и 4E-BP1. Наиболее важным отличием его

Морфометрические параметры эпителиоцитов кишечника в разных экспериментальных группах (при $P < 0.05$)

Группа	Длина ядра	Ширина ядра	Площадь ядра	Длина клетки	Ширина клетки	Площадь клетки
К	5.04 ± 0.21	4.17 ± 0.12	16.9 ± 1.21	14.91 ± 1.11	9.5 ± 0.83	83.53 ± 6.23
Микрочастицы						
КМ	4.60 ± 0.17	3.85 ± 0.16	12.97 ± 0.80	14.61 ± 0.54	10.62 ± 0.50	90.04 ± 3.11
ЧМ	6.81 ± 0.20	3.85 ± 0.14	13.11 ± 2.01	10.91 ± 0.50	7.92 ± 0.16	52.78 ± 2.93
ХМ	Некроз					
Наночастицы						
ШН	4.55 ± 0.26	3.39 ± 0.21	9.37 ± 0.75	11.49 ± 0.39	9.43 ± 0.42	76.73 ± 4.83
ВН	4.97 ± 0.11	4.13 ± 0.12	15.31 ± 0.82	18.53 ± 0.61	12.00 ± 0.55	114.94 ± 3.32
ЛН	Некроз					
ХН	»					
КН	»					

действия от действия рапамицина является включение программы аутофагической гибели, которая приводит к полному уничтожению цитоплазматических структур в клетках чувствительной линии. Однако в клетках, устойчивых к апоптозу, сверхэкспрессирующих ген *bcl-2*, аутофагия проявляется в течение короткого отрезка времени, на ранних сроках действия ингибитора (до 24 ч), после чего существенно снижается, и такие клетки, несмотря на подавление пролиферации, остаются живыми.

Таким образом, NaBut и pp242 являются перспективными агентами в подавлении пролиферации у трансформантов, которые не сверхэкспрессируют *bcl-2*. Трансформанты с повышенной экспрессией *bcl-2* требуют иного подхода, к числу которых относится подбор комбинаций ингибиторов и активаторов различных внутриклеточных сигнальных путей, в частности комбинации ингибиторов, нарушающих работу каскада mTOR/PI3K/Akt, для более эффективной активации гибели в устойчивых к апоптозу клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ, МКБ РАН и СПбГУ.

ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ММСК В ИЗМЕНЕННОЙ ГАЗОВОЙ СРЕДЕ.
© А. Н. Горностаева, Е. Р. Андреева, Т. А. Берендеева, Л. Б. Буравкова. ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, HindIII@yandex.ru, Москва.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) являются привлекательным объектом для регенеративной медицины, они менее чувствительны при аллогенном введении к цитотоксическому воздействию, поскольку экспрессируют низкий уровень костимуляторных и HLA-молекул. ММСК могут быть введены в организм в качестве клеточной суспензии либо в составе тканево-инженерных конструкций. Ранее нами было показано, что при пониженном содержании кислорода существенно изменяются пролиферативный и дифференцировочный потенциалы ММСК. Можно предположить, что пониженное напряжение кислорода окажет влияние и на иммуносупрессивные свойства.

В настоящей работе проведено сравнительное исследование функционального статуса иммунных клеток при сокультивировании с ММСК при различном содержании кислорода (20 и 5 % O₂).

ММСК выделяли из жировой ткани человека. Лимфоциты получали из периферической крови здоровых доноров и активировали фитогемагглютинином (ФГА, 10 мкг/мл). ФГА-лимфоциты сокультивировали с ММСК, достигшими 70—80 % монослоя (модель «монослой») и с суспензией ММСК (модель «смешанная культура»). Контролем служила монокультура ФГА-активированных лимфоцитов. После 72 ч сокультивирования методом проточной цитофлуориметрии оценивали жизнеспособность лимфоцитов (PI-Annexin V-FITC), пролиферативную активность (используя флуоресцентный краситель CFSE) и активацию (доля Т-клеток, экспрессирующих антигены CD25, CD69 и HLA-DR). В кондиционированной среде (КС) после сокультивирования измеряли концентрацию цитокинов с использованием набора Bender Medsystems для мультиплексного определения 11 цитокинов человека на проточном цитофлуориметре (Beckton Dickinson).

Сокультивирование с ММСК не влияло на жизнеспособность лимфоцитов. Пролиферативная активность Т-клеток при сокультивировании с ММСК снижалась в «смешанной культуре» независимо от содержания кислорода (в среднем на 50 %), при сокультивировании с монослоем при 5 % O₂ доля поделившихся клеток также уменьшалась на 50 %, а при стандартной концентрации O₂ эффект был выражен слабее (30 %). Снижение доли активированных лимфоцитов наблюдалось только среди клеток CD3⁺/HLA-DR⁺ при культивировании лимфоцитов на монослое (в среднем на 40 %) независимо от содержания кислорода. В «смешанной культуре» эффект был выражен слабее (снижение в среднем на 30 %) и наблюдался только при 20 % O₂. При анализе цитокинового профиля в КС в значимых количествах были детектированы ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН-γ, ИЛ-10, ИЛ-1β и ФНО-α. После сокультивирования ФГА-лимфоцитов с монослоем ММСК концентрация провоспалительных ИФН-γ, ИЛ-6 и ИЛ-1β увеличивалась, а ИЛ-8 и ФНО-α снижалась по сравнению с монокультурой ФГА-лимфоцитов. Увеличивалась концентрация противовоспалительного ИЛ-10. В «смешанной культуре» были отмечены такие же изменения, только в случае ИЛ-10 и ИФН-γ они были менее выражены. Эффекты были сходными при 20 и при 5 % кислорода.

Таким образом, ответ иммунных клеток в присутствии ММСК сопровождался разнонаправленным сдвигом экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов, в целом смещающим баланс в сторону подавления их пролиферативной активности и экспрессии маркеров активации. В зависимости от того, взаимодействуют лимфоциты с монослоем ММСК или с суспензией, этот ответ зависел от концентрации O₂ в среде.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы №7 президиума РАН.

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРЫ КАРИОТИПА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЕСКВАМИРОВАННОГО ЭНДОМЕТРИЯ В УСЛОВИЯХ IN VITRO.
© Т. М. Гринчук, А. П. Домнина, В. И. Земелько, Н. Н. Никольский. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Использование культуры стволовых клеток (СК) в медицинской практике предполагает наличие в них нормального неперестроенного кариотипа. Согласно существующим на настоящий момент литературным данным, однозначного ответа о сохранении кариотипической стабильности СК при переводе их в условия in vitro нет. Фундаментальные исследования в данном направлении позволяют оценить возможность использования культуры СК разного генеза в терапевтических целях.

Объект настоящего исследования — мезенхимные стволовые клетки (МСК) линии 23-04, полученной в Институте цитологии РАН в результате перевода в условия in vitro СК десквамированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови. Для культивирования клеток использовали среду DMEM/F12, содержащую 10 % бычьей эмбриональной сыворотки, 1 % смесь антибиотика и антимикотика и 1 % глутаматса. Клеточную культуру пересевали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA.

Цель работы — изучение стабильности кариотипа клеток линии 23-04 в процессе культивирования: на ран-

нем пассаже (р. 3) и на последующих этапах культивирования (р. 6 и 15). Анализ структуры кариотипа был проведен с применением метода дифференциальной окраски метафазных хромосом на G-диски. В результате проведенной работы установлено, что уже на 3-м пассаже проанализированная популяция была представлена двумя группами клеток. Более 50 % клеточной популяции имели структуру кариотипа, типичную для клеток человека в норме, в кариотипах остальных клеток наблюдались некоторые отклонения от нормы. Треть метафазных пластинок с изменениями характеризовалась наличием эктопической конъюгации между негомологичными хромосомами с преимущественным участием в этих тандемах хромосомы 15. Два других типа изменений были связаны с появлением в кариотипе таких новообразований, как трисомия по отдельным хромосомам набора или наличие изохромосомы. Оба варианта изменений связывают со сбоем в программе клеточного деления. Выявленные на данном этапе культивирования изменения не были закономерными. На 6-м пассаже характер кариотипической нестабильности и количественное соотношение нормальных метафазных пластинок и пластинок с атипичным набором хромосом сохранились. Помимо перечисленных выше изменений в одной из метафазных пластинок была обнаружена классическая хромосомная аберрация — поломка одной из хромосом, сопровождающаяся сохранением генетического материала. На 15-м пассаже доминировали метафазные пластинки с нормальным кариотипом. Кариотипы с отклонениями от нормы были единичными. Аберрантные хромосомы отсутствовали.

Необходимо отметить, что на всех этапах культивирования прокаротипированные нами клетки сохраняли признаки плюрипотентного фенотипа, что было показано методами иммуноцитохимии.

Полученные в настоящей работе данные позволяют заключить, что структура кариотипа эндометриальных клеток линии 23-04 на ранних этапах культивирования приобретает некоторые признаки нестабильности, что может быть вызвано стрессом в связи переводом их из системы *in vivo* в систему *in vitro*. В процессе культивирования клеток линии 23-04 преимущество получили варианты с нормальным кариотипом.

Работа выполнена в рамках ГК 16.512.11.2191.

ТУБУЛИН КАК РЕГУЛЯТОР ПРОВОДИМОСТИ И ТРАНСПОРТА МЕТАБОЛИТОВ В КАНАЛЕ VDAC: ИССЛЕДОВАНИЕ НА РЕКОНСТРУИРОВАННОМ КАНАЛЕ. © Ф. А. Гурьев, ¹ Т. К. Ростовцева, ¹ В. Агилея, ² М. Керальт Мартин, ² С. М. Безруков. ¹ Программа физической биологии, Национальный институт детского здравоохранения и развития человека, Бетезда, Мэриленд, США, gurmevr@mail.nih.gov, и ² Лаборатория молекулярной биофизики, Университет Хайме I, Кастильон-де-ла-Плана, Испания.

Потенциалзависимый анион-селективный канал наружной митохондриальной мембраны (Voltage-Dependent Anion Channel, VDAC) является одним из основных каналов обмена метаболитов, в том числе АТФ и АДФ, между митохондриями и цитозолем. Недавно обнаруженное в нашей лаборатории высокоаффинное связывание димерного тубулина с каналом VDAC играет значительную роль в регуляции митохондриального транспорта,

опосредованного VDAC. При электрофизиологическом исследовании изолированного канала, реконструированного в искусственную бислоюную мембрану, связывание тубулина наблюдается как обратимое потенциалзависимое блокирование ионного тока через VDAC. Блокированное состояние также является проводящим и составляет ~40 % тока открытого канала (в условиях 1 М КСl в околосмембранном растворе). В рамках данной работы нами исследованы характеристики тубулинсвязанного состояния VDAC при помощи метода водорастворимых незаряженных полимеров полиэтиленгликолей различной молекулярной массы, измерений ионной селективности различных состояний канала и модуляции поверхностного заряда искусственных мембран. Нами установлено, что эффективное сечение заблокированного тубулином состояния поры VDAC уменьшается почти вдвое по сравнению с порой открытого канала; при этом селективность канала меняется с анионной на катионную. В условиях низкой концентрации КСl в околосмембранном растворе ($C_{КСl} \leq 0.1$ М) ток через заблокированное тубулином состояние VDAC выражено зависит от поверхностного заряда мембраны, в то же время открытое состояние канала практически нечувствительно к этому параметру. Нами показано, что этот эффект может быть объяснен не только качественно, но и количественно, если принять во внимание изменения ионной селективности заблокированного состояния, его геометрию и среднее расстояние между заряженными группами ближайших липидных молекул и проводящими участками поры. Обнаружено, что концентрация соли в растворе и поверхностный заряд мембраны оказывают весьма незначительное влияние на потенциал-зависимость связывания тубулина с каналом; характерное значение эффективного «воротного заряда» изменяется от 10 до 14 элементарных зарядов. Установлено, что заблокированное тубулином состояние канала непроницаемо для АТФ и других отрицательно заряженных метаболитов.

ГОМЕОСТАЗИС КАЛЬЦИЯ В ДЕВИТРИФИЦИРОВАННЫХ СВИНЫХ ООЦИТАХ, НЕ ЗАВЕРШИВШИХ ФАЗУ РОСТА. © В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина. Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных Российской академии, Санкт-Петербург—Пушкин, prof.kouzmina@mail.ru.

Идентификация внутриклеточных механизмов, детерминирующих криорезистентность женских гамет, позволит разработать эффективный метод витрификации и обеспечить создание криобанка биологически полноценных ооцитов для их использования в клеточных репродуктивных технологиях.

В настоящей работе исследовали флуктуацию содержания ионов кальция во внутриклеточных депо девитрифицированных ооцитов свиней на стадии диплотены после воздействия соматотропина (СТГ) и ГТФ.

Инкубацию выделенных ооцитов проводили в модифицированной среде Дюльбекко в отсутствие $CaCl_2$. Ооциты витрифицировали в соответствии с методикой, описанной нами ранее (Денисенко, Кузьмина, 2011). Концентрацию кальция во внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью хлортетрациклина (ХТЦ, Sigma). Ооциты инкубировали в течение 5 мин при 37 °С в инкубационной среде Дюльбекко, содержащей 40 мкМ

хлортетрациклина. Измерение кальция проводили на флуоресцентном микроскопе. Комплекс ХТЦ—Ca²⁺—мембрана возбуждали светом 380—400 нм, флуоресценцию регистрировали в области 530 нм. Интенсивность флуоресценции измеряли в усл. ед. Исходную популяцию ооцитов оценивали с помощью витального красителя бриллиантового кристаллического голубого (BCB, Sigma) и в соответствии с окраской делили на две группы: завершившие стадию роста ооциты (окрашенная ооплазма) и растущие ооциты (отсутствие окраски). BCB детерминирует внутриклеточную активность фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Alm H. et al., 2005). Фермент активен в растущих ооцитах, в клетках, завершивших фазу роста, его активность падает. Тест с использованием BCB основан на способности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы конвертировать окраску BCB в растущих ооцитах из голубой в бесцветную. После девитрификации растущие ооциты вновь подвергали окраске BCB с целью выявления эффектов витрификации, ооплазма девитрифицированных растущих ооцитов после экспозиции с BCB окрашивалась.

Ранее на основе ингибиторного анализа показано, что совместное действие СТГ (10 нг/мл) и ГТФ (10 мкМ) стимулировало дополнительное освобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо завершивших фазу роста нативных ооцитов, при воздействии ингибитора полимеризации микротрубочек нокодазола эффект отсутствовал (Денисенко, Кузьмина, 2011). В растущих нативных ооцитах добавление СТГ (Sigma) или ГТФ в аналогичных концентрациях стимулировало освобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо, однако при совместном воздействии этих соединений не отмечали дополнительного освобождения Ca²⁺ из внутриклеточных депо. После девитрификации в растущих ооцитах при совместном действии СТГ и ГТФ отмечали дополнительное освобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо. Обработка таких ооцитов нокодазолом, так же как и в завершивших стадию роста ооцитах, не оказывала влияния на освобождение Ca²⁺, стимулированное отдельно СТГ или ГТФ, и ингибировала дополнительное освобождение Ca²⁺, активированное совместным действием СТГ и ГТФ.

В результате проведенных исследований выявлено, что сопряженному с витрификацией изменению внутриклеточной активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (BCB-тестирование) сопутствуют процессы, детерминирующие флуктуацию содержания ионов кальция во внутриклеточных депо девитрифицированных ооцитов свиней после воздействия соматотропина и ГТФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00389).

ЦИТОЗОЛЬНЫЕ И МЕМБРАННО-СВЯЗАННЫЕ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В СПЕРМАТОЗОИДАХ С РАЗЛИЧНОЙ ПОДВИЖНОСТЬЮ. © К. В. Деркач,¹ А. Ю. Грязнов,² А. О. Шнаков.¹ ¹ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, derkach_k@list.ru, и ²ГУЗ «Женская консультация № 44» Пушкинского р-на, Центр планирования семьи, Санкт-Петербург.

Одной из актуальных проблем репродуктивной биологии и медицины является изучение молекулярных ме-

ханизмов, участвующих в регуляции созревания сперматозоидов и их капацитации. В процессе капацитации сперматозоиды становятся гиперподвижными, приобретают способность к хемотаксису и акросомальной реакции, что необходимо для их направленного движения по женскому половому тракту и оплодотворения яйцеклетки. Предполагается, что ключевую роль в контроле созревания сперматозоидов и капацитации играют гормоны и вещества негормональной природы, регулирующие цитозольные и мембранно-связанные формы аденилатциклазы (цАЦ и мАЦ). Однако механизмы их влияния на АЦ в эякулированных сперматозоидах (СЭ) исследованы недостаточно. Цель работы состояла в функциональной характеристике бикарбонат-чувствительной цАЦ и гормоночувствительной АЦ, которая сопряжена с рецепторами серпантинного типа и гетеротримерными G-белками стимулирующего или ингибирующего типа (G_s и G_i), во фракциях СЭ с различной подвижностью, полученных от доноров-добровольцев.

Показано, что при повышении доли подвижных СЭ от 13 до 93 млн/мл базальная активность АЦ повышается от 11.4 ± 0.8 до 29.9 ± 1.1 пмоль цАМФ/мин на мг белка. Во фракциях с высокой подвижностью СЭ увеличивается прирост активности АЦ над ее базальным уровнем при действии активаторов цАЦ — NaHCO₃ (50 мМ) и Mn²⁺ (5 мМ), что хорошо согласуется с данными об определяющей роли цАЦ в контроле подвижности сперматозоидов. В то же время чувствительность мАЦ к негормональным регуляторам (форсколин, негидролизуемый аналог ГТФ — GppNHp) и гормонам, действующим как через G_s-белки (изопротеренол, норадrenalин), так и через G_i-белки (норадrenalин, серотонин), напротив, была повышена во фракциях с низкой подвижностью СЭ, а при увеличении доли подвижных СЭ в значительной степени снижалась.

Таким образом, впервые показано, что во фракциях с низкой долей подвижных сперматозоидов отмечается высокая чувствительность мАЦ к гормонам, действующим через G_s- и G_i-белки, в то время как базальная активность АЦ и ее чувствительность к NaHCO₃ и Mn²⁺ выше у высокоподвижных сперматозоидов, что может быть связано с повышением в них активности цАЦ. Снижение подвижности СЭ обычно связывают с нарушениями или незавершенностью процессов их дифференцирования, развития и созревания. Полученные нами результаты будут способствовать разработке новых подходов для гормональной коррекции функционального состояния СЭ, направленных на ускорение их созревания и повышение фертильности.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ-ЦИКЛАЗ ИНФУЗОРИИ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* К РЕГУЛЯТОРНОМУ ДЕЙСТВИЮ D-ГЛЮКОЗЫ И ЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА. © К. В. Деркач,¹ З. И. Успенская,² А. Л. Юдин,² А. О. Шнаков.¹ ¹ФГБУН Институт цитологии РАН, zoyaus@mail.ru, и ²ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург.

Ключевую роль в регуляции жизненно важных процессов у одноклеточных организмов играют ферменты с циклазной активностью — аденилатциклаза (АЦ) и гуанилатциклаза (ГЦ), катализирующие синтез вторичных посредников цАМФ и цГМФ, через посредство которых

осуществляется контроль генной экспрессии, роста, метаболизма, подвижности, хемотаксиса. Активность ферментов-циклаз у одноклеточных регулируется множеством внеклеточных сигналов — гормонами, ростовыми факторами, сахарами, нуклеотидами, аминокислотами. Ранее нами и другими авторами было показано, что некоторые гормоны и ростовые факторы позвоночных животных влияют на хемосигнальные системы свободноживущей инфузории *Tetrahymena pyriformis*. В то же время данные о регуляции АЦ и ГЦ природными веществами и метаболитами, с которыми инфузории постоянно контактируют в процессе жизнедеятельности и которые влияют на их пищевое поведение и подвижность, в настоящее время отсутствуют. Цель работы состояла в изучении чувствительности АЦ и ГЦ *T. pyriformis* к D-глюкозе и цАМФ.

Показано, что D-глюкоза (10^{-5} — 10^{-3} М) стимулирует активность обеих циклаз инфузории. Значения EC_{50} для АЦ и ГЦ эффектов глюкозы составили 16 и 9.3 мкМ. В присутствии сурамина (10^{-5} М) — селективного блокатора гетеротримерных G-белков — АЦ и ГЦ эффекты глюкозы (10^{-4} М) снижались на 42 и 29%. Это указывает на то, что глюкоза стимулирует ферменты-циклазы *T. pyriformis* через сигнальные каскады как зависимые от G-белков, так и не зависимые от них. Структурно родственные глюкозе моносахариды (D-манноза, D-галактоза) не влияли на активность циклаз. Стимулирующий АЦ эффект цАМФ выявлялся в сравнительно низкой концентрации 10^{-9} М, достигал максимума в концентрации 10^{-6} М и при дальнейшем повышении концентрации цАМФ снижался. Стимулирующее действие цАМФ на ГЦ выявлялось в концентрации 10^{-7} М и достигало максимума в концентрации 10^{-4} — 10^{-3} М. Значения EC_{50} для АЦ и ГЦ эффектов цАМФ составили 38 нМ и 4.8 мкМ. Сурамин снижал АЦ и ГЦ эффекты цАМФ (10^{-4} М) на 77 и 69%, что свидетельствует об участии G-белков в стимуляции цАМФ активности циклаз *T. pyriformis*. Действие цАМФ было специфичным, поскольку структурно близкие ему АМФ и аденозин существенно не влияли на АЦ и ГЦ. Обнаружено также, что [$6-^{14}C$]глюкоза специфически связывается с инфузориями *T. pyriformis* со значениями K_D и V_{max} 43 нМ и 7.53 фмоль глюкозы на 100 000 клеток, в то время как [$8-^3H$]цАМФ — со значениями K_D и V_{max} 19 нМ и 4.46 фмоль цАМФ на 100 000 клеток.

Таким образом, нами впервые установлено, что глюкоза и цАМФ в микромолярных концентрациях стимулируют активность ферментов-циклаз инфузории *T. pyriformis*, а АЦ эффект цАМФ выявляется в наномолярных концентрациях. Показано, что глюкоза и цАМФ специфически связываются с клетками *T. pyriformis* в условиях *in vivo*, что является пусковым механизмом для активации ими ферментов с циклазной активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-04-00692).

ЭФФЕКТ МУТАЦИЙ ОПУХОЛЕВОГО СУПРЕССОРА MERLIN НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК КРЫЛА И РОЛЬ ЕГО ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ САЙТОВ В СПЕРМАТОГЕНЕЗЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*. © Т. Д. Дубатолова,¹ Л. В. Омелянчук,¹ С. А. Копыл,¹ Н. В. Дорогова.² ¹ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новоси-

бирск, и ²ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Мозаичный анализ является удобным средством анализа пролиферации крыла дрозофилы, поскольку частота и размер мозаичных клонов зависят от количества клеточных генераций, прошедших от индукции митотического кроссинговера до формирования кутикулы взрослой мухи. С помощью мозаичного анализа было показано, что имагинальные диски состоят из компартментов, границы которых формируются в разное время жизненного цикла дрозофилы. Мозаичные клоны, возникшие до детерминации границы компармента, могут пересекать его границу, в то время как клоны, возникшие после этого события, не могут. На стадии куколки рост мозаичных клонов ограничен не только границами компартментов, но также и жилками крыла. Аналогия между жилками и границами имеется не только в отношении ограничения роста мозаичных клонов, но и в отношении генов, экспрессирующихся на границах.

Ген *Merlin* (*Mer*) у дрозофилы гомологичен гену *NF2* у человека, и его мутации также вызывают повышенную пролиферацию клеток. В данной работе мы изучили свойства мутаций гена *Mer* в отношении сохранения/нарушения границ жилок крыла. Мы показали, что клетки дрозофилы, мутантные по гену *Merlin*, делятся быстрее, чем клетки дикого типа, а пролиферация имагинальных дисков в случае действия мутации продолжается дольше. Нами было показано, что мутантные по гену *Merlin* клоны способны пересекать границы жилок. Это означает, что ген вовлечен не только в контроль клеточной пролиферации, но также и в контроль клеточной подвижности и адгезии.

Мы сконструировали мутантные белки Merlin дрозофилы Mer^{T559D} (аналог фосфорилированной формы), Mer^{T559A} (нефосфорилированная форма) и тестировали их в условиях эктопической экспрессии на способность восстанавливать дефекты сперматогенеза, индуцированные мутацией *Mer⁴*. Самцы, гемизиготные по аллелю *Mer⁴*, погибают на стадии личинки и куколки, имея следующие anomalies сперматогенеза: нарушения цитокинеза на стадии предмейотического митоза и в мейозе, дефект поляризации цист, нарушения небенкерн. Оказалось, что фертильность самцов *Mer⁴* восстанавливается с помощью экспрессии генов, кодирующих полноразмерный $mycMer^+$ и аналог фосфорилированной формы Mer^{T559D} . Кроме того, мутантная форма Mer^{T559D} восстанавливает фенотип аномальных небенкернов, вызванных мутацией, в то время как форма с заменой Mer^{T559A} не восстанавливает этот фенотип. Это означает, что фосфорилированная форма в сперматогенезе является функциональной.

Эктопическая экспрессия различных усеченных вариантов белка ($mycMer^3$, $mycMer^{2BB}$ и $mycMer^{1-379}$) ведет к нарушению мейотического цитокинеза, но не приводит к образованию аномальных небенкернов. Это означает, что в дополнение к фосфорилированной и нефосфорилированной формам Merlin может существовать в конформации, функционирующей только в процессе цитокинеза.

Таким образом, мы выяснили роль некоторых функциональных сайтов белка Merlin в зародышевой линии самцов.

СПЛАЙСИНГ-ФАКТОР SF2 *DROSOPHILA MELANOGASTER* УЧАСТВУЕТ В КОНТРОЛЕ КЛЕТОЧНОГО

ЦИКЛА IN VIVO. © Т. Д. Дубатолова, Е. И. Волкова, Л. В. Омелянчук. ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск.

Альтернативный сплайсинг создает необходимое разнообразие белков эукариотического протеома. Молекулярная функция эволюционно-консервативного белка SF2, если исходить из его белковой последовательности, связана с регуляцией альтернативного сплайсинга. В исследованиях на млекопитающих было установлено, что этот белок является супрессором опухолей, регулирующим пролиферацию через опосредованный инсулином сигналинг, он способен связываться с точками инициации репликации, авторегулировать свою экспрессию и длительность G_2 -фазы клеточного цикла. Полногеномные эксперименты на клетках дрозофилы также выявляют вовлеченность этого фактора в контроль длительности G_2 -фазы, однако прямые эксперименты in vivo не были выполнены. В настоящей работе мы заполнили этот пробел с помощью методов проточной цитометрии и мозаичного анализа.

Число клеток мозаичного клона растет во времени экспоненциально. Для определения физической длины клеточного цикла мы индуцировали мозаичные клоны в различное время у личинок соответствующих генотипов и считали число клеток в каждом клоне. Распределение клонов по размеру обычно представляют как гистограмму распределения клонов по числу делений, приводящих к формированию клона. Если клон растет со скоростью a , то через t ч он будет содержать $\exp(a \cdot t) = 2n$ клеток, т. е. $a \cdot t = n \cdot \ln 2$. Распределение числа клонов по размеру $R(a \cdot t)$ асимметрично, поэтому его аппроксимировали половинками нормальных распределений с различными дисперсиями:

$$A \cdot \exp(-(a \cdot t - at_0)^2/2 \cdot D_0^2) \text{ при } 0 < a \cdot t < at_0,$$

$$A \cdot \exp(-(a \cdot t - at_0)^2/2 \cdot D_1^2) \text{ при } at_0 < a \cdot t < \infty.$$

Коэффициент A выбирали таким образом, чтобы площадь под кривой $R(a \cdot t)$ была равна 1. Здесь at_0 — средняя скорость роста клона D_0 и D_1 — левая и правая дисперсии композиционного распределения. С помощью критерия Хи-квадрат оптимизировали значения параметров at_0 , D_0 и D_1 . Исходя из того что мозаичные клоны росли 48 ч, длина клеточного цикла в контроле и опыте была рассчитана на основе параметра at_0 . В контроле длина клеточного цикла составила 48 ч/5.7 = 8.4 ч, в то время как для SF2 RNAi она равна 48 ч/4.6 = 10.4 ч. Совмещая эти данные с данными проточной цитометрии, можно рассчитать физическую длину фаз клеточного цикла. В контроле $G_2(M) = G_1 \cdot 0.579/0.267$ и $S = G_1 \cdot 0.154/0.267$. Учитывая, что $G_1 + S + G_2 = 8.4$ ч, получаем $G_1 = 2.25$ ч, $G_2(M) = 4.86$ ч и $S = 1.28$ ч. Для клеток, мутантных по SF2: $G_1 = 1.89$ ч, $G_2(M) = 7.22$ ч и $S = 1.30$ ч. Различие временных параметров клеточного цикла в контроле и опыте связано с физическим удлинением $G_2(M)$ у клеток RNAi-SF2. Это означает, что сплайсинг-фактор SF2 функционирует в точке контроля $G_2(M)$ клеточного цикла не только in vitro, но также и in vivo.

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА КРЫС В УСЛОВИЯХ ПИЩЕВОЙ ДЕПРИВА-

ЦИИ. © И. З. Еремина, О. Б. Саврова. Медицинский факультет Российского университета дружбы народов, Москва, eremina@med.rudn.ru.

Проведено электронно-микроскопическое изучение поля CA1 гиппокампа крыс, которые в течение 1 мес содержались на безбелковом рационе. Контролем служили крысы того же возраста, содержащиеся на стандартном рационе вивария. В результате исследования получены морфологические данные, характеризующие ультраструктуру пирамидных нейронов гиппокампа в норме и в условиях воздействия на организм белкового дефицита. Показано, что белковая депривация вызывает деструктивные и адапционно-приспособительные ультраструктурные изменения в гиппокампе недоедавших животных. При анализе экспериментального материала и сравнении его с нормой обращает на себя внимание различная степень выраженности изменений в структуре нейропиля. В одном поле зрения можно увидеть структуры как со значительно выраженными изменениями и даже гибнущие, так и в состоянии практически неизменном, причём это касается всех отделов нервной клетки (ее тела, дендритов, миелинизированных и немиелинизированных аксонов и синаптических контактов). Возрастает число нейронов (на 10 %) с признаками деструкции — значительное потемнение цитоплазмы, в которой уже слабо различимы органеллы. В большинстве случаев тела пирамидных нейронов имели просветление цитоплазмы, расширение перинуклеарного пространства, набухание митохондрий и разрушение их крист, округление и расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети, появление вакуолей, значительное усиление накопления липофусциновых гранул. Показано, что белковая депривация приводит к изменению структуры синапсов и шипикового аппарата в аксодендритических контактах. В телах нейронов, в дендритах и аксонах гиппокампа недоедавших животных встречаются концентрические миелиноподобные тела — аутофагосомы. Их появление служит общим признаком изнашивания мембранных структур.

Наиболее чувствительными к дефициту белка оказались дендритические шипики и особенно содержащийся в них шипиковый аппарат. В подавляющем большинстве случаев его нормальная структура (т.е. чередование уплотненных цистерн с прослойками электронно-плотного вещества) нарушена. В ряде случаев шипиковый аппарат разрушается полностью. По сравнению с контролем в аксонных терминалях уменьшено количество синаптических пузырьков, отсутствует их преимущественная локализация в области активной зоны синапса, что считается показателем снижения функциональной активности синапсов. Уменьшаются длина активных зон и ширина постсинаптических уплотнений контактов. Степень выраженности этих изменений в различных синапсах неодинакова. Результаты исследования показали, что синаптические контакты проявляют высокую чувствительность к воздействию неблагоприятных факторов, но вместе с тем они характеризуются достаточной устойчивостью, поскольку часть изменений нельзя отнести к признакам необратимой деструкции.

АНАЛИЗ АССОЦИИРОВАННЫХ С ПРОТЕАСОМАМИ МИКРО-РНК. © Ю. Я. Зайкова,^{1,2} Е. В. Карпова,³ Н. А. Барлев,¹ В. А. Куличкова,¹ А. С. Цимоха.¹ ¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ² С.-Петербургский

государственный политехнический университет, Россия, и ³ Университет Лестер, Великобритания.

Протеасома представляет собой многокомпонентный белковый комплекс, являющийся основным элементом системы нелизосомальной деградации белка в клетке. В ходе исследований структуры и функций протеасом нами было обнаружено наличие ассоциированных с ней микро-РНК, соочищающихся вместе с протеасомой при очистке с помощью метода ионообменной хроматографии. Микро-РНК — это малые некодирующие РНК, негативно регулирующие экспрессию генов и принимающие участие в развитии, дифференцировке, пролиферации и апоптозе клеток, а также выполняющие важную роль в процессе опухолевой трансформации. Микро-РНК обеспечивают в организме тонкую подстройку синтеза белка и играют весьма существенную роль в биологических процессах клетки с момента дифференцировки до момента ее старения.

Обнаруженные нами микро-РНК представляют собой набор малых РНК, которые на электрофореграмме представлены дискретным набором малых РНК с размером 20—300 нуклеотидов. Мечение выделенной и очищенной РНК-компоненты протеасом по 3'-концу 5' [³²P]pCp T4 РНК-лигазой подтвердило данные электрофоретического разделения ассоциированных с протеасомами РНК. Методом Нозерн-гибридизации, мы показали, что в составе РНК-компоненты протеасом присутствует РНК-транскрипт ретропозона *Alu*, который, согласно современным представлениям, может участвовать в регуляции генной экспрессии на нескольких уровнях: как мишень гомологичной рекомбинации, привнесение дополнительных сайтов сплайсинга при встраивании в интрон, изменение профиля метилирования гена, участие в транскрипции за счет набора регуляторных.

Нами был проведен скрининг РНК-компоненты протеасом методом гибридизации с микрочипами, содержащими около 700 подтвержденных и 500 неподтвержденных микро-РНК. В качестве контроля была взята смесь равных количеств исследуемых образцов. Далее проводили обратную транскрипцию с тремя специфическими праймерами согласно инструкции фирмы-изготовителя. После обратной транскрипции путем метода гибридизации полученные транскрипты сажали на микрочипы, содержащие микро-РНК, и считывали полученные результаты. Оказалось, что в составе внутри- и внеклеточной популяций протеасом как контрольных, так и получивших генотоксический стресс клеток линии K562 существует единственная микро-РНК, которая присутствует во всех популяциях протеасом — *hsa-miR-634*, мишенью которой является *USP15* — ген, кодирующий деубиквити-назу. Мы определили те микро-РНК, которые присутствуют во всех рассмотренных популяциях протеасом только в контрольных клетках: *hsa-let-7f*, *hsa-miR-765*, *hsa-miR-888**, *hsa-miRPlus-E1005*. Общие микро-РНК для внутриклеточной популяции протеасом вне зависимости от физиологического состояния клеток (т.е. в контроле и после воздействия доксорубина) — *hsa-miR-1236*, *hsa-miR-129**, *hsa-miR-634*, *hsa-miRPlus-A1073*, *hsa-miRPlus-E1218*. Гены-мишени, а следовательно, и функции в клетке для многих ассоциированных с протеасомами микро-РНК пока неизвестны. Микро-РНК в контексте онкологических заболеваний можно поделить на две группы — онкосупрессорные и онкогенные. Надо отметить, что набор ассоциированных с проте-

асомами РНК содержит в основном онкосупрессорные микро-РНК. Так, из известных супрессоров присутствуют такие микро-РНК, как *miR-206*, *miR-17-5p*, *miR-125a*, *miR-125b*, *miR-200* и семейство *let-7*. Согласно результатам исследований, микро-РНК *let-7* является одним из первых кандидатов на роль противоракового средства. Главная проблема заключается в способе доставки микро-РНК внутрь опухолевой клетки. Это сложная задача, поскольку микро-РНК не могут самостоятельно проникать в клетки человека. Согласно нашим данным, протеасомы ассоциированы с микро-РНК, а также участвуют в межклеточной коммуникации. Мы предполагаем, что, попадая одну клетку и проникая в другую, протеасомы переносят таким образом микро-РНК из клетки в клетку и обеспечивают тонкую регуляцию генной экспрессии.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01234) и в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (№ 16.740.11.0366) и «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России» на 2007—2013 гг. (№16.512.11.2242).

РОЛЬ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ В МЕХАНИЗМАХ ВХОДА Ca^{2+} В Т-ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА. © Л. Ф. Зайнуллина, Э. Р. Кудояров, Ю. В. Вахитова. ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, juvv73@gmail.com.

Ca^{2+} -каналы, сопряженные с NMDA-рецепторами, участвуют во многих фундаментальных процессах, важных для функционирования нейронов в норме и при патологии. В то же время относительно роли NMDA-рецепторов в механизмах кальциевой сигнализации в иммунокомпетентных клетках человека известно немного. По аналогии с нейронами, в которых NMDA-рецепторы наряду с потенциалзависимыми кальциевыми каналами L-типа обеспечивают основной вход Ca^{2+} в клетки, мы предположили, что в Т-лимфоцитах NMDA-рецепторы также могут опосредовать поступление Ca^{2+} при определенных условиях. В данной работе исследовано участие NMDA-рецепторов в механизмах входа Ca^{2+} в Т-лимфоциты здоровых доноров, стимулированные через Т-клеточный рецептор. Для этого были проведены серии экспериментов с неконкурентным ((+)-МК801) и конкурентным (D-AP5) антагонистами NMDA-рецепторов. В первой серии экспериментов Т-лимфоциты в течение 5 мин преинкубировали с глутаматом (1 мкМ), далее клетки отмывали и стимулировали aCD3 моноклональными антителами (10 мкг/мл) (контрольная группа, $n = 3$). Неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов (+)-МК801 (100 мкМ) добавляли в среду одновременно с aCD3 (опытная группа, $n = 3$). В другой серии экспериментов Т-лимфоциты в течение 5 мин инкубировали с глутаматом (1 мкМ), далее клетки отмывали и стимулировали aCD3 моноклональными антителами (10 мкг/мл) (контрольная группа, $n = 3$). Конкурентный антагонист NMDA рецепторов D-AP5 (100 мкМ) добавляли в среду одновременно с aCD3 (опытная группа, $n = 3$). Изменения уровня Ca^{2+} детектировали по изменению флуоресценции красителя Fluo-4AM с помощью планшетного анализатора EnSpire(r) (Perkin Elmer). Показано, что в присутствии

канального блокатора (+)-МК801 стимулированный глутаматом вход Ca^{2+} в активированные через Т-клеточный рецептор лимфоциты ингибируется на 20 %, тогда как блокада NMDA-рецепторов конкурентным антагонистом D-AP5 привела к снижению поступления Ca^{2+} всего на 12 %. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что конкурентный и неконкурентный антагонисты NMDA-рецепторов оказывают блокирующее влияние на вход Ca^{2+} , и подтверждают высказанное нами предположение об участии NMDA-рецепторов в механизмах входа Ca^{2+} в Т-лимфоциты человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований—Поволжье (проект 11-04-97093).

ДИНАМИКА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РЕОРГАНИЗАЦИИ ЯДРЫШКА В МИТОЗЕ. © О. В. Зацепина. ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, zatsepina_olga@mail.ru.

В обзоре суммированы собственные и литературные данные о молекулярных механизмах реорганизации ядрышка в митозе, а также экспериментальные подходы к моделированию некоторых стадий нуклеологенеза *in vivo*. Ядрышко — основной территориальный домен клеточного ядра — сохраняет структурную целостность и функциональную активность главным образом на стадии интерфазы. При вступлении клеток в митоз (в профазе и прометафазе) ядрышко постепенно распадается, так что в метафазе из его основных морфологических компонентов сохраняются только ядрышковые организаторы (ЯОР). Восстановление ядрышка начинается в анафазе митоза и завершается в телофазе, а нарушение этих процессов приводит к гибели клеток. Распад ядрышка в делящихся клетках начинается с инактивации транскрипции рибосомных генов (рДНК), о чем говорит применение высокочувствительных методов выявления синтеза рРНК с помощью бромированного уридинтрифосфата. Важную роль в инактивации рДНК играет фосфорилирование основного кофактора РНК полимеразы I — белка UBF. В начале митоза повышается также уровень фосфорилирования факторов процессинга рРНК, таких как фосфопротеины V23/нуклеофозмин и нуклеолин. Это уменьшает РНК-связывающие свойства факторов процессинга, повышает их растворимость и способствует миграции из ядрышка и ядра в цитоплазму. Основной киназой, фосфорилирующей ядрышковые белки в митозе, является CDK1 (p34^{cdc2}), формирующая комплекс с циклином В. Первый признак начала восстановления ядрышка — это реактивация транскрипции рДНК, которая происходит в анафазе или ранней телофазе. Существенно, что активированные ЯОР топологически связаны с ядерной оболочкой или ее фрагментами, что свидетельствует об участии оболочки ядра в возобновлении транскрипции рДНК в митозе. Одновременно с активацией ЯОР формируются структуры, получившие название «цитоплазматические ядрышковые дериваты». Мы показали, что инактивация комплекса CDK1—циклин В приводит к преждевременной сборке дериватов в метафазе митоза. Подобно телофазным предшественникам, их индуцированные аналоги содержат основные белковые факторы процессинга рРНК, а также непротессированную 47S пре-рРНК и ее интермедиаты.

Тот факт, что число ядрышковых дериватов уменьшается по мере завершения митоза, а в их составе начинают преобладать 18S и 28S рРНК, указывает на возможность участия дериватов в процессинге пре-рРНК, которая сохраняется при митозе. Пре-рРНК, по-видимому, играет важную роль в поддержании структурной целостности предшественников ядрышка, поскольку ингибирование ее синтеза перед митозом блокирует формирование дериватов в митозе. Индукция дериватов в клетках, синхронизированных в К-метафазе, сопровождается ускорением электрофоретической подвижности основных белковых компонентов дериватов — V23/нуклеофозмина и нуклеолина, что свидетельствует о снижении уровня их фосфорилирования. На основании полученных и литературных данных высказано предположение о том, что инактивация комплекса CDK1—циклин В в постметафазе приводит не только к активации транскрипции рДНК, но и к частичному дефосфорилированию V23/нуклеофозмина и нуклеолина. Снижение уровня фосфорилирования этих белков способствует их химическому взаимодействию с незрелой пре-рРНК, присутствующей в цитоплазме клеток, и формированию неустойчивых супрамолекулярных комплексов — цитоплазматических дериватов ядрышка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (грант 14.740.11.0925).

ХРОМОМЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ИНТЕРФАЗНЫХ ХРОМОСОМ ДРОЗОФИЛЫ © Т. Ю. Зыкова, С. А. Демаков, В. Ф. Семешин, О. В. Демакова, Л. В. Болдырева, Ф. П. Гончаров, Е. С. Беляева, И. Ф. Жимулев. © ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск.

Политенные хромосомы дрозофилы имеют гигантские размеры и характерную морфологию, которая возникает вследствие чередования плотноупакованного хроматина дисков и менее плотных междисков и пуффов. Молекулярно-генетическая организация этих структур остается загадкой с момента открытия политенных хромосом. Новые подходы к маркированию материала междисков и дисков посредством картирования районов поздней репликации и недорепликации, варьирования генной плотности (диски интеркалярного гетерохроматина), получение искусственных дисков и междисков, содержащих только известную ДНК, были разработаны в последние годы. В сочетании с результатами проектов крупномасштабной локализации белков в целом геноме (modENCODE project) возможно картирование хромосомных структур интерфазной политенной хромосомы. В результате применения вышеуказанных методов выявлены два типа дисков, а также междиски: поздно реплицирующиеся диски интеркалярного хроматина характеризуются низкой плотностью генов, обогащены белками SUUR и ламином В; ранореплицирующиеся диски содержат активные гены; междиски представляют собой структуры размером 1—3 т. п.н. и характеризуются уникальными последовательностями ДНК, локализацией белков, специфичных для открытого хроматина, отсутствием гистона H1, сниженной плотностью нуклеосом, гиперчувствительностью к ДНКазе I, высоким уровнем инсерций P-элементов, локализацией белков ORC (Origin Recognition Complex) и соответствуют межгенным областям и 5'-некодирующим экзонам генов. Белки открытого хро-

матина, характерные для междисков, в рамках всего генома дрозофилы демонстрируют преимущественную локализацию. Таким образом, междиски связаны с белками, участвующими в общеклеточных процессах: транскрипции (содержат сайты связывания РНК-полимеразы II), репликации (содержат сайты связывания белков пререпликативного комплекса) и модификации хроматина (белки WDS и ISWI).

На основании сопоставления локализации различных белков и характеристик хроматина показано, что в интерфазных хромосомах диплоидных клеток есть структуры, гомологичные дискам и междискам политенных хромосом, и границы этих структур в двух типах хромосом одинаковы на физической карте.

Полученные данные позволяют предположить, что рисунок дисков является универсальным принципом организации интерфазных хромосом — как политенных, так и неполитенных — из митотических делящихся клеточных культур.

ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КУЛЬТУРУ НЕЙРАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК. © Н. Е. Зюмченко,¹ А. Н. Воронова,¹ О. В. Нестерова.¹ ¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, nez@bio.dvgu.ru.

Гуминовые кислоты представляют собой люминесцентные, темно-коричневые органические кислоты с негидролизуемой и гидролизуемой частями из различных активных функциональных групп. Показано, что различные производные гуминовых кислот являются высокоэффективными энтеросорбентами, мягкими иммуномодуляторами и биорегуляторами, снимают любую интоксикацию, повышают активность здоровых клеток. При этом они хорошо растворимы в воде и оказывают биологический эффект при очень малых концентрациях (около 0.001 %). Однако для окончательного установления лечебно-профилактических эффектов необходимы дополнительные исследования на модельных объектах, в том числе и на культурах клеток.

Цель нашей работы заключалась в изучении влияния гуминовых препаратов на культуру нейральных прогениторных клеток.

Материалом для исследований послужили гуминовые препараты, выделенные из верхнего горизонта буроземов (далее — гумат), и гумивит-К (далее — гумивит), выделенный из окисленного бурого угля, продающийся в аптеках г. Владивостока в качестве БАД.

Биологическое действие препаратов изучали на культуре нейральных клеток из обонятельных луковиц крысиных эмбрионов (21-дневных), которую предварительно выращивали в стандартных культуральных условиях. В первой части эксперимента клетки помещали в среду с различными концентрациями гуминовых препаратов (0.1, 0.01 и 0.001 %), при этом в часть лунок планшета добавляли также стандартный образец для ионов свинца (II) (ГСО 7252-96) в конечной концентрации 0.03 мг/л (предельное значение, ПДК, по свинцу). В другой части — клеточную суспензию помещали в среду без добавления эмбриональной телячьей сыворотки с ее содержанием 2 и 12 % и конечной концентрацией гуминовых веществ 0.001 %.

После 8, 14, 21 и 30 сут культивирования материал был зафиксирован 4%-ным параформальдегидом с

переводом в 70%-ный спирт. За 1 сут до фиксации в часть лунок добавляли бромдезоксигуанидин (БДУ). Для определения эффективности роста и дифференцировки культуру после фиксации окрашивали мышинными антителами на БДУ и тубулин-бета III (маркер нейральной дифференцировки клеток). Вторичные антитела были конъюгированы с Alexa 488 или Alexa 546.

Иммуногистохимическое изучение нейральных прогениторных клеток при разных концентрациях сыворотки в течение 1 мес эксперимента выявило незначительный эффект гуминовых препаратов на пролиферацию и дифференцировку, при этом большая часть биологических эффектов проявлялась при длительном культивировании с добавлением исследуемых веществ.

Установлено, что препарат, выделенный из верхних горизонтов бурозема (гумат), проявляет биологическое действие при более низких концентрациях, чем препарат гумивита. Кроме того, именно при низких концентрациях проявляется защитное действие гуминовых препаратов как активных сорбентов двухвалентных, в том числе и тяжелых, металлов.

Таким образом, исследование биологического действия гуминовых препаратов на культуре клеток является перспективным и требует дальнейших более детальных проработок.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АДГЕЗИИ И РАСПЛАСТЫВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ НА РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ ПРИ СОЧЕТАННОМ ДЕЙСТВИИ ПЕПТИДНОГО МОДУЛЯТОРА, ВЫЯВЛЕННОГО В СТРУКТУРЕ КОЛЛАГЕНА. © В. П. Иванова,¹ З. В. Ковалева.² ¹ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, vallet@iephb.ru, и ²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Практически все белки внеклеточного матрикса (ВКМ) относятся к мозаичным или мультидоменным белкам. Коллаген, также являющийся мозаичным белком, может взаимодействовать через определенные модули не только с белками ВКМ, но и со специфическими клеточными рецепторами. Помимо стационарных модулей связывания с клеточными рецепторами коллагены содержат дискретные повторяющиеся пептидные модули, которые не участвуют в рецепторном узнавании и физиологическая активность которых проявляется только после их высщепления в ходе частичного протеолиза коллагеновых молекул при ремоделировании ВКМ. Ранее в первичной структуре α -цепей различных типов коллагенов нами был выявлен повторяющийся пептидный модуль GER, обладающий способностью регулировать адгезионные свойства эпителиоподобных клеток. Поскольку регуляторная активность пептидов зависит как от типа культивируемых клеток, так и от условий их микроокружения, в представленной работе исследовали влияние трипептидного фрагмента коллагена GER на процессы прикрепления и распластывания эмбриональных фибробластов мыши линии STO к различным субстратам — полистироловому пластику и пластику, покрытому поли-L-лизиним, фибронектином или желатином. Установлено, что пептид GER участвует в регуляции адгезии и распластывания фибробластов. При этом величина воздействия пептида на клеточный ответ зависела как от способа внесения пептида в культуральную среду, так и от типа ис-

пользуемого субстрата. При соинкубации фибробластов с пептидом наблюдалась стимуляция адгезии и распластывания клеток на необработанном пластике и пластике, покрытом фибронектином или желатином. В то же время пептид не изменял клеточную адгезию на иммобилизованном поли-L-лизине. Степень активации адгезионных процессов, наблюдаемая при соинкубации клеток с пептидом, на фибронектине была выше таковой на желатине. Возможно, этот эффект связан не только с активацией пептидом различных типов интегриновых рецепторов или формированием различающихся по составу и времени функционирования фокальных адгезий, но и с возможной структуризацией молекул субстрата (фибронектина или желатина) исследованным пептидом. Предварительная обработка клеток пептидом приводила к частичному ингибированию адгезии и распластывания фибробластов на фибронектине и желатине. Обнаруженный ингибирующий эффект пептида на способность клеток прикрепляться и распластываться на фибронектине и желатине после преинкубации клеток с этим препаратом, вероятно, обусловлен его взаимодействием с определенными участками интегринов, включая и RGD-связывающие модули. Обнаруженная различная степень ингибирования клеточной адгезии и распластывания на фибронектине и желатине свидетельствует о возможном вовлечении различных интегриновых рецепторов в процессы регуляции исследованным пептидом адгезионных процессов на различных субстратах. Полученные результаты свидетельствуют о сочетанном влиянии функциональной активности пептида и индивидуальных особенностей строения субстрата на протекание адгезии и распластывания эмбриональных фибробластов.

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ (ENaC). © Д. В. Илатовская,^{1,2} В. В. Левченко,² Т. С. Павлова,² Ю. А. Негуляев,¹ А. В. Старуценко.² ¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, и ² ФГБУН Медицинский колледж Висконсина, Милуоки, США.

Эпителиальный натриевый канал (ENaC) является ключевым транспортером, участвующим в тонкой регуляции реабсорбции Na^+ в дистальном нефроне. Известно, что активность ENaC увеличивается под воздействием инсулина, инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) и эпидермального фактора роста (ЭФР). Недавно было показано, что пероксид водорода также повышает активность ENaC. В данной работе была исследована возможная корреляция установленных эффектов инсулина, ИФР-1 и ЭФР на ENaC с образованием активных форм кислорода в клетках собирательных трубочек почки мыши.

Иммуноблоттинг показал, что в клетках линии mpkCCD_{c14} экспрессируются субъединицы NOX1, NOX2, NOX4, $\text{p}22^{\text{phox}}$, $\text{p}67^{\text{phox}}$ и Rac1 комплекса НАДФ-оксидазы, продуцирующего активные формы кислорода в клетке. Обработка клеток 100 нМ инсулина, 100 нг/мл IGF-1 или 50 нг/мл EGF вызвала подъем в продукции пероксида водорода. Концентрацию пероксида водорода измеряли по уровню интенсивности флуоресценции реагента $\text{CM-H}_2\text{DCF-DA}$.

Эффекты инсулина, ИФР-1 и ЭФР на токи через ENaC были показаны в экспериментах по измерению трансэпителиального тока через монослой клеток mpkCCD_{c14} , выращенных на полупроницаемой подложке.

В результате аппликации инсулина, ИФР-1 и ЭФР ENaC-опосредованный амилорид-чувствительный ток значительно увеличивался по сравнению с контрольными клетками. Предобработка клеток ингибитором активности НАДФ-оксидазы апоцинином (0.5 мМ) снижала ENaC-опосредованный ток, стимулированный инсулином, ИФР-1 и ЭФР; апоцинин также оказывал ингибирующее влияние на формирование пероксида водорода, происходящее под воздействием этих гормональных факторов.

Нами также было подтверждено, что активные формы кислорода могут активировать ENaC-опосредованный ток. Для этого амилорид-чувствительный ток через монослой клеток mpkCCD_{c14} был измерен в присутствии ксантина и ксантинооксидазы. Ксантинооксидаза катаболизирует ксантин до мочево́й кислоты и в сопряженной реакции восстанавливает кислород до супероксида, спонтанно дисмутирующего в пероксид водорода. Было показано, что в присутствии ксантина и ксантинооксидазы трансэпителиальный ENaC-опосредованный ток значительно повышается.

Для подтверждения роли НАДФ-оксидазы в эффектах ЭФР на канал была создана линия клеток собирательных трубочек почки мыши M-1 со стабильно сниженной экспрессией малой ГТФазы Rac1, которая является одной из ключевых субъединиц этого комплекса. Электронная микроскопия и визуализация актинового цитоскелета показали отсутствие морфологических изменений в клетках со сниженной экспрессией Rac1 по сравнению с диким типом. Как показано в экспериментах по измерению трансэпителиального тока, аппликация ЭФР не вызывала повышения амилорид-чувствительного тока в клетках со сниженной экспрессией Rac1.

Таким образом, ИФР-1, ЭФР и инсулин влияют на ENaC, действуя через механизм, приводящий к продукции активных форм кислорода. Одной из возможных гипотез, объясняющих увеличение активности работы ENaC под воздействием активных соединений кислорода, является разрушающее воздействие последних на актиновый цитоскелет, так как известно, что деполимеризация актиновых филаментов вызывает повышение вероятности открытого состояния ENaC.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Национального института здоровья США (HL108880) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00995).

АНАЛИЗ ФОРМЫ КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ IN VITRO. © О. Н. Карпусь,¹ Т. И. Лебедева,² И. З. Еремينا,² О. Б. Саурова,² И. Б. Алиева.^{1,2} ¹ Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, $\text{igina_alieva@belozersky.msu.ru}$, и ² Медицинский факультет Российского университета дружбы народов, Москва.

Форма клеток различных тканей организма зависит от выполняемой ими функции и в норме может служить морфологическим критерием, по которому производится классификация тканей организма. Клетки изменяют свою форму в ответ на внутренние и внешние воздействия *in vivo* и *in vitro*, изменение формы является критерием трансформации клеток при злокачественном перерожде-

нии. В настоящей работе были поставлены следующие задачи: проанализировать разнообразие форм клеток карциномы человека *in vitro*; предложить параметры для количественного морфологического анализа выделенных форм; использовать полученные параметры для характеристики формы клеток, а также для анализа субпопуляций клеток быстрорастущей гепатокарциномы, выделенной из опухоли больного животного.

Актуальность применения предварительного морфологического анализа субпопуляции клеток гепатокарциномы определяется необходимостью предварительной дифференциации клеток при использовании целого ряда трудоемких методов, таких как электронная микроскопия. Критерием для характеристики формы клеток *in vitro* было выбрано количество стабильных краев на ее ламелле. Используя этот критерий, выделяли следующие морфологические формы клеток: круглые (не имеющие стабильных краев), дисковидные (с единственным стабильным краем), фибробластоподобные (имеющие два стабильных края), звездчатые (имеющие более двух стабильных краев). В работе анализировали следующие параметры: периметр клетки, ее площадь, площадь ламеллы, отношение периметра к площади. Оказалось, что средние значения периметров клеток выделенных форм различаются незначительно (не более чем на 10 %) и составляют 208.61 ± 8.52 мкм. Площади клеток различались: наибольшая площадь была у дисковидных клеток (2576.39 ± 277.82 мкм²), она в 2 раза превосходила площадь звездчатых клеток (1393.73 ± 90.59 мкм²). Площадь ламеллы клеток разной формы напрямую зависела от площади клетки в целом: с увеличением площади клетки величина ламеллы также возрастала, с уменьшением — падала. Для характеристики извилистости края клетки использовали отношение периметра клетки к ее площади. Соотношение P/S минимально у клеток первых двух выделенных типов (0.08 мкм⁻¹), чуть выше у фибробластоподобных (0.10 мкм⁻¹) и максимально у звездчатых клеток (0.16 мкм⁻¹), имеющих наиболее «извилистый» край. Таким образом, предложенный параметр P/S позволяет оценить, насколько форма данных клеток отличается от округлой. Предложенные параметры были использованы нами для анализа морфологических форм субпопуляций клеток быстрорастущей гепатокарциномы. При гепатоканцерогенезе возможна быстрая, скачкообразная прогрессия — из перевиваемой медленно растущей гепатокарциномы мыши был выделен быстрорастущий вариант гепатокарциномы (б-Гк). Выщепившийся вариант отличается от исходной опухоли по многим признакам, что, по-видимому, связано с нарушениями в системе интегринов. На светооптическом уровне в культивируемой *in vitro* б-Гк можно выделить три морфологических типа клеток: распластанные одиночные клетки веретеновидной формы; гигантские многоядерные полиплоидные клетки и клетки шаровидной формы, организованные в многоклеточные слабоприкрепленные к субстрату сфероиды. Поскольку светооптический анализ клеток последнего типа был невозможен, электронно-микроскопический анализ в совокупности с предложенными параметрами позволил охарактеризовать количественно различия между типами клеток, отражающие степень нарушения их интегриновой системы.

РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО РИБОСОМНОГО БЕЛКА S18-2 (MRPS18-2) В ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТ-

КИ. © Е. В. Кашуба,^{1,2} М. Ю. Юрченко,¹ С. Дарекар,² Б. Снопок,³ С. П. Енамандра,² Л. Н. Ковалевская,¹ Л. Г. Бучинская,¹ Г. Кляйн.² ¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии (ИЕПОР) им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина, Elena.Kashuba@ki.se, ²Каролинский институт, Стокгольм, Швеция, и ³Институт физики полупроводников им. В. Е. Лашкарева НАН Украины, Киев, Украина.

При изучении процесса малигнانتной трансформации В-лимфоцитов при инфекции их вирусом Эпштейна—Барр нами был найден цитоплазматический митохондриальный рибосомальный белок MRPS18-2 (S18-2), связывающийся с трансформирующим ядерным вирусным белком EBNA-6, с помощью дрожжевой двухгибридной системы (Kashuba et al., 2008). Ранее нами было обнаружено, что белок S18-2 связывается с белком ретинобластомы (RB), причем в сайте, ответственном за взаимодействие RB с фактором транскрипции E2F1 (Snopok et al., 2006). EBNA-6 взаимодействует с S18-2 и транслирует его в ядро, при этом образуется трехмолекулярный белковый комплекс, где S18-2 служит мостиком между EBNA-6 и RB. Таким образом, ингибируется связывание белка RB с E2F1, т. е. инактивируется репрессорная функция RB в регуляции клеточного цикла (Kashuba et al., 2008).

Недавно нами было обнаружено, что повышенная экспрессия белка S18-2 в первичных эмбриональных фибробластах крысы приводит к их иммортализации (Kashuba, 2009). Следует отметить, что полученные иммортализованные клетки (18IM) утратили контактное ингибирование, образовывали фокusy при росте в культуре и обрели способность расти в полужидком агаре. Эти клетки прекратили экспрессировать маркеры, характерные для фибробластов, такие как виментин, актин гладких мышц и др., однако на них были определены маркеры, характерные для эмбриональных стволовых клеток, такие как SSEA-1, Sox2 и Oct4. Часть клеток 18IM при росте в конфлюэнтных культурах экспрессировала также маркеры, характерные для экто- и эндодермы, такие как пан-кератин, бета-III-тубулин и МНС класса II. Некоторые клетки также окрашивались красителем Oil red O, что свидетельствует о дифференцировке клеток 18IM (Kashuba et al., 2009). При сравнении паттерна экспрессии генов в исходных эмбриональных фибробластах крысы и клеток 18IM методом микрочипов была обнаружена различная экспрессия 4209 генов, входящих в 19 клеточных путей. Многие сигнальные пути, характерные для быстро пролиферирующих клеток, были индуцированы в клетках 18IM. Это же было найдено для генов, регулирующих транскрипцию и трансляцию в целом. Эти гены включают в себя факторы элонгации, а также энзимы, контролирующие реакции метаболизма и редокс-реакции. Клетки 18IM продуцировали пируваты на более высоком уровне по сравнению с первичными фибробластами, что может свидетельствовать о повышенном синтезе АТФ (Yenamandra et al., 2012). Однако механизм действия белка S18-2 остается неисследованным. Для изучения механизма клеточной трансформации при повышенной экспрессии белка S18-2 мы используем модельную систему *Danio rerio*. Оверэкспрессируя белок S18-2 и предотвращая его транскрипцию с помощью специфического морфолино в модельных животных, мы ожидаем определить процессы, в которых белок S18-2 играет важную роль.

Список литературы

- Kashuba E. et al. 2008. PNAS. 105 (14) : 5489—5494.*
Snopok B. et al. 2006. Anal. Bioanal. Chem. 386 (7—8) : 2063—2073.
Kashuba E. et al. 2009. PNAS. 106(47) : 19 866—19 871.
Yenamandra S. P. et al. 2012. Cell Death Dis. 3 : e357.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРОТИВО-ОПУХОЛЕВОМ ИММУНИТЕТЕ: РОЛЬ НЕОАНГИОГЕНЕЗА И ВОСПАЛЕНИЯ. © *Е. П. Киселева*. Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург.

Гипотеза иммунного надзора Бернета доминирует в научных исследованиях в области онкологии уже более полувека. Однако и в настоящее время она остается недоказанной, поскольку не выявлен иммунологический механизм, с помощью которого должны элиминироваться трансформированные клетки в организме. В настоящее время основная защитная роль все в большей степени переносится с Т-лимфоцитов на клетки врожденного иммунитета. Между тем появился новый большой раздел науки — сосудистая биология, который изменил наши представления о новообразовании сосудов. Изучение механизмов регуляции ангиогенеза выявило новую роль воспалительной инфильтрации, которая всегда сопровождает опухолевый рост. Оказалось, что клетки врожденного иммунитета, включая макрофаги, дендритные клетки, полиморфоядерные лейкоциты и естественные киллеры, активно способствуют новообразованию опухолевых сосудов. Как это ни парадоксально, но эти данные указывают на то, что во многих ситуациях клетки врожденного иммунитета не защищают организм, а способствуют опухолевому росту. Так была сформирована точка зрения о том, что клетки врожденного иммунитета играют двойственную роль в организме и могут как способствовать, так и препятствовать опухолевому росту.

В последнее время в научной литературе также обсуждается вопрос о потенциальной иммуногенности мертвых клеток. Считается, что поврежденные клетки выделяют вещества, называемые молекулярными паттернами повреждения (DAMPs), которые способны вызывать воспалительную реакцию в организме. Эти данные имеют существенное значение, поскольку известно, что в результате нарушений кровоснабжения в солидных опухолях спонтанно возникают ишемизированные, а затем и некротизированные области. Кроме того, гибель опухолевых клеток сопровождается также применением цитостатической и лучевой терапии. Таким образом, иммунный ответ организма на рост опухолей состоит из двух слагаемых — ответа на опухолевые антигены и продукты живых опухолевых клеток, с одной стороны, а также реакций на факторы, выделяемые умирающими клетками опухолей, — с другой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00429).

ВЛИЯНИЕ ПОЛИХРОМАТИЧЕСКОГО ВИДИМОГО И ИНФРАКРАСНОГО СВЕТА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ТУМОРОГЕННОСТЬ КЛЕТОК МЫШИНОЙ ГЕПАТОМЫ 22А. © *Н. А. Князев, В. В. Кошеверова, К. А. Са-*

моилова, Н. А. Филатова. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, nickolayknz@gmail.com.

В экспериментах *in vitro* изучали действие полихроматического видимого света, сочетанного с инфракрасным (ВИД+ИК, 480—3400 нм) и полного спектра видимого излучения (ВИД, 385—750 нм) на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток МГ22а. Изменение туморогенных свойств клеток МГ22а после тех же воздействий изучали в экспериментах *in vivo*. Показано, что облучение клеток гепатомы двумя видами полихроматического света в широком диапазоне доз (4.8—38.4 Дж/см²) не увеличивало долю погибших клеток, не замедляло их пролиферацию в течение 24—72 после облучения, но даже способствовало (через 24 ч) более интенсивной пролиферации клеток. У клеток, облученных ВИД+ИК-светом в дозе 4.8 Дж/см² и ВИД в дозе 38.4 Дж/см², возрастал пролиферативный индекс (в 1.6 и 1.4 раза соответственно) по сравнению с контролем. Эксперименты *in vivo* показали, что в течение 30 сут после трансплантации сингенным мышам клеток, облученных ВИД+ИК-светом в дозе 4.8 Дж/см², объем опухоли уменьшался (в 2.6—4.1 раза) на всех сроках наблюдения, при этом снижалась и прививаемость облученных клеток, а выживаемость мышей-опухоленосителей не менялась. Трансплантация клеток, облученных тем же светом в дозе 9.6 Дж/см², не приводила к изменениям объема и прививаемости опухолей по сравнению с контролем.

Основной вклад в противоопухолевое действие ВИД+ИК-света, по-видимому, вносит ВИД компонента, поскольку трансплантация мышам клеток, облученных только ВИД-светом в дозе 38.4 Дж/см², также стимулировала пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*, способствовала столь же выраженному снижению их туморогенных свойств, как и в случае сочетанного ВИД+ИК-излучения. В этом излучении инфракрасная компонента усиливала противоопухолевое действие ВИД-света, в результате чего оно проявлялось в дозах в 8 раз меньше (4.8 Дж/см²).

НОВЫЙ МЕХАНИЗМ ОПУХОЛЬ-ПРОМОТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ. © *В. А. Кобляков, М. С. Волков, В. А. Евтеев*. НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва.

Общепринято, что свойством, необходимым для опухолевых промоторов, является способность стимулировать пролиферацию, ингибировать апоптоз и нарушать межклеточные щелевые контакты. Предполагается, что канцерогенные загрязнители окружающей среды — полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) — реализуют промоторную стадию канцерогенеза благодаря способности активировать Ah-рецептор. В то же время имеются данные, свидетельствующие о том, что изменения клеточных функций при действии ПАУ не зависят от экспрессии в клетках Ah-рецептора. Для определения роли Ah-рецептора в опухоль-промоторном действии ПАУ мы исследовали влияние ряда канцерогенных лигандов Ah-рецептора на пролиферативную активность, на активацию транскрипционных факторов NF-κB и AP-1 в клетках гепатом, экспрессирующих (Нер G2) и не экспрессирующих (Г27) Ah-рецептор. Мы показали, что канцерогенные ПАУ в отличие от неканцерогенного бен-

зо/е/пирена стимулируют пролиферацию клеток, как экспрессирующих, так и не экспрессирующих Ah-рецептор. Более выраженная активация пролиферации в обоих типах клеток наблюдалась при культивировании их в среде с низким содержанием сыворотки (0.5 %). Стимуляция пролиферации реализуется через ERK1/2 MAP-киназный путь, поскольку наблюдается увеличение образования фосфорилированной формы ERK1/2 под действием БП. Активацию транскрипционных факторов NF-κB и AP-1 определяли по активности люциферазного репортерного гена под контролем NF-κB или AP-1-респонсивного элемента, трансфицированного в клетки Hep G2 и Г27. ПАУ активировали NF-κB более эффективно в клетках Г27, а AP-1 — в клетках Hep G2. В обоих типах клеток активация NF-κB и AP-1 была более выражена, когда клетки находились в состоянии покоя. Полученные результаты свидетельствуют о том, что опухоль-промоторное действие ПАУ может реализовываться как по Ah-рецепторзависимому пути, так и независимо от Ah-рецептора. В последнем случае объект воздействия ПАУ остается неизвестным.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00107-а).

АНТИАПОПТОТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ КАНЦЕРОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ КАК ФАКТОР ОПУХОЛЕВОЙ ПРОМОЦИИ. © В. А. Кобляков, М. С. Волков, Н. А. Болотина. НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва.

Канцерогены окружающей среды, такие как полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), являются «полными канцерогенами», реализуя как стадию инициации, так и стадию промоции в образовании опухоли. Механизм действия ПАУ на стадии инициации достаточно хорошо исследован, известна структура «конечного канцерогена» для таких веществ, как бензо/а/пирен, которая является 7,8,9,10-дигидродокси-9-10-эпокси бензо/а/пиреном. В то же время механизм опухоль — промоторного действия этих веществ мало изучен. Общепринято, что свойствами, необходимыми для опухолевых промоторов, являются способность стимулировать пролиферацию, ингибировать апоптоз и нарушать межклеточные щелевые контакты. При исследовании различных клеточных моделей было сделано заключение о том, что стадия промоции в отличие от стадии инициации реализуется по негенотоксическому пути и опухолевый промотор не образует стабильных ковалентных связей с клеточными компонентами. Для ПАУ известен только один объект воздействия этих веществ в исходном, химически инертном состоянии — это Ah-рецептор. Показано, что активация Ah-рецептора канцерогенными ПАУ приводит к образованию транскрипционного комплекса, стимулирующего активацию различных генов, кодирующих белки, участвующих в метаболизме ксенобиотиков. Помимо этого, известно, что сам Ah-рецептор находится в комплексе с рядом регуляторных белков, таких как белок ретинобластомы. Взаимодействие ПАУ с Ah-рецептором может нарушить этот комплекс и изменить функционирование регуляторных белков, находящихся в комплексе с Ah-рецептором. Исходя из этого предполагается, что промоторная стадия канцерогенеза при действии канцеро-

генных ПАУ реализуется благодаря взаимодействию этих веществ с Ah-рецептором. Однако имеется довольно много публикаций, в которых показано, что некоторые эффекты канцерогенных ПАУ, ассоциированные с промоцией, реализуются независимо от Ah-рецептора. Ранее нами было показано, что нарушение межклеточных щелевых контактов при действии ПАУ происходит в клетках, в которых отсутствует экспрессия Ah-рецептора. В настоящем исследовании мы изучали влияние канцерогенных ПАУ на экспрессию антиапоптотического фактора NF-κB и на апоптоз в клетках гепатомы 27, в которых отсутствует экспрессия Ah-рецептора. Мы показали, что бензо/а/пирен и ряд других канцерогенных ПАУ стимулируют активность NF-κB. Культивирование клеток гепатомы 27 в среде без ростовых факторов увеличивает гибель клеток. Введение бензо/а/пирена ингибирует гибель клеток, что свидетельствует об антиапоптотическом действии бензо/а/пирена и о существовании ранее неизвестного механизма опухоль-промоторного действия канцерогенных ПАУ.

РОЛЬ ГЕНА *hrs* В ФОРМИРОВАНИИ КРЫЛА *DROSOPHILA MELANOGASTER*. © С. А. Копыл,¹ Т. Д. Дубатолова,¹ Е. В. Мариловецова,¹ Л. В. Омелянчук.¹ ¹ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск.

HRS (Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase substrate) является одним из важнейших белков-регуляторов везикулярного трафика и сортировки белковых молекул, поглощаемых в процессе эндоцитоза. В частности, Hrs принимает участие в направлении на лизосомную деградацию различных рецепторов. Таким образом, дефекты белка Hrs приводят к различным аномалиям развития.

Проведенное нами исследование функции гена *hrs* в развитии крыла дрозофилы подтвердило его участие в процессе формирования границы D/V крылового имагинального диска (изменение морфологии MTR, паттерн репортера *neur-LacZ* в MTR при эктопической экспрессии *UAS-hrs* в почке крыла). Было выяснено, что паттерн экспрессии *ap-LacZ* при эктопической экспрессии *UAS-hrs* в почке крыла также отличается от нормы. Поскольку ген *ap* является наиболее ранним геном, демаркирующим границу D/V крыла, было сделано заключение о существовании более ранней, чем известная в настоящее время, функции *hrs* в формировании этой границы.

Исследование эффекта сайленсирующего конструкта *RNAi-hrs* показало существование еще одной функции гена *hrs* — его участие в процессе сужения прожилок крыла (*vein refinement*). Анализ структуры транскриптов гена *hrs* позволяет полагать, что за процесс сужения жилок отвечает транскрипционная форма *hrs-B*.

Эктопическая экспрессия гена *ey* в крыловом имагинальном диске под действием драйвера *1096-Gal4* приводит к тому, что часть клеток крылового диска меняет свою судьбу и становится клетками глаза. Эктопические глаза индуцируются в определенных участках крылового диска и формируют стабильный паттерн на крыле взрослой мухи. Мы показали, что эктопическая экспрессия *Wg* ингибирует образование эктопических глаз, и, наоборот, в местах эктопической экспрессии *Ey* экспрессия *Wg* редуцирована. Таким образом антагонизм действия *Ey* и *Wg*, характерный для нормального развития глаза, имеет место также при образовании эктопического глаза. Экс-

перименты с оверэкспрессией Hrs, способного ингибировать Wg-сигналинг, согласуются с тезисом об антагонистичности Wg и Eу в эктопических глазах.

Нами был создан химерный GFP-белок, включающий в себя VHS- и FYVE-домены Hrs. Исследование локализации этого белка в клетках слюнных желез, трофоцитах яичников и стволовых клетках семенников дрозофилы показало, что имеет место одна и та же картина: белок локализуется на ядерной мембране и клеточной стенке. Таким образом, найден GFP-маркер, позволяющий наблюдать преобразования оболочки ядра.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИСЕКЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ НА МОДЕЛИ ФОРМИРОВАНИЯ ЭКТОПИЧЕСКОГО ГЛАЗА У *DROSOPHILA MELANOGASTER*. © С. А. Копыл, Т. Д. Дубатолова, Е. И. Волкова, Л. В. Омелянчук. ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск.

Клеточная пластичность стволовых клеток позволяет им формировать клетки различных органов. У дрозофилы известно явление трансдетерминации, при котором клетки одного органа изменяют свою судьбу и превращаются в клетки другого органа. Мы развиваем подход к изучению генетического контроля клеточной пластичности на модели превращения крыло—глаз *Drosophila melanogaster*. Эктопические глаза формируются в различных органах *D. melanogaster* с помощью экспрессии мастер-гена *ey* в системе GAL4—UAS. Индукция эктопических глаз происходит в определенных участках имагинальных дисков, которые частично совпадают с зонами, в которых происходит трансдетерминация. Это позволяет рассматривать систему индукции эктопических глаз как модель для изучения клеточной пластичности. В работе проведен поиск трансгенов (UAS-, RNAi- и EP), совместная эктопическая экспрессия которых с мастер-геном *ey* в крыловом имагинальном диске вызывает изменение морфологии эктопических глаз на крыле по сравнению со случаем эктопической экспрессии только *ey*.

Среди 31 изученного трансгена клеточного цикла положительный эффект на размер эктопического глаза был получен для UAS-*dia*. Трансген действует на клетки эктопического глаза в то время, когда они находятся еще в состоянии крыловой детерминации, а увеличение эктопического глаза, вероятно, связано с изменением движения морфогенов, которое в свою очередь опосредовано активным цитоскелетом, в формировании которого участвует *dia*. Среди 19 трансгенов, кодирующих опухолевые супрессоры, не было найдено модификаторов эктопического глаза. Среди 13 трансгенов, соответствующих сегмент-специфическим генам, эффект увеличения эктопических глаз наблюдали для 4 гомеозисных генов. Среди хроматиновых генов эффект увеличения эктопического глаза наблюдали в трех случаях. Это показывает, что изменение «эпигенетического ландшафта» клеток играет существенную роль в поддержании клеточной пластичности. Среди 26 генов везикулярного трафика эффект увеличения глаза наблюдали для *hrs*, *Csp* и *Rab7*. Исследования показали, что для этих трансгенов эффект на эктопический глаз обусловлен изменением активности морфогена Wg с последующим расширением зоны клеток, которые становятся на путь изменения клеточной судьбы. Трансген UAS-*Upd* также приводит к увеличению эктопического глаза. Роль гена *Upd*, кодирующего лиганд

сигнального пути JAK-STAT, в процессе образования эктопического глаза состоит в ингибировании дифференцировки клеток и усилении их пролиферационного обновления. Увеличение размера эктопического глаза под действием конструктора UAS-*Diap* показывает, что процесс апоптоза клеток также играет роль в процессе изменения клеточной судьбы.

Дополнительно мы провели поиск зависимых от дозы модификаторов эктопического глаза. Для этого мы использовали набор делеций, полностью перекрывающих II хромосому дрозофилы. Было обнаружено несколько делеций, которые давали эффект увеличения эктопического глаза. Исследование района одной из делеций показало, что за эффект отвечает ген *sxc*, кодирующий белок, принадлежащий к группе PcG, отвечающей за ремоделинг хроматина. Это служит дополнительным подтверждением роли генов, поддерживающих эпигенетическое состояние клетки, в процессах изменения ее клеточной судьбы.

АНАЛИЗ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОНУКЛЕАРОВ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА — НОСИТЕЛЯ ВЛКРС ПО ЯДЕРНОМУ АНТИГЕНУ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ. © Г. П. Косякова,¹ А. Ф. Яковлев,¹ С. Н. Прошин,² П. Д. Шабанов.² ¹ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных и ² Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург—Пушкин, galkos1@mail.ru.

Клеточный геном *in vivo* находится под контролем разнообразных молекулярных механизмов, одной из задач которых является скоординировать функционирование клетки в клеточной популяции. Одним из факторов, участвующих в поддержании гомеостаза генома клетки является ядерный антиген пролиферирующих клеток, получивший свое оригинальное название главным образом потому, что впервые был выявлен в популяциях активно пролиферирующих опухолевых клеток (ЯАПК). Для выявления ЯАПК широко используется иммуноцитохимический подход, позволяющий не только локализовать ЯАПК, но и оценить по балльной системе (классы ЯАПК) степень интенсивности иммуноцитохимической реакции, а значит, и степень экспрессии антигена (Nolte et al., 2005). С целью ответа на вопрос о том, существуют ли различия в антигенном статусе между лимфоцитами периферической крови коров, отрицательных в РИД и пораженных ВЛКРС, мы исследовали периферическую кровь от 14 животных каждой группы, при этом в каждом случае было проанализировано не менее 100 лимфоцитов периферической крови. У коров, отрицательных в РИД, доля лимфоцитов периферической крови с полным отсутствием какой-либо иммуноцитохимической реакции составляла не менее 88 %, но ни в одном из исследованных случаев не достигала 100 %. При этом в каждом из исследованных случаев верифицировались лимфоциты, которые были позитивны по ЯАПК. Так, например, у животного под № 6 доля клеток, которые могли быть отнесены к IV классу, составила 0.7 %. Следует, однако, отметить, что доля клеток, позитивных по ЯАПК, у коров, отрицательных в РИД, как правило, относится к классу I при средней частоте таких позитивных лимфоцитов 4.4 ± 0.7 %. Распределение лимфоцитов, положительных по иммуноцитохимической реакции на ядерный антиген

пролиферирующих клеток (ЯАПК в %), в периферической крови коров, отрицательных в РИД, и периферической крови коров-носителей ВЛКРС распределялись на отрицательные и положительные на ядерный антиген пролиферирующих клеток (а — класс 0, б — класс I, в — класс II, г — класс III, д — класс IV). При рассмотрении данных распределения лимфоцитов по классам ЯАПК в периферической крови коров, пораженных ВЛКРС, обращают на себя внимание снижение доли лимфоцитов, которые относятся к классу 0 (средняя — 34.2 ± 5.7 %, различие достоверно относительно класса 0 коров, отрицательных в РИД, при $P < 0.001$), и повышение доли клеток с умеренной иммуноцитохимической реакцией (б, класс I, различие достоверно относительно I класса коров, отрицательных в РИД, при $P < 0.001$). Как следует из отдельных коров, лимфоциты II класса составляли не менее четверти исследованной популяции, что в среднем по всей выборке животных, пораженных ВЛКРС, составило 21.5 ± 2.8 %, что намного и достоверно превышает показатель по II классу от коров, отрицательных в РИД ($P < 0.001$). Интересно отметить, что частота лимфоцитов III и IV классов в значительной степени варьировала у коров, пораженных ВЛКРС. При этом выявлялись как коровы, у которых в периферической крови не наблюдались лимфоциты классов III и IV (животное № 12, г, д), так и коровы, у которых частота лимфоцитов III и IV классов превышала 15 % (животные № 1, 4, 6, 8). Интересно отметить, что наблюдалась достоверная положительная корреляция ($P < 0.0005$, корреляция рангов по Спирмену) между частотой интерфазных ядрышкообразующих районов и количеством лейкоцитов в 1 мм^3 крови у коров, положительных в РИД, что может указывать на неслучайный характер в повышении частоты ИЯОР в клеточных популяциях животных, положительных в РИД.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМЫ 6 В ЯДРАХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ *CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA* MG. © А. А. Коханенко, Т. В. Анянина, В. Н. Стегний. Томский государственный университет, alinakokhanenko@gmail.com.

Пространственной организации хроматина в ядре отводится важная роль в процессах реализации генетической информации. Организация хромосом в ядре строго детерминирована, однако механизм, управляющий этой детерминацией, пока неясен.

В ядрах слюнных желез личинок *C. erythrocephala* наряду со многими другими тканями организма происходит политенизация хроматина. Хроматин слюнных желез на всех этапах политенизации организован в отдельные политенные хромосомы.

С помощью метода 3D флуоресцентной гибридизации *in situ* (3D FISH) была изучена пространственная организация хромосомы 6 в ядрах слюнных желез *C. erythrocephala* на различных этапах политенизации. Увеличение уровня политениции хроматина слюнных желез *C. erythrocephala* проявляется в увеличении объема ядер, поэтому в качестве критерия оценки уровня политенизации использовался размер ядер.

Было проанализировано 336 ядер слюнных желез *C. erythrocephala*, взятых произвольно из случайных районов слюнных желез разных особей. У всех ядер выборочной совокупности был измерен диаметр, который являлся критерием группировки данных. Кроме того, каж-

дое ядро выборочной совокупности оценивалось по характеру распределения материала хромосомы 6 в пространстве ядра.

В результате анализа распределения материала хромосомы 6 в объеме ядра нами были выделены две группы ядер.

1. *Компактное расположение материала хромосомы 6 в центральной части ядер слюнных желез.* К данной группе были отнесены ядра, в которых материал хромосомы 6 организован в один или несколько крупных блоков, расположенных рядом друг с другом в центральной части ядра. В пространстве ядер встречаются мелкие сигналы ДНК-зонда хромосомы 6 на некотором удалении от основной массы материала хромосомы.

2. *Материал хромосомы 6 рассредоточен в объеме ядер слюнных желез.* К данной группе были отнесены ядра, в которых материал хромосомы 6 рассредоточен в пространстве ядер. Материал хромосомы 6 организован в крупные или мелкие блоки, распределенные в объеме ядра и находящиеся на значительном расстоянии друг от друга. Кроме того, в пространстве ядра, а иногда и на периферии наблюдаются мелкие сигналы ДНК-зонда хромосомы.

В результате исследования было показано, что в ядрах слюнных желез *C. erythrocephala* происходит изменение пространственной организации хромосомы 6 в ходе политенизации. Для ядер слюнных желез на начальных этапах политенизации наиболее характерен вариант компактного расположения материала хромосомы 6 в центральной части ядра. С увеличением степени политениции хроматина частота встречаемости варианта компактного расположения материала хромосомы 6 в пространстве ядра снижается. Частота встречаемости варианта распределения материала хромосомы 6 по всему объему ядер в ходе политенизации возрастает и на завершающих этапах политенизации хроматина слюнных желез значительно превосходит частоту встречаемости варианта компактного расположения материала хромосомы 6.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что динамика хромосомы 6 в пространстве ядра имеет важное значение в функционировании генетического аппарата слюнных желез *C. erythrocephala*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01059 и МК-4158.2012.4).

ВОВЛЕЧЕНИЕ МАР-КИНАЗНЫХ КАСКАДОВ В АКТИВАЦИЮ СТАРЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО ИНГИБИТОРОМ ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ (HDAC1) БУТИРАТОМ НАТРИЯ. © Е. Ю. Кочеткова, С. Г. Зубова, Т. В. Быкова, Т. В. Поспелова. Институт цитологии РАН, lena.linnaea@gmail.com.

В работе изучали роль МАР-киназных каскадов в процессе старения опухолевых клеток грызунов, которое индуцировали ингибитором HDAC1 бутиратом натрия. Для анализа были использованы две линии трансформантов E1A+cHa-gas: полученных из эмбриональных фибробластов от мышшей с нокаутом по генам киназ *jnk 1* и *2* (mERasJnk-/-) и с нокаутом по гену *mapk14*, кодирующему киназу p38 (mERasp38-/-).

В работе анализировали основные маркеры старения: блок клеточного цикла (по результатам проточной цито-

метрии — блок в точке G_1/S), подавление пролиферации (по кривым роста), увеличение размера клетки, накопление белка на клетку, распластывание по субстрату, повышение экспрессии маркера старения — β -галактозидазы (увеличение β -галактозидазной активности) и накопление фосфорилированной формы рибосомального белка S6.

Согласно полученным данным, бутират натрия существенно подавляет пролиферацию клеток линии mERasp38^{-/-}. У mERasp38^{-/-} уже на 3-и сут инкубации наблюдается заметное уменьшение числа клеток по сравнению с исходным количеством аналогично линии трансформантов дикого типа (mERas). Однако для клеток линии mERasJnk^{-/-} наблюдается лишь небольшое подавление пролиферации по снижению числа клеток только на 5 сут инкубации.

Согласно данным цитофлуориметрического анализа, при инкубации клеток с бутиратом натрия через 5 сут доля клеток mERas и mERasp38^{-/-}, находящихся в S-фазе, снижается по сравнению с контролем, в то время как у клеток линии mERasJnk^{-/-} бутират натрия не вызывает такого сильного снижения числа клеток в S-фазе. Таким образом, бутират натрия, вызывая блок клеточного цикла на стадии перехода из фазы G_1 в фазу S, существенно снижает пролиферативную активность клеток mERas и mERasp38^{-/-}. Клетки линии mERasJnk^{-/-}, несмотря на действие бутирата натрия, сохраняют способность к пролиферации.

После 5-суточной инкубации с бутиратом натрия у клеток линий mERas и mERasp38^{-/-} выявлены характерные морфологические изменения, характерные для стареющих клеток: увеличение размера и распластывания по поверхности, повышенная β -галактозидазная активность. У клеток линии mERasJnk^{-/-} после воздействия бутирата натрия морфологические маркеры старения и повышение β -галактозидазной активности не выявлены.

Так как гипертрофный и гиперсекреторный фенотипы относятся к числу основных маркеров старения, был проведен анализ активности комплекса mTORC1 в нокаутах по разным MAP-киназам. Выявлена прямая корреляция гипертрофного фенотипа как маркера старения с активацией комплекса mTORC1 у трансформантов mERasp38^{-/-}, которое отсутствует у нокаутов mERasJnk^{-/-}. Активация выявляется по накоплению одного из его субстратов mTORC1 — фосфорилированной формы рибосомального белка S6 — методами иммунофлуоресценции и иммуноблоттинга.

Таким образом, активация mTORC1 ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия идет в отсутствие функционально активной киназы p38, в то время киназа Jnk необходима для его активации и для реализации гипертрофного фенотипа старения.

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛИПОТЕНТНЫХ (СТВОЛОВЫХ) КЛЕТОК В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ УЛИТКИ ЯНТАРКИ. © М. К. Крылова,¹ Н. Е. Зюмченко.¹ ¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, nez@bio.dvgu.ru.

Соматическая полиплоидия — это явление кратного умножения генома в соматических клетках. Несмотря на многочисленные работы, остаются открытыми вопросы значения и механизмов данного процесса. Для решения

вопросов, связанных с нарушениями клеточного цикла, в частности такими как полиплоидия (механизмы полиплоидизации, наличие камбиальных резервов в клеточных популяциях с полиплоидным гистогенезом и др.), в настоящее время активно изучаются стволовые клетки, а также механизмы пролиферации и дифференцировки клеток. Существует целый ряд маркеров, поверхностных и генных, свойственных различным полипотентным (стволовым) клеткам: Nanog, Oct-4, GCTM-2, TRA 1-60, SSEA-3, SSEA-4 и др. В качестве маркера стволовых клеток в некоторых работах российских и зарубежных авторов используется также окраска на щелочную фосфатазу. Брюхоногие моллюски являются удобным объектом, так как они широко распространены в природе, и у некоторых их представителей, в частности у улитки-янтарки, уже давно показаны полиплоидные клетки в различных тканях. Поэтому целью данной работы было выявление возможных полипотентных (стволовых) клеток с помощью окраски на щелочную фосфатазу в различных тканях улитки-янтарки.

Материалом для данной работы послужили пищеварительная и предстательная железы, а также гонада улитки-янтарки. В ходе выполнения работы была сделана коллекция фотографий срезов (толщиной 1 мкм), полученных с помощью замораживающего ультрамикротомы, окрашенных на щелочную фосфатазу. Кроме того, параллельно был проведен электронно-микроскопический анализ изучаемых тканей на предмет наличия малодифференцированных клеток и их локализации.

Возможные полипотентные (стволовые) клетки, позитивно окрашивающиеся на щелочную фосфатазу, выявлены только в пищеварительной железе моллюска. При этом положительная реакция была отмечена в гранулах (гранулы имеют кирпично-красный оттенок) клеток, расположенных между пищеварительными и базофильными клетками. Выявляемые клетки имеют цилиндрическую форму и содержат мелкое, по всей видимости диплоидное, ядро. Наличие малодифференцированных клеток в данной ткани было подтверждено и с помощью электронного микроскопа.

В предстательной железе улитки-янтарки в ярко-кирпичный цвет окрашивается цитоплазма белковых клеток вокруг секреторных вакуолей. Однако данный факт, скорее всего, является отражением физиологических особенностей данной ткани и не показывает наличия стволовых элементов. Несмотря на то что многие исследователи в своих работах, посвященных изучению активности щелочной фосфатазы в различных тканях беспозвоночных, указывают на высокий уровень содержания фермента в половых железах, мы не смогли это подтвердить. Щелочная фосфатаза не была выявлена, ни в оогенной, ни в сперматогенной частях ацинусов.

В базофильных клетках пищеварительной железы, в белковых клетках предстательной железы и в питающих клетках гонады улитки-янтарки отмечаются полиплоидные клетки с уровнями плоидности в базофильных клетках до 32с, в белковых клетках — до 16с, в питающих клетках — до 64с.

Работа выполнена в рамках гранта Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, договор № 11.G34.31.0010.

ДИНАМИКА МЕЙОЗА В НАТИВНЫХ И ДЕВИТРИФИЦИРОВАННЫХ ООЦИТАХ КОРОВ *IN VITRO*. © Т. И. Кузьмина, Н. О. Новикова, Д. А. Новичкова. ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург—Пушкин, prof.kouzmina@mail.ru.

Не вызывает сомнения актуальность проблемы разработки эффективных методов криоконсервации женских гамет млекопитающих для их использования в биомедицине и животноводстве, сохранения генофонда и генетического разнообразия. Цель настоящего исследования — сравнительная характеристика параметров ядерного созревания нативных и девитрифицированных ооцитов коров *in vitro*. В экспериментах использовали яйцники коров черно-пестрой породы на стадии фолликулярного роста, без видимой патологии. Ооцит-кумулясные комплексы (ОКК) выделяли из антральных фолликулов диаметром 3—6 мм. Для витрификации ОКК обрабатывали растворами криопротекторов (CРА) на среде ТС-199 с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Sigma). CРА-1: 0.7 М диметилсульфоксид (ДМСО) + 0.9 М этиленгликоль (ЭГ); CРА-2: 1.4 М ДМСО+1.8 М ЭГ; CРА-3: 2.8 М ДМСО + 3.6 М ЭГ + 0.65 М трегалоза. ОКК помещали в CРА-1, затем в CРА-2 на 30 с и в CРА-3 на 20 с. Соломины с ОКК помещали в жидкий азот, через 3 ч извлекали из соломин, помещали в 3 мл 0.25 М трегалозы в ТС-199 с 10 % ФБС при 37 °С, отмывали в 0.19 М и затем в 0.125 М трегалозе, окончательно — в ТС-199. Для культивирования ОКК использовали ТС-199 с 10 % ФБС и 10⁶ кл. на 1 мл гранулезы, дополненную 50 нг/мл бычьего пролактина, в соответствии с разработанной нами ранее моделью созревания (Heleil, Kuzmina et al., 2010). Контроль за состоянием хроматина в ОКК осуществляли по методу Тарковского (Tarkowski, 1966). Всего прокультивировано 678 ОКК. Через 6 ч культивирования основная часть ооцитов контрольной (нативные) и опытной (девитрифицированные) групп находилась на стадии диплотены (73 и 68 % соответственно). После 12 ч лишь 53 % девитрифицированных ооцитов продвинулись в своем развитии, в то время как 98 % нативных реиницировали мейоз. Через 18 ч экспозиции на завершающих этапах мейотического созревания находилось 72 % нативных ооцитов и 35 % девитрифицированных. 81 % нативных ооцитов завершили свое созревание через 24 ч культивирования, доля созревания девитрифицированных к этому времени составил 41 %. Данные, полученные в следующей серии экспериментов по оценке статуса хроматина нативных и девитрифицированных ооцитов коров в динамике культивирования, позволил нам сделать следующее заключение: в процессе культивирования девитрифицированных ооцитов резко возрастает уровень ооцитов с дегенерацией хроматина. Уже через 6 ч культивирования число девитрифицированных ооцитов с признаками дегенерации хроматина более чем в 2 раза превышает уровень нативных ооцитов с деструктивными изменениями ядерного материала (29 против 12 %, $P < 0.05$). К моменту созревания яйцеклеток (24 ч), 52 % девитрифицированных ооцитов имели дегенерированный хроматин (против 16 % в контроле, $P < 0.05$). Момент резкого возрастания количества дегенерированных клеток выпадает на время прохождения ооцитами стадий метафазы-I—анафазы, что свидетельствует о нарушении процесса формирования анафазного веретена в девитрифицированных ооцитах. Таким образом, в наших иссле-

дованиях показана возможность созревания девитрифицированных ооцитов коров после 24 ч культивирования в среде ТС-199 с 10 % ФБС и 50 нг/мл пролактина (выход созревших ооцитов составил 41 %). Проанализирована динамика мейоза *in vitro* нативных и девитрифицированных ооцитов коров. Выявлены критические периоды преобразования хроматина в девитрифицированных ооцитах при культивировании *in vitro* (метафаза-I—анафаза).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект офи-а 10-04-00389).

РЕОРГАНИЗАЦИЯ МИКРОТРУБОЧЕК МОДУЛИРУЕТ ЭФФЕКТ МОЛИКСАНА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ Ca²⁺ В МАКРОФАГАХ. © Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, В. Г. Антонов. Кафедра биофизики биолого-почвенного факультета С.-Петербургского государственного университета, cozzy@mail.ru.

Препарат моликсан (комплекс динатриевой соли окисленного глутатиона с Pt в наноконцентрации и нуклеозида инозина) относится к классу препаратов тиопоэтинов, изменяющих редокс-статус клетки. Моликсан применяется как иммуномодулятор и гемостимулятор в комплексной терапии бактериальных и вирусных инфекций, псориаза и в химиотерапии опухолей. Однако механизмы клеточного и молекулярного действия моликсана далеки от полного понимания.

Ранее нами было установлено, что моликсан вызывает двухфазное увеличение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i), связанное с мобилизацией Ca²⁺ из внутриклеточных тапсигаргин-чувствительных Ca²⁺-депо и последующим депозависимым входом Ca²⁺ из наружной среды. Выявлено также участие элементов актинового цитоскелета в действии моликсана на [Ca²⁺]_i в макрофагах. Белок микротрубочек тубулин также имеет высокую редокс-чувствительность и легко подвергается S-глутатионилированию. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать возможное участие микротрубочек в действии моликсана на [Ca²⁺]_i в макрофагах.

Объектом исследования служили культивируемые резидентные перитонеальные макрофаги крысы. Для измерения [Ca²⁺]_i использовали флуоресцентный Ca²⁺-зонд Fura-2AM. Для выявления возможного участия микротрубочек в действии моликсана на [Ca²⁺]_i были использованы агенты, вызывающие реорганизацию тубулинового цитоскелета: нокодазол и колцемид, вызывающие деполимеризацию микротрубочек, и таксол (паклитаксель), вызывающий стабилизацию микротрубочек.

Впервые показано, что предварительная инкубация макрофагов с колцемидом (50 мкМ) или нокодазолом (20 мкМ) в течение 20 мин до введения 100 мкг/мл моликсана вызывает полное подавление обеих фаз Ca²⁺-ответа, вызываемого моликсаном, что свидетельствует о том, что деполимеризация тубулинового цитоскелета предотвращает регуляторное влияние моликсана на процессы Ca²⁺-сигнализации в макрофагах. Кроме того, показано, что предварительная инкубация макрофагов с таксолем (100 мкМ) в течение 30 мин до введения 100 мкг/мл моликсана также приводит к полному подавлению Ca²⁺-ответов, вызываемых моликсаном. Результаты свидетельствуют о том, что стабилизация микротрубо-

чек, так же как и их разборка, может предотвращать действие моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах. Обнаружено также, что добавление таксола (100 мкМ) на фоне развившегося депозависимого входа Ca^{2+} , индуцированного моликсаном, вызывает полное подавление входа Ca^{2+} и возвращение $[Ca^{2+}]_i$ к базальному уровню. Это подтверждает наши ранние данные о подавлении таксолом депозависимого входа Ca^{2+} , индуцированного пуриnergическим агонистом АТФ или ингибитором эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином, и свидетельствует об участии микротрубочек не только в генерации, но и в поддержании депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Таким образом, показано, что любые изменения в структуре тубулинового цитоскелета (деполимеризация или стабилизация) модулируют эффект моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах. Кроме того, полученные данные позволяют предположить нежелательность совместного применения моликсана с нокодазолом, колцемидом или таксолом, которые используются в терапии онкологических заболеваний как цитостатики.

ЛОКАЛЬНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКИ В СВЯЗИ С РЕПЛИКАЦИЕЙ ДНК. © С. Ю. Курчаева,¹ А. Меркулова,² О. А. Жиронкина, О. С. Стрелкова,³ И. И. Киреев,¹ П. Гозак,⁴ В. Ю. Поляков.¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, svetak99@mail.ru, ²Кафедра химии природных соединений химического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ³ Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии Российского университета дружбы народов, Москва, и ⁴ Институт молекулярной биологии, Прага, Чехия.

Упорядоченное расположение интерфазных хромосом в ядре и перемещения их отдельных участков в связи с событиями клеточного цикла могут определяться взаимоотношениями хроматина с ядерной оболочкой (ЯО). По-видимому, ядерная ламина помимо обеспечения механической прочности ЯО принимает непосредственное участие в этом процессе. Показано, что гипотоническая обработка культивируемых клеток СПЭВ индуцирует образование в некоторых клетках (около 3 %) выпячиваний ЯО — ядерных почек. При импульсном мечении клеток аналогами тимидина (бромдезоксигуанидин, этилбромдезоксигуанидин) до гипотонической обработки обнаружено, что ядерные почки образуются преимущественно в поздней S-фазе клеточного цикла. Параллельно наблюдается накопление в ядерной почке меченого хроматина при отложенном мечении, что свидетельствует о направленной миграции в ядерную почку реплицированного хроматина. При электронно-микроскопическом исследовании обнаружено, что в ядерной почке контакты между хроматином ЯО немногочисленны, возможно из-за локальной разборки ламины: ламин В в ядерных почках иммуноцитохимически не выявляется, а количество ламин А/С значительно снижено по сравнению с другими областями ядерной оболочки. Предполагается, что образование ядерных почек после гипотонического шока объясняется существованием локальных зон разборки ламины, связанных с пререпликативной реорганизацией взаимодействия хроматина с ЯО. Характерно, что экспрессия в клетках GFP-прогерина — мутантной формы ламина А,

демонстрирующей низкую скорость обмена в ядерной оболочке, полностью подавляла образование «ядерных почек». Перераспределение реплицированного хроматина в ядерную почку может свидетельствовать в пользу его активного транспорта в эту зону. Предварительная инкубация клеток с ингибитором миозина II и миозиновой АТФазы 2,3-бутандион-моноксимом (БДМ) до гипотонического воздействия подавляла перераспределение меченого хроматина в почку. Инкубация клеток с ингибитором элонгации репликации афидиколином также подавляла перераспределение хроматина в почку, что позволяет предположить существование корреляции между перемещениями локусов хроматина, репликацией и структурой ядерной оболочки.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЯМОГО ИНГИБИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ПРОЛАКТИНА НА РЕИНИЦИАЦИЮ МЕЙОЗА В ООЦИТАХ КОРОВ. © И. Ю. Лебедева, Г. Н. Сингина, Т. Е. Тарадайник, А. В. Лопухов. Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства РАСХН, Подольск—Дубровицы.

Гипофизарный пролактин (ПРЛ) является одним из компонентов эндокринной системы, регулирующей созревание яйцеклеток в яичниках млекопитающих (Vole-Feysot et al., 1998). У некоторых видов животных выявлено присутствие рецепторов ПРЛ или их мРНК в различных клетках овариальных фолликулов, включая ооциты (Kotok et al., 2000; Picazo et al., 2004; Kiarekou et al., 2005), что свидетельствует о наличии как прямого, так и опосредованного соматическими клетками путей реализации гормонального действия. Вместе с тем функционирование прямого пути действия ПРЛ на половые клетки практически не исследовано. Ранее нами было показано тормозящее влияние этого гормона на реинициацию мейоза при культивировании лишенных кумулюса ооцитов коров, а также присутствие в них мРНК соответствующего рецептора (Лебедева и др., 2009; Lebedeva et al., 2009). В настоящей работе были охарактеризованы специфичность и механизмы прямого влияния ПРЛ на преобразования хромосом в ооцитах. Ооцит-кумуляные комплексы выделяли из фолликулов диаметром 2—8 мм. Денудированные ооциты (ДО) получали после диссоциации клеток кумулюса путем обработки соответствующих комплексов коллагеназой II (2 мг/мл). Морфологически нормальные ДО культивировали в течение 7 ч в среде ТС-199, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (контроль). В среду опытных групп вносили бычий ПРЛ (20 МЕ/мл; Эндокринологический научный центр РАМН, Москва) в концентрации 5, 20, 50, 150 или 500 нг/мл. Для анализа динамики мейотических преобразований хромосом культивирование ДО проводили в течение 7, 14 и 24 ч. При изучении внутриклеточных каскадов, активируемых пролактином в ооцитах, инкубацию последних проводили в отсутствие и в присутствии 10 мкг/мл ингибитора тирозинкиназы генестейна (ICN, США) или 100 нМ ингибитора протеинкиназы С калпостина С (Calbiochem, Германия). Ооциты фиксировали по методу Тарковского и использовали для цитогенетического анализа состояния ядерного материала. Эксперименты по культивированию ДО были выполнены в 4—5 независимых повторностях. Дисперсионный анализ данных выявил высокую степень зависимости частоты реинициации мейоза в ооцитах от концентрации ПРЛ в культуральной среде ($P < 0.01$). Так,

доля клеток, остающихся на стадии диплотены через 7 ч инкубации, значительно возрастала при внесении в среду 20 нг/мл ПРЛ (с 30.5 ± 5.6 до 51.6 ± 4.0 %, $P < 0.05$) и достигала максимума при повышении гормональной концентрации до 50 нг/мл (57.8 ± 5.4 %, $P < 0.01$). В то же время относительное число ооцитов, не возобновивших мейоз в присутствии 5 и 500 нг/мл ПРЛ, не отличалось от такового в контрольной среде. При использовании максимально эффективной концентрации ПРЛ (50 нг/мл) было обнаружено, что его ингибирующее влияние на мейотические преобразования хромосом является кратковременным и наблюдается только при инкубации ДО в течение 7 ч. Увеличение времени культивирования ооцитов до 14 и 24 ч приводило к постепенному исчезновению тормозящего влияния гормона на мейоз. Ингибитор тирозинкиназ генистейн блокировал супрессивное действие ПРЛ, снижая долю ооцитов, остающихся на стадии диплотены через 7 ч инкубации ДО в присутствии 50 нг/мл ПРЛ (с 41.1 ± 2.8 до 27.5 ± 4.1 %, $P < 0.01$), тогда как ингибитор протеинкиназы С каллостин не влиял на это действие гормона. Представленные данные показывают, что ингибирующее влияние ПРЛ на реинициацию мейоза в изолированных ооцитах коров является специфическим и реализуется посредством активации тирозинкиназ. Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о функционировании прямого пути проведения сигнала ПРЛ в ооцитах.

В УЧАСТКАХ СОМАТИЧЕСКОГО ЯДРА ИНФУЗОРИИ *BURSARIA TRUNCATELLA* С РАННЕ- И ПОЗДНЕ-РЕПЛИЦИРУЮЩИМИСЯ ГЕНАМИ ХРОМАТИН ИМЕЕТ РАЗНУЮ СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ. © О. Г. Леонова,¹ Б. П. Караджян,² Ю. Л. Иванова,¹ В. И. Попенко.¹ ¹ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, varjag@aport2000.ru, и ²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Процессы репликации и транскрипции ДНК в ядрах высших эукариот происходят в строго специфичных сайтах, которые были визуализированы на стадии S-фазы в виде так называемых репликационных фокусов. Распределение их в пространстве ядра на разных стадиях S-фазы у всех изучавшихся клеток Metazoa оказалось сходным, поэтому можно полагать, что репликационные фокусы представляют собой фундаментальную характеристику организации ядра многоклеточных, отражающую общие принципы организации высших уровней хроматина в эволюционно удаленных видах. Однако вопрос о том, как распределяются сайты репликации в пространстве ядер одноклеточных эукариот и как они соотносятся со структурной организацией хроматина в последних, остается открытым.

Инфузории являются удобной модельной системой для выяснения этих вопросов. Все исследованные к настоящему времени инфузории можно разделить на 2 большие группы: виды, где геном соматических ядер (макронуклеусов) представлен молекулами ДНК геномного размера (5—20 т. п. н.) и ДНК размером в несколько сотен т. п. н. (ДНК субхромосомного размера). В данной работе исследования проводили на инфузориях *Bursaria truncatella*, которая относится к субхромосомному типу (размер молекул ДНК макронуклеуса 50—400 т. п. н.).

Для определения распределения сайтов репликации в макронуклеусе *B. truncatella* делящиеся клетки отсаживали в чашки Петри, в которые добавляли BrdU через разные сроки после деления. Сайты репликации визуализировали в конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 с помощью флуоресцентно меченных антител. Обнаружено, что на ранних стадиях S-фазы репликация происходит в периферических районах макронуклеуса, а на поздних — в центральной его части.

С помощью 3D электронной микроскопии на серийных ультратонких срезах проведено сравнительное изучение структуры хроматина в этих районах. Показано, что хроматин макронуклеуса в сытых инфузориях *B. truncatella* имеет вид телец размером 0.06—0.2 мкм, более или менее равномерно распределенных по объему макронуклеуса. Однако при снижении активности (например, при голодании) хроматиновые тельца, расположенные в центральной части макронуклеуса, увеличиваются в размере, сближаются и агрегируют, образуя зоны конденсированного хроматина из толстых тяжей толщиной 0.1—0.2 мкм, в то время как тельца на периферии макронуклеуса остаются одиночными. Эти результаты хорошо коррелируют с данными о том, что в ядрах многоклеточных раннереплицирующиеся гены также располагаются в деконденсированном эухроматине. Однако пространственное расположение хроматина с раннереплицирующимися генами в ядрах различается: у Metazoa он находится в центральном компартменте ядра, а в макронуклеусе *B. truncatella* — на периферии.

Обнаруженные различия могут свидетельствовать о разной пространственной организации ядер высших эукариот и соматических ядер инфузорий, обусловленной различной молекулярной организацией их геномов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01967а).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ НА СТРОМАЛЬНОМ ПОДСЛОЕ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОРОДА. © Е. В. Маслова,¹ Е. Р. Андреева,¹ Ю. А. Романов,² Л. Б. Буравкова.¹ ¹ФГБУН Институт медико-биологических проблем РАН, emaslova@mail.ru, и ² Институт экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса, Москва.

В настоящее время все более интенсивно изучается возможность использования альтернативных источников гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для применения в клеточной терапии. Было показано, что экспансия ГСК из пуповинной крови может происходить так же эффективно при адекватных условиях культивирования, как и ГСК из костного мозга. Культивирование мононуклеаров пуповинной крови на стромальном подслое способствует поддержанию жизнеспособности и пролиферации прогениторных клеток, а также может служить моделью *in vitro* для исследования взаимодействий между ГСК и мезенхимными клетками ниши. Известно, что гемопоэтические стволовые клетки в основном занимают синусоидальную нишу с низким содержанием кислорода. Можно предположить, что снижение уровня кислорода при культивировании может способствовать экспансии гемопо-

этических клеток *in vitro*. В данной работе исследовали влияние различного содержания кислорода (5 и 20 % O₂) в среде культивирования на экспансию прогениторных клеток пуповинной крови на подслое мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани человека. Для сравнения культивировали клетки пуповинной крови без стромального подслоя. Мононуклеарная фракция пуповинной крови была предоставлена ООО «Криоцентр». Морфологический анализ и оценку жизнеспособности проводили в исходной суспензии мононуклеаров пуповинной крови и во фракции, адгезирующей к субстрату, на 1, 3 и 6 сут культивирования. Наличие в пуповинной крови коммитированных гемопоэтических предшественников оценивали с помощью стандартной методики культивирования в полужидкой среде MethoCult H4534, используемой для выявления способности гемопоэтических предшественников образовывать колонии. Анализ клеток проводили в светлом поле на микроскопе Nikon Eclipse Ti U (Япония). Было показано, что мононуклеарная фракция пуповинной крови содержит клетки-предшественники различной степени зрелости: эритроидного (базофильные, полихроматофильные и оксифильные эритробласты), миелоидного (промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты и палочкоядерные гранулоциты) и моноцитарного ростков. Эти клетки были способны образовывать гемопоэтические колонии в полужидкой среде. При 20 % кислорода было обнаружено больше колоний гранулоцитарного и моноцитарного происхождения, а при 5 % кислорода — колоний эритроидного ростка. Некоторые из гемопоэтических клеток-предшественников можно было идентифицировать на стромальном подслое после совместного культивирования. При этом клетки, адгезирующие к стромальному подслою, в дальнейшем не образовывали гемопоэтических колоний. Это позволяет предположить, что это были или ранние, или поздние, более коммитированные, предшественники. Культивирование мононуклеаров пуповинной крови в среде без дополнительных факторов и в отсутствие стромального подслоя не обеспечивало поддержания гемопоэтических клеток. Таким образом, наличие стромального подслоя и концентрация кислорода являются важными факторами, влияющими на обеспечение эффективной направленной экспансии гемопоэтических клеток *ex vivo*, что может иметь важное значение для нужд регенеративной медицины.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01158-а).

СПОНТАННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ «МЕЗЕНСФЕР» В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МАТРИКСА ПУПОЧНОГО КАНАТИКА. © О. А. Маслова,^{1,2} С. П. Шпилевая,³ Н. С. Шувалова,^{2,3} Е. Г. Дерябина,² В. А. Кордюм.³ ¹Институт биологии Киевского национального университета им. Тараса Шевченко, rotiferko@gmail.com, ²ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины Национальной академии медицинских наук Украины» и ³Институт молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук Украины, Киев.

В последнее время в литературе активно обсуждается поиск путей культивирования мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК) в трехмерных системах.

Это позволит сохранить мультипотентность клеток при длительном культивировании и приблизить их состояние к тому, которое свойственно МСК в их нишах. Существует ряд работ, демонстрирующих возможность получить в культурах МСК из различных источников сферические образования, которые сохраняют стволовые свойства. Был введен термин «мезенсфера» — сфероидное образование, состоящее из МСК. Однако с целью создания таких «мезенсфер» предлагается применять специальные методические подходы: использовать неадгезивные покрытия для культуральной посуды, бессывороточные среды, добавки к средам, особую технику посева и другие подходы. В нашем же исследовании встречались культуры МСК матрикса пуповины человека, в которых без дополнительного воздействия, в стандартных условиях, формировались клеточные конгломераты сферической формы разных размеров (от 0.3 до 2 мм в диаметре). Пуповины предоставлялись роддомом № 5 (Киев). Клетки изолировали, используя комбинированную методику (используя ферментативно-механическую обработку). МСК культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и ростовыми факторами. Хондрогенную индукцию проводили по классической методике. Были проанализированы общее строение конгломератов и их клеточный состав. С помощью окраски цитологическими красителями криотомных срезов и целых сфероидов была показана морфология «мезенсфер». Окраска флуоресцентными красителями с последующей конфокальной микроскопией показала объемное строение «мезенсфер». Показано, что данные образования не теряют признаков МСК: экспрессируют характерные маркеры (CD105, CD73 и CD90), способны к образованию клонов и индуцированной хондрогенной дифференцировке. При переносе «мезенсфер» в новый культуральный сосуд со средой они способны прикрепиться и дать начало новому поколению культуры, таким образом поддерживая ее на уровне того пассажа, в котором конгломераты образовались. Гистологический анализ срезов показал наличие клеток типичной для мезенхимы морфологии. С помощью конфокальной микроскопии было показано, что клетки в сфероидах являются живыми, распределены равномерно. Отсутствие окраски альциановый синим и Суданом черным показало, что сфероид не является этапом дифференцировки в адипоциты или хондроциты. Однако альциановый синий интенсивно окрашивал «мезенсферы», которые в течение 3 нед культивировали в хондрогенной среде, что показывает сохранение их способности к индуцированной дифференцировке.

Авторы предполагают, что способность формировать «мезенсферы» является характеристикой степени «стволовости» МСК и может зависеть от индивидуальных характеристик пуповин как источника МСК. Поиск причин образования «мезенсфер» и изучение различий в характеристиках культур, способных и не способных к их образованию, являются следующими этапами исследования.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА, СИНТЕЗИРУЕМОГО ФИБРОБЛАСТАМИ ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА. © О. А. Миленина,¹ А. Г. Носик,¹ М. С. Булькран,¹ И. И. Ермакова,² Н. М. Юдинцев,² И. В. Воронкина.² ¹С.-Петербургский государственный технологический институт (Технический универси-

тет) и ²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, voron@mail.cytspb.rssi.ru.

Для создания клеточных или тканевых заместителей, пригодных для использования в медицине, необходимо знать, чем именно отличается биохимический состав замещаемой ткани. Мажорными компонентами ВКМ являются белки, гликозаминогликаны и протеогликианы, а основными продуцентами ВКМ дермы служат фибробласты. Дермальные фибробласты играют важную роль в восстановлении кожи после повреждения, активно синтезируют компоненты ВКМ и ростовые факторы. Выявление различий в составе ВКМ, синтезируемого фибробластами, может помочь в создании клеточных продуктов, максимально приближенных по составу к той ткани, которую они должны замещать.

Целью данной работы было изучение различий в составе и структуре ВКМ, синтезируемого фибробластами, а также различий в активности матриксных металлопротеаз, принимающих участие в процессах синтеза белков ВКМ. Были использованы фибробласты дермы человека, выделенные из нормальной и рубцовой тканей взрослого человека, а также эмбриональные фибробласты.

Для получения ВКМ клетки культивировали на пластике и на перфторане. Биохимический анализ получаемого ВКМ проводили с помощью электрофореза и зимографии. Содержание мажорных белков ВКМ определяли Вестерн-блотом с помощью поликлональных антител к ламинину, фибронектину и коллагену I типа. Для иммуноцитохимического анализа клетки культивировали на стекле или на перфторане, после чего клеточный слой окрашивали на три мажорных белка (коллаген I типа, ламинин и фибронектин), два гликозаминогликана (гиалуроновая кислота и хондроитинсульфат) и два протеогликана (декорин и версикан). Результаты окрашивания визуализировали с помощью конфокальной микроскопии.

При количественном сравнении компонентов внеклеточного матрикса, синтезируемого фибробластами разных типов, можно отметить следующие особенности. Результаты иммуноцитохимии свидетельствуют о том, что эмбриональные и рубцовые фибробласты более синтетически активны, чем нормальные фибробласты. По результатам электрофореза, ВКМ рубцовой ткани содержит меньше разнообразие белковых компонентов по сравнению с ВКМ нормальных и эмбриональных фибробластов.

Полученные результаты подтверждаются также литературными данными о специализированных функциях фибробластов в месте повреждения и их участии в восстановлении целостности кожных покровов путем синтеза значительного количества фибриллярных белков, главным образом коллагенов, и создании весьма специфической рубцовой ткани. В процессе образования рубца происходят переключение программы фибробластов на синтез только основных секретируемых белков и уменьшение их разнообразия, что подтверждают наши данные.

Проведен сравнительный иммуноцитохимический и электрофоретический анализ мажорных белков ВКМ, синтезируемого фибробластами нормальной, эмбриональной и рубцовой кожи человека при культивировании клеток на пластике и на перфторане и изучен уровень активности матриксных металлопротеаз (ММП) при таком культивировании. Было показано, что во всех случаях состав синтезируемого ВКМ не изменялся качественно. Количественные изменения состава ВКМ были достоверны и зависели от происхождения фибробластов, а также от

субстрата, выбранного для культивирования. Предполагается, что изменение плотности субстрата при культивировании может привести к необходимому изменению соотношения белков ВКМ, синтезируемого фибробластами, для оптимизации клеточного продукта.

БЕЛОК ЯДРЫШКА ФИБРИЛЛАРИН КАК РАННИЙ СЕНСОР ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА HeLa. © А. А. Миронова,^{1,2} А. Л. Братцева,^{1,2} Н. В. Барыкина,¹ О. В. Зацепина.¹ ¹ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, и ²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, mistletoe8@gmail.com.

Фибрилларин — один из наиболее эволюционно консервативных белков эукариотической клетки. Он локализуется в плотном фибриллярном компоненте ядрышек и в тельцах Кахала. В ядрышке фибрилларин участвует в поддержании структуры, раннем процессинге и модификации пре-рРНК. У млекопитающих фибрилларин относится к числу наиболее подвижных белков ядра. Так, под действием H₂O₂ и HgCl₂ — индукторов окислительного стресса — белок изменяет локализацию. Однако вопрос о том, насколько быстро при окислительном стрессе изменяются свойства фибрилларина, остается открытым.

В настоящей работе с помощью непрямой иммуноцитохимии, иммуноблотирования, конфокальной лазерной микроскопии и метода FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) мы исследовали поведение фибрилларина в клетках человека HeLa под действием H₂O₂ в широком диапазоне концентраций от 200 мкМ до 10 мМ. В отличие от других методов анализа метод FRAP позволяет изучать свойства белка интереса в живых клетках и оценить такие параметры, как время полувосстановления флуоресценции его химер (отражающее скорость обмена в местах расположения белка), а также долю мобильной фракции белка, которая обладает функциональной активностью.

Полученные результаты показали, что воздействие окислителя приводит к исчезновению характерных фокусов расположения фибрилларина внутри ядрышка, а затем — к появлению белка в нуклеоплазме и, наконец, в цитоплазме. При 10 мМ H₂O₂ эти изменения отчетливо проявлялись через 30 мин в отдельных клетках и через 2 ч после начала обработки наблюдались во всех клетках. При этом на иммуноблотах электрофоретическая подвижность белка изменялась с ~34 (в контроле) до 37—38 кДа (10 мМ H₂O₂, 2 ч).

Однако методом FRAP изменения свойств фибрилларина выявлялись уже после инкубации клеток с H₂O₂ в течение 1—9 мин. Они проявлялись в уменьшении доли мобильной фракции фибрилларина-EGFP, что свидетельствует о ранней инактивации и иммобилизации белка при действии окислителя. Изменение динамических характеристик фибрилларина при минимальном времени воздействия H₂O₂ наблюдалось во всем диапазоне концентраций H₂O₂, хотя доля «измененных» клеток была пропорциональна концентрации перекиси. Результаты работы позволяют заключить, что белок фибрилларин является ранним сенсором окислительного стресса в клетках HeLa, а метод FRAP является «чувствительным» методом анализа свойств белков ядрышка в условиях стресса.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА FRAP ДЛЯ АНАЛИЗА РЕАКЦИИ ЯДРЫШКА НА ИНДУКЦИЮ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЛЕТКАХ HELa. © А. А. Миронова,^{1,2} А. Л. Братцева,^{1,2} О. В. Зацепина.¹ ¹ ФГБУН Институт биорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, и ² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, mistletoe8@gmail.com.

Одним из современных подходов к изучению свойств белков в живых клетках является метод FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), который применяется в сочетании с конфокальной лазерной сканирующей микроскопией и экспрессией белков интереса, слитых с маркерным флуоресцирующим белком, например EGFP. Этот подход, в частности, позволяет оценить долю мобильной (т. е. функционально активной) и немобильной (т. е. функционально инертной) фракций белков, обладающих энзиматической активностью.

Белок ядрышка фибрилларин — это основная ядрышковая метилтрансфераза, которая осуществляет 2'-О-метилирование рибозы и необходима для раннего процессинга пре-рРНК. У млекопитающих фибрилларин относится к числу наиболее подвижных белков ядра, который изменяет локализацию под воздействием различных внешних факторов, включая окислительный стресс. Однако вопрос о том, насколько быстро изменяются свойства фибрилларина и можно ли его считать сенсором окислительного стресса, остается открытым.

В настоящей работе с помощью непрямой иммуноцитохимии, иммуноблотирования, конфокальной лазерной микроскопии и метода FRAP мы исследовали поведение фибрилларина в клетках человека HeLa под действием H₂O₂ в широком диапазоне концентраций от 200 мкМ до 10 мМ.

Полученные результаты показали, что воздействие окислителя приводит к исчезновению характерных фокусов расположения фибрилларина внутри ядрышка, а затем — к появлению белка в нуклеоплазме и, наконец, в цитоплазме. Через 30 мин после воздействия 10 мМ H₂O₂ эти изменения проявлялись в отдельных клетках, а через 2 ч наблюдались во всех клетках. При этом на иммуноблотах электрофоретическая подвижность белка изменялась с ~34 (в контроле и на ранних сроках инкубации с H₂O₂) до 37—38 кДа при 2-часовом воздействии окислителя.

Однако методом FRAP изменения свойств фибрилларина выявлялись после инкубации клеток с H₂O₂ уже в течение 1—9 мин. Эти изменения заключались в уменьшении доли мобильной фракции фибрилларина-EGFP, хотя локализация белка в ядрышках и его электрофоретическая подвижность не отличались от контрольных значений. Изменение динамических характеристик фибрилларина при минимальном времени воздействия H₂O₂ наблюдалось во всем диапазоне концентраций H₂O₂, хотя доля «измененных» клеток была прямо пропорциональна концентрации перекиси. Эти наблюдения свидетельствуют о ранней реакции фибрилларина на действие окислительного стресса и его возможной инактивации при действии окислителя. Результаты работы позволяют заключить, что метод FRAP относится к одним из наиболее «чувствительных» методов анализа свойств белков ядрышка в условиях стресса, а белок фибрилларин является ранним сенсором окислительного стресса в клетках HeLa.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Госконтракт № 14.740.11.0121).

ДИНАМИКА АДГЕЗИИ НЕРВНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В КУЛЬТУРЕ. © П. В. Мищенко,¹ Н. Е. Зюмченко.¹ ¹ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, xpolli@mail.ru.

Нервные (нейральные) стволовые клетки к настоящему моменту обнаружены и описаны у различных организмов. Полагают, что изолированные нейральные стволовые клетки способны превращаться не только в нервные и глиальные элементы, но и в другие производные. Возрастающий интерес к выделению и культивированию нейральных стволовых клеток обусловлен в первую очередь перспективами их терапевтического использования при травматических повреждениях спинного мозга и дегенеративных заболеваниях центральной нервной системы человека. Важным вопросом для получения полной картины поведения данных клеток является изучение их адгезии, а также влияния различных субстратов на пролиферацию и дифференцировку, что может лечь в основу управляемой дифференцировки. В данной работе помимо известных и распространенных субстратов, таких как коллагены I и IV типов и полилизин, были использованы специфические субстраты, выделенные из морских ежей и медуз. Уникальность таких белков состоит в том, что они имеют домены, аналогичные белкам млекопитающих, влияющим на адгезию нервных клеток. В качестве субстратов изучали также пектины с различной степенью этерификации как возможные углеводные компоненты для направленной дифференцировки. Исходя из этого цель данной работы — исследование динамики адгезии нейральных стволовых клеток головного мозга крыс на различные экспериментальные субстраты и сравнение влияния различных углеводных и белковых субстратов на дифференцировку и пролиферацию клеток.

В результате подсчета клеток, адгезировавших на исследуемые субстраты через 1, 3, 6 и 12 ч после начала эксперимента, было выяснено, что на всех белковых и углеводных субстратах отмечается положительная динамика у разных отделов головного мозга крыс до срока 6 ч. Также отмечено, что количество нейральных клеток взрослых крыс, адгезировавших на различные субстраты, ниже, чем количество клеток эмбриональных тканей. Сделано предположение о том, что этерификация углеводов, в данном случае пектинов, тормозит адгезию. Замечено большее сродство клеток к коллагену IV типа в сравнении с другими белковыми субстратами, что согласуется с литературными данными. Особенно ярко данная закономерность проявляется на ранних сроках. Для определения влияния субстратов клетки после фиксации окрашивали мышинными и кроличьими антителами на БДУ (синтез ДНК), тубулин-бета III (нейральная дифференцировка), GFAP (глиальная дифференцировка) и нестин (нейральные стволовые клетки). Показана большая стимуляция пролиферативных процессов белковыми субстратами, а также незначительные влияния исследуемых субстратов на процессы дифференцировки в сравнении с контролем.

Все белковые и углеводные субстраты для данной работы были предоставлены сотрудниками лаборатории фармакологии Института биологии моря им. А. В. Жир-

мунского, за что мы выражаем им глубокую благодарность.

Работа выполнена в рамках гранта правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, договор № 11.G34.31.0010.

НЕСЛУЧАЙНОЕ РАСПОЛОЖЕНИЕ ХРОМОСОМ В ЯДРЕ СПЕРМАТОЗОИДА *BOS TAURUS*. © О. С. Мудрак,^{1,2} И. Б. Назаров,^{1,2} А. О. Заленский.^{1,1} ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, olgamudrak2010@gmail.com, и ²Институт репродуктивной медицины Медицинской школы Восточной Вирджинии, Норфолк, США.

Комплексные исследования организации хроматина в сперматозоидах человека показали, что хромосомы занимают в ядре дискретные территории, расположенные случайным образом. Это свойство было сохранено в эволюции млекопитающих, о чем свидетельствуют данные о расположении хромосом в сперматозоидах мыши (Garagna et al., 2001), крысы (Meurer-Ficca et al., 1998), свиньи (Foster et al., 2005), а также представителей примитивных групп млекопитающих — однопроходных (Watson et al., 1996; Greaves et al., 2003; Tsend-Ayush et al., 2009) и сумчатых (Greaves et al., 2001). Предполагают, что пространственная организация хромосом в мужских гаметах может быть важна для успешного оплодотворения.

До настоящего времени расположение аутосом в ядре сперматозоида было изучено только у одного из видов домашнего скота — свиньи (Foster et al., 2005). Нами исследована внутриядерная локализация хромосом 1, 29 и X в сперматозоидах быка *Bos taurus* методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) с пэинтинговыми пробами. Позиции хромосом охарактеризованы нормализованными (x;y) координатами центров хромосомных территорий. Наиболее вероятные области расположения хромосом визуализированы с помощью контурных графиков и гистограмм. Самая большая (1) и самая маленькая (29) хромосомы в кариотипе *B. taurus* занимают противоположные полюсы удлиненного ядра сперматозоида. Хромосома 1 расположена преимущественно в акросомной части, хромосома 29 — в базальной части ядра. Хромосома X обнаружена почти исключительно в центральной части ядра. Сходное расположение хромосомы X выявлено в сперматозоидах свиньи (Foster et al., 2005).

Данное исследование впервые демонстрирует внутриядерную локализацию аутосом 1 и 29 в сперматозоиде быка. Ранее применение FISH на сперматозоидах крупного рогатого скота сводилось к идентификации половых хромосом для проверки чистоты разделения образцов спермы на X- и Y-фракции на проточном цитометре (Kawasaki et al., 1998).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01489-а) и гранта NIH HD-042748.

МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ФЛАВОНОИДОВ НА КАНАЛООБРАЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ТОКСИНОВ И АНТИМИКРОБНЫХ АГЕНТОВ. © О. С. Остроумова,

С. С. Ефимова, В. В. Малев, Л. В. Щагина. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ostroumova@mail.cytspb.rssi.ru.

Флавоноиды — это полифенолы растительного происхождения. В структуру молекулы флавоноида входят два бензольных ядра, соединенных друг с другом трехуглеродным фрагментом. В зависимости от степени окисленности трехуглеродного фрагмента флавоноиды делятся на несколько классов, в том числе калхоны, изофлавоны, флавонолы, флаванолы, флаванолы и др. Флавоноиды играют важную роль в метаболизме растений и являются незаменимыми компонентами пищи человека и других млекопитающих. Они обладают антиоксидантной, антимикробной, противоопухолевой, гепатопротекторной, нейропротекторной, кардиопротекторной, противовоспалительной и антиаллергической активностью. Влияние флавоноидов на клеточный метаболизм хорошо документировано, в то время как конкретные механизмы их функционирования до сих пор остаются неизвестными. Малая токсичность и высокая биологическая активность флавоноидов свидетельствуют о перспективах их использования в качестве регуляторов активности различных порообразующих токсинов и антимикробных соединений.

Цель работы — установление молекулярных механизмов влияния флавоноидов на каналобразующую активность токсинов и антимикробных соединений в модельных липидных бислоях. Формирование бислоевых липидных мембран проводили по методу Монтала и Мюллера. В качестве каналобразующих веществ использовали противогрибковые циклические липодепсипептиды *Pseudomonas syringae* синрингомидин Е (СМЕ) и синрингопептин 22А (СПА), антибактериальный липопептид *Bacillus subtilis* сурфактин (СА), белковый токсин *Staphylococcus aureus* альфа-гемолизин (АГЛ), полиеновые макролидные антимикотики *Streptomyces* амфотерицин В (АмВ), нистатин (НС) и филиппин (ФП).

Анализ полученных результатов позволил выявить основные механизмы влияния флавоноидов на мембранную активность токсинов и антимикробных агентов.

1. Модификация физико-химических свойств мембраны, в частности уменьшение дипольного потенциала мембраны при введении в околосмембранный раствор калхонов и флавонолов. Эффект может выражаться как в модификации многоуровневой проводимости каналов (СМЕ, СА, АмВ и НС), так и в изменении коэффициента распределения каналобразующего соединения между водной и липидной фазами (СМЕ, СПА и СА).

2. Непосредственное взаимодействие флавоноидов с каналобразующими молекулами. Так, 5-, 7- и 4'-гидроксильрованные флавоноиды взаимодействуют с сенсором напряжения АГЛ-поры за счет образования водородных связей. Результаты измерения стационарной проводимости липидных бислоев, модифицированных полиеновыми макролидными антимикотиками, свидетельствуют о Ван-дер-Ваальсовых взаимодействиях между флавоноидами (флоретинном и кверцетинном) и полиен-стериновыми комплексами, образующими каналы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00948), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта президента РФ (МК-1813.2012.4).

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ЗАРОДЫШЕВОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ К ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ IN VIVO НА МОДЕЛИ ИХ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ДИФФУЗИОННЫХ КАМЕРАХ. © О. В. Паюшина, Н. Н. Буторина, Т. М. Никонова, О. Н. Шевелева, В. И. Старостин. ФГБУН Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, payushina@mail.ru.

На протяжении последних двух десятилетий мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются предметом активного исследования. Их потенции детально охарактеризованы в экспериментах по индукции различных направлений дифференцировки *in vitro*, однако результаты подобных экспериментов могут не в полной мере отражать поведение клеток в естественном микроокружении организма. В настоящей работе была исследована судьба стромальных клеток костного мозга и зародышевой печени крысы, трансплантированных животным-реципиентам в диффузионных камерах. Суспензию клеток костного мозга половозрелых крыс или печени 16-суточных зародышей крысы помещали в диффузионные камеры либо непосредственно после выделения из органа (100 млн клеток на камеру), либо после культивирования *in vitro* в течение 1—4 пассажей (1 млн клеток на камеру) и трансплантировали в перитонеальную полость половозрелых крыс на 35, 42 или 49 сут. Гистологический анализ срезов диффузионных камер, содержащих некультивированные клетки костного мозга, показал, что после пребывания в организме реципиента в большинстве из них образовывалось значительное количество волокнистой соединительной ткани, заполняющей большую часть внутреннего объема камеры, а в некоторых случаях присутствовали также участки хрящевой и костной тканей. Хрящевая ткань имела вид тонких пластин, прилежащих с внутренней стороны к стенкам камеры и без резкой границы переходящих в губчатую кость сложной разветвленной формы. Между костными балками, покрытыми слоем остеобластов, обнаруживалась костномозговая строма с многочисленными жировыми клетками и очагами кроветворения. Некультивированные клетки из печени зародышей образовывали в тех же условиях лишь тонкий слой соединительной ткани на внутренней поверхности стенок камер либо не образовывали вообще. Однако некоторые камеры содержали небольшие участки зрелой костной ткани с остеоцитами, окруженными большим количеством эозинофильного матрикса, но без остеобластов. При трансплантации пассируемых МСК костного мозга степень развития соединительной ткани и частота встречаемости очагов остео- и хондрогенеза варьировали от опыта к опыту, однако были сопоставимы для клеток 1, 2 и 3-го пассажей. Костная ткань, содержащая остециты и иногда также остеобласты, примыкала к поверхности камеры и граничила с хрящом, расположенным глубже и местами демонстрировавшим признаки дегенерации. В некоторых случаях обнаруживалась только костная ткань, тогда как хрящ отсутствовал. В камерах, содержащих МСК зародышевой печени 1—4-го пассажей, образовывалась только соединительная ткань, количество которой, как и в случае с клетками из костного мозга, не зависело от длительности их предшествующего пассирования *in vitro*. Костной и хрящевой тканью обнаружено не было. Полученные данные свидетельствуют о том, что МСК костного мозга на протяжении по крайней мере трех пассажей сохраняют исходную способность к остео-

и хондрогенезу *in vivo*, в то время как остеогенные потенции свежeweделенных клеток из печени зародыша теряются в процессе культивирования. Выяснение причин обнаруженных различий между стромальными клетками из двух источников требует дополнительных исследований.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ КРОВЕТВОРНЫХ ОРГАНОВ КРЫСЫ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА. © О. В. Паюшина, Н. Н. Буторина, О. Н. Шевелева, В. И. Старостин. ФГБУН Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, payushina@mail.ru.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК), присутствующие во всех транзиторных и дефинитивных кроветворных органах, являются важнейшим компонентом их стромы, участвующим в регуляции гемопоэза. Анализ фенотипических и функциональных особенностей МСК на разных стадиях онтогенеза позволяет пролить свет на процесс становления кроветворной системы. Цель настоящей работы состояла в сравнительном исследовании морфологии, иммунофенотипа и пролиферативной активности стромальных клеток эмбриональных и зрелых кроветворных органов крысы в первичной и пассируемой культуре. Клетки из печени 16- и 20-суточных зародышей, селезенки 20-суточных зародышей и половозрелых крыс, бедренной кости 20-суточных зародышей, содержащей развивающийся костный мозг, и костного мозга половозрелых крыс культивировали в среде α -MEM с 10 % сыворотки плодов коровы. При посеве в первичную культуру с плотностью $1 \cdot 10^6$ кл./мл стромальные клетки из изучаемых источников образовывали дискретные колонии фибробластов (за исключением клеток из кости зародышей, формировавших конглоэнтный монослой). При этом в печени 16-суточных зародышей в отличие от зрелого костного мозга большинство клоногенных клеток стромы проявляли чувствительность к оксимочевине и, следовательно, находились в пролиферативном цикле. В пассируемых культурах клеток из всех источников присутствовали как узкие веретеновидные фибробласты, так и имеющие сильно распластанную форму, характерную для стареющих клеток; в культуре костного мозга количество последних возрастало на 3-м пассаже, а в культуре зрелой селезенки — уже на 2-м, тогда как большинство клеток из печени и селезенки зародышей соответственно на 3-м и 2-м пассажах сохраняли типичную фибробластоподобную морфологию. По данным иммуноцитохимического анализа, в первичных культурах печени, селезенки и кости зародышей, как и в культуре зрелого костного мозга, присутствовали клетки, несущие на поверхности маркеры МСК CD73 и CD90, а также молекулу адгезии VCAM-1 (CD106), участвующую в регуляторных взаимодействиях стромальных клеток с кроветворными. Экспрессия этих антигенов сохранялась и на 1-м пассаже. Анализ доли клеток, экспрессирующих маркер пролиферативной активности Ki-67, показал, что на 1-м пассаже в культуре клеток, полученных из активно кроветворяющей печени 16-суточных зародышей, она была выше, чем у клеток из печени на стадии затухания гемопоэза (20 сут эмбриогенеза). Клетки из селезенки на стадии активного миелоидного кроветворения в этом органе (20 сут эмбриогенеза) также имели более высокую пролиферативную активность, чем у половозрелых животных,

в селезенке которых происходит в основном лимфопоэз. В то же время в культуре из кости 20-суточных плодов, костный мозг в которой лишь начинает формироваться, доля клеток Ki-67⁺ была сопоставима с таковой в культуре зрелого костного мозга. В ходе пассирования культуры как из эмбриональных, так и из постнатальных источников пролиферативная активность клеток снижалась. Таким образом, стромальные клетки из всех исследованных источников были сходны по морфологии и фенотипу, однако клетки печени и селезенки зародышей в период активного кроветворения характеризовались большей пролиферативной активностью по сравнению с клетками этих органов и костного мозга на более поздних стадиях онтогенеза. В дальнейшем планируется сравнительный анализ потенциалов МСК из тех же источников к дифференцировке *in vitro*.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ПАРАКРИННОЙ АКТИВАЦИИ β -КАТЕНИНА В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ПУТЕМ ТОРМОЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *WNT2*. © Н. С. Петров, О. В. Жидкова, Б. В. Понев. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) находятся в фокусе многочисленных исследований как потенциальный ресурс для клеточной терапии различных заболеваний. МСК обладают основными свойствами соматических стволовых клеток (СК) — клоногенностью и мультипотентностью: под действием тканеспецифических индукторов они дифференцируются в жировые, костные, хрящевые и другие клетки мезодермального происхождения. Дополнительно МСК обладают пластичностью и при определенных условиях принимают необычный фенотип, например трансдифференцируются в клетки энтодермального происхождения. В регуляции дифференцировочного потенциала МСК важную роль играет сигнальный путь Wnt/ β -катенин. β -Катенин входит в состав внутриклеточного и мембранного отделов клетки, в которых его функциональная роль различна, а регуляция состава и уровня в нормальных условиях осуществляется независимо. В отсутствие сигналов Wnt внутриклеточный β -катенин фосфорилируется Gsk3/ β по аминокислотным остаткам Ser33/37/Thr41, что придает ему сигнал для убиквитинирования и последующей деградации в протеасомах. Белки семейства Wnt секретируются в межклеточное пространство и паракринно индуцируют сигнальный путь Wnt/ β -катенин. Связывание на плазматической мембране лиганда Wnt с рецепторным комплексом опосредует внутриклеточную инактивацию Gsk3/ β , накопление β -катенина в цитоплазме и ядре и активацию транскрипции генов-мишеней.

Ранее мы разработали модель энтодермальной дифференцировки МСК *in vitro* путем их сокультивирования с клетками легочного эпителиального происхождения линии А-549 в условиях разделения клеточно-непроницаемой мембраной. В таких условиях в цитоплазме и ядре МСК повышается уровень общеклеточного β -катенина и индуцируется экспрессия маркеров легочного эпителия. Вероятным индуктором этих процессов является Wnt2, секретируемый клетками А-549. В настоящей работе для изучения механизма паракринной активации β -катенина мы использовали ингибирование экспрессии гена *WNT2* в клетках А-549 с помощью системы рSuper siRNA, позволяющей стабильно экспрессировать малую интерфериру-

ющую РНК против мРНК гена *WNT2*. Влияние торможения экспрессии *WNT2* на индукцию сигналов Wnt/ β -катенин оценивали с помощью антител к общеклеточному β -катенину, фосфо- β -катенину и активному β -катенину, распознающих соответственно, эпитоп в С-концевом участке белка, фосфорилированный по остаткам Ser33/37/Thr41-, или не фосфорилированный по остаткам Ser37/Thr41 β -катенин. Мы обнаружили, что при индукции в МСК сигнального пути Wnt/ β -катенин ионами лития фосфо- β -катенин не выявляется, но увеличивается количество активного белка, который присутствует в ядре, но не в цитозоле. При сокультивировании с клетками линии А-549 или обработке ионами лития в МСК увеличивается уровень общеклеточного и активного β -катенина, что выявляется как при иммунофлуоресцентной окраске, так и с помощью иммуноблоттинга. Ингибирование экспрессии гена *WNT2* в клетках А-549 отменяет индукцию активного β -катенина в МСК, при этом уровень общеклеточного β -катенина в МСК, сокультивируемых с клетками А-549 с нормальной или сниженной экспрессией *WNT2*, существенно не изменяется. Полученные данные можно рассматривать в качестве доказательства того, что ключевым звеном в механизме паракринной активации β -катенина в МСК является секреция продукта гена *WNT2* сокультивируемыми клетками А-549.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00252).

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КИСЛОРОДА И НАЛИЧИЯ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА УРОВЕНЬ АФК И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ММСК. © М. В. Погодина, Л. Б. Буравкова. ФГБУН Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, pogodina_m@mail.ru.

Ангиогенный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) позволяет рассматривать их как перспективный инструмент клеточной терапии заболеваний ишемического генеза. Однако необходимо учитывать, что при наращивании *in vitro* и последующей трансплантации клетки из оптимальных условий, поддерживаемых при культивировании, попадают в патологические. Факторами, негативно влияющими на трансплантируемые клетки, при нарушении кровоснабжения являются дефицит кислорода, питательных веществ и дисбаланс сигнальных молекул. Поэтому для успешного применения ММСК необходимо детальное изучение процессов, происходящих в них на разных этапах после хоуминга в пораженные участки.

Целью данной работы являлась оценка трансмембранного потенциала митохондрий и уровня активных форм кислорода (АФК) в ММСК из жировой ткани человека при сывороточной депривации и изменении концентрации кислорода в среде культивирования.

В работе использовали ММСК 2—4 пассажей, культивируемые при 20 и 1 % O₂ в среде. Для изучения эффектов изменения газовой среды клетки, постоянно культивируемые при 20 % O₂, однократно экспонировали при 1 % O₂ в течение 6 и 24 ч. При моделировании отсутствия ростовых факторов ММСК, постоянно культивируемые при 20 и 1 % O₂, подвергали сывороточной депривации в течение 6 и 24 ч. Также изучали совместные эффекты сы-

вороточной депривации и изменения содержания кислорода в среде в течение тех же временных промежутков. Уровень АФК и трансмембранный потенциал митохондрий ММСК оценивали цитофлуориметрически (Beckman Coulter EPICS XL, США) с помощью дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (H_2DCFDA) (Sigma Aldrich, США) и Mitotracker Red FM, JC-1 (Invitrogen, США) соответственно.

Показано, что кратковременное снижение содержания O_2 в среде приводит к уменьшению доли ММСК, содержащих АФК. Сывороточная депривация длительною как 6, так и 24 ч сопровождается резким повышением данного показателя. Средняя интенсивность флуоресценции H_2DCFDA в клетках, культивируемых в условиях постоянной газовой среды и при кратковременном снижении содержания кислорода, находилась на одинаковом уровне. Однако при действии сывороточной депривации данная величина резко увеличивалась как в клетках, культивируемых при постоянном содержании кислорода, так и в клетках, кратковременно помещенных в 1 % O_2 . Максимальная интенсивность флуоресценции наблюдалась после 6 ч сывороточной депривации, к 24 ч во всех группах данный показатель имел тенденцию к снижению.

Наибольшая величина трансмембранного потенциала митохондрий ММСК была выявлена при постоянном культивировании в среде с 20 % O_2 . При культивировании ММСК в среде с 1 % O_2 этот показатель был на 25 % ниже. Кратковременная экспозиция в гипоксии, как и сывороточная депривация, способствовали снижению величины трансмембранного потенциала. Максимально выраженные изменения наблюдались при отсутствии сыворотки.

Таким образом, культивируемые ММСК из жировой ткани человека являются более чувствительными к наличию ростовых факторов в среде культивирования, чем к снижению содержания кислорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ОФФМ РАН.

ЯДРЫШКИ ИНFUЗОРИИ *DIDINIUM NASUTUM* ИМЕЮТ НЕКАНОНИЧЕСКУЮ ПРОСТРАНСТВЕННУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ. © В. И. Попенко,¹ О. Г. Леонова,¹ Б. П. Караджян,² Ю. Л. Иванова,¹ Ю. Ф. Ивлев.³ ¹ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, popenko@immb.ru, ²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ³ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, Москва.

Ядрышки являются одним из основных компартментов ядер всех эукариот. Основными компонентами ядрышек высших эукариот, которые выявляются методами электронной микроскопии, являются фибриллярные центры, плотный фибриллярный компонент и гранулярный компонент. Синтез рРНК в «классических» ядрышках млекопитающих обычно происходит в центральной части ядрышка, а процессинг — по мере продвижения новосинтезированных рРНК из центра к периферии ядрышка.

В инфузориях ядрышки располагаются в макронуклеусах — транскрипционно активных соматических полиплоидных ядрах, геном которых в отличие от высших эукариот представлен набором относительно коротких

молекул ДНК. На ультраструктурном уровне в ядрышках большинства инфузорий, как и в ядрышках высших эукариот, выявляются 3 компонента: гранулярный и фибриллярный компоненты, а также ассоциированный с ядрышками хроматин, содержащий рДНК. В отличие от ядер высших эукариот геном соматических ядер инфузорий представлен относительно короткими молекулами ДНК (в видах с геном размером ДНК от 5 до 20 т. п. н., а в видах с субхромосомным размером генома — от нескольких десятков до нескольких сотен т. п. н.).

В данной работе мы исследовали ультраструктуру ядрышек в инфузориях *Didinium nasutum*, используя компьютерную трехмерную реконструкцию на основе серийных ультратонких срезов. В инфузории *D. nasutum* (субхромосомный размер ДНК) на стадии экспоненциального роста культуры ядрышки имеют инвертированное (по сравнению с «классическими» ядрышками высших эукариот) расположение компонентов: фибриллярный материал обычно образует сгустки, или трабекулы, на периферии ядрышка, а середина заполнена гранулярным материалом. Трехмерная реконструкция, проведенная на основе серийных ультратонких срезов, показала, что такие ядрышки представляют собой сложные большие структуры: фибриллярный компонент в пространстве макронуклеуса образует сложную сеть, внутри которой расположен гранулярный компонент. Показано, что структуры, которые на одиночных срезах выглядят как отдельные обособленные ядрышки, в действительности являются частями разветвленных ядрышковых сетей.

Анализ расположения структур ядрышкового хроматина, проведенный на трехмерных реконструкциях, показал, что все хроматиновые тельца, которые по морфологическим критериям могли рассматриваться как ядрышковые организаторы, располагаются снаружи ядрышек, по периферии фибриллярного компонента. Это является прямым доказательством того, что в ядрышках *D. nasutum* вектор процессинга рРНК направлен не так, как в «классических» ядрышках высших эукариот, а извне, от периферии ядрышка к его центру, где расположен гранулярный компонент.

Ранее было показано, что ядрышки с подобным «неканоническим» направлением вектора процессинга рРНК есть в макронуклеусе *Stylonicchia lemnae*, геном которой представлен молекулами ДНК геномного (0.4—20 т. п. н.) размера. Наши данные показывают, что такая ситуация наблюдается и в макронуклеусах инфузорий с субхромосомным размером ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01967а).

ЗАКОНОМЕРНОСТИ АКТИВАЦИИ ТУМОР-СУПРЕССОРНЫХ ПРОГРАММ СТАРЕНИЯ И АУТОФАГИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ ПРИ ДЕЙСТВИИ НА КЛЕТКУ ИНГИБИТОРОВ ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ (HDAC1) И АКТИВАТОРОВ АУТОФАГИИ. © Т. В. Поспелова, Т. В. Быкова, С. Б. Зубова, Ж. В. Шитикова, С. А. Гордеев, В. А. Поспелов. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vrgroup@mail.ru.

Современные стратегии в лечении раковых заболеваний основываются на использовании препаратов, блокирующих размножение опухолевых клеток, путем ин-

дукции в них эволюционно консервативных тумор-супрессорных программ апоптоза, старения и(или) аутофагической гибели. Действие этих программ в той или иной степени снижается в процессе превращения нормальной клетки в опухолевую. В связи с этим изучение закономерностей реактивации программ, приводящих к необратимому подавлению пролиферации, представляет первостепенную важность для разработки новых стратегий в лечении рака.

В настоящем сообщении приведены результаты анализа роли TOR-киназного каскада в процессе реактивации программ старения и аутофагической гибели ингибитором HDAC бутиратом натрия (NaBut) и ингибиторами TOR-киназного каскада. Показано, что NaBut вызывает старение в Ras-трансформированных клетках из-за способности индуцировать необратимый блок G₁/S клеточного цикла и активировать основные морфофункциональные события, связанные со старением. Стареющие клетки становятся гипертрофными, экспрессируют активность бета-галактозидазы, ассоциированной со старением (SA-β-Gal), в них накапливаются фокусы гамма-H2AX и происходят изменения актинового цитоскелета. Согласно результатам иммунофлуоресценции, полученным с использованием маркера аутофагосом белка LC3, процесс старения сопровождается активацией процесса аутофагии. Этот тип аутофагии является следствием активации комплекса mTORC1, что прямо следует из результатов по накоплению фосфорилированных форм мишеней mTORC1 — рибосомного белка S6 и ингибитора инициации элонгации фактора 4E-BP1.

Известно, что аутофагия активируется в клетке в ответ на нехватку белков, низкий уровень энергии, ростовых факторов и обычно происходит при подавлении активности mTOR-каскада. Поэтому мы использовали ингибитор сборки комплекса mTORC1 рапамицин и ингибитор киназной активности киназы mTOR, входящей в комплексы mTORC1 и mTORC2, — pp242. Исследовали процесс аутофагии, возникающий при старении и после подавления работы TOR-комплексов. Обнаружено, что процессы аутофагии, индуцированные при HDAC1-индуцированном старении и при действии ингибиторов комплексов mTOR, имеют разную кинетику и различаются по составу белков, выявленных в составе аутофагосом. Аутофагия, возникающая в ответ на подавление TOR-киназной активности, завершается гибелью клеток по II типу, тогда как аутофагия в стареющих клетках связана с сохранением их жизнеспособности. Обсуждается возможность селективного уничтожения опухолевых клеток путем активации тумор-супрессорных программ, старения и аутофагии, при действии разных комбинаций активаторов старения и аутофагии как перспективный подход для уничтожения опухолевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, МКБ РАН и СПбГУ.

ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ КД ХРОМАТИНА ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДЕР ПЕЧЕНИ КРЫСЫ ПОСРЕДСТВОМ ИОНОВ МАГНИЯ, ПОЛИГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ДИСТАМИЦИНА. © А. Н. Прусов,¹ Т. А. Смирнова,^{1,2} Г. Я. Коломийцева.¹ ¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного

университета им. М. В. Ломоносова, prusov@belozersku.msu.ru, и ² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва.

Динамические перестройки ядерного хроматина (ХР) составляют основу его функционирования. Считается, что ХР имеет многоуровневую организацию и выполнению биологических функций ДНК предшествует разворачивание ХР до нуклеосомного состояния. С развитием современных методов исследования накапливается все больше экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что функционирование ДНК в ХР происходит на самих конденсированных структурах. В качестве одной из моделей конденсации ХР в ядре предлагаются жидкостно-кристаллические дисперсии (ψ-форма ДНК). В настоящем исследовании мы сообщаем о структурных перестройках ХР в изолированных ядрах в присутствии ионов магния, поли-L-глутаминовой кислоты (ПГ) и противоопухолевого антибиотика дистамицина А (Д), детектируемых методом кругового дихроизма (КД).

В спектре КД ядер печени крысы обнаруживаются пики, характерные для выделенного ХР: положительные при λ = 272 и 282 нм и отрицательный при 292 нм. Однако значения КД при λ = 272 и 282 нм для ядер существенно ниже. Кроме того, появляются новые пики в длинноволновой области спектра. Если принять значение КД при 272 и 282 нм за меру конденсации ХР, то в суспензии ядер в буферах с содержанием Mg²⁺ от 1 до 10 мМ ХР наиболее конденсирован при 3—5 мМ Mg²⁺. Добавление в среды высокополимерного полианиона ПГ в весовом соотношении ПГ/ДНК ядер = 6, приводит, по данным КД, к дальнейшей конденсации хроматинового материала. Еще больший эффект вызывает инкубация с ПГ в присутствии Д при молярном соотношении Д/ДНК ядер = 0.1. Наиболее конденсированным, по данным КД, оказался хроматиновый материал в ядрах в условиях: 3 мМ Mg²⁺ + ПГ + Д. Причем конденсация материала (Δθ₂₇₂) за счет ПГ + Д была более заметной при 1 и 3 мМ Mg²⁺ по сравнению с 2 мМ Mg²⁺. На графике зависимости Δθ₂₇₂ ядер от концентрации ПГ после незначительного подъема при ПГ/ДНК = 0.2 с дальнейшим ростом этого соотношения наблюдали минимум, подобный тому, какой имеет место для зависимости Δθ₂₇₂ выделенного ХР от ионной силы. Такой же эффект имел место в ядрах и при изменении концентрации NaCl от 0.6 до 2 М. Эти факты тем более интересны, так как и ПГ, и NaCl экстрагируют гистоны, и в первую очередь H1, что, по литературным данным, должно было бы приводить к возрастанию θ₂₇₂ из-за дестабилизации и деконденсации ХР. Мы изучили ПГ-экстракцию гистона H1 из ядер при ПГ/ДНК ядер = 6 в буферах с разной концентрацией Mg²⁺ и установили, что величина выхода H1 в раствор возрастает с уменьшением содержания ионов магния и в присутствии Д. Мы полагаем, что частичное перемещение «сшивающих» катионов H1 и Mg²⁺ на высокополимерный анион в ядрах с высокой концентрацией ДНК (до 20 мг/мл) дает возможность освободившимся от сшивок фрагментам ДНК осуществить пространственную перестройку, приближающую их к более плотной холестерической жидкокристаллической организации. Отсутствие характерного для такого состояния интенсивного отрицательного или положительного пика КД, скорее всего, вызвано тем, что эти области представляют собой большое число маленьких доменов с разной

ориентацией холестерических осей (разупорядоченное распределение микродоменов).

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ H1 И H3 IN VITRO В ЯДРАХ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ С РАЗНЫМИ УРОВНЯМИ УПАКОВКИ ХРОМАТИНА. ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ И МЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНОВ. © А. Н. Прусов,¹ Т. А. Смирнова,^{1,2} Г. Я. Коломийцева.¹
¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, prusov@belozersky.msu.ru, и ² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва.

Посттрансляционная модификация белков через фосфорилирование является центральной в регуляции ключевых клеточных процессов. Изучено фосфорилирование гистонов H1 и H3 in vitro в изолированных ядрах печени крысы с различной структурой хроматина (Я-1 и Я-2) каталитической субъединицей циклоАМФ-зависимой протеинкиназы (ЦПК — экзогенное фосфорилирование) и эндогенными фосфокиназами. Показано, что экзогенное фосфорилирование обоих гистонов не зависит от структуры хроматина, тогда как эндогенное уменьшается в 2 раза в более развернутом Я-2 по сравнению с более компактным Я-1. При этом преимущественно фосфорилируется H1 (H1/H3 ~2 : 1 для ЦПК и ~4 : 1 для эндогенных ферментов). Присутствие специфических к последовательности ДНК антибиотиков влияет на фосфорилирование H1 и H3. Показано существование только в Я-1 небольшой нефосфорилирующей ЦПК фракции H1, приобретающей эту способность в присутствии дистамицина А (ДМ). H1 в этой фракции является прочно связанным на АТ-богатых последовательностях и не экстрагируется полиглутаминовой кислотой (ПГ), которая фракционирует гистоны на прочно и непрочно связанные в ядре. Одновременно ДМ понижает введение фосфата в гистон H3.

Фосфорилирование в присутствии хромомицина (ХМ) приводит к возрастанию удельной радиоактивности обоих гистонов как в ПГ-экстрактах, так и в ПГ-осадках, особенно в Я-2. При этом в Я-2 в отличие от Я-1 при малых концентрациях ХМ (ХМ/ДНК = 0.01) резко возрастает экзогенное фосфорилирование H1, расположенного на ГЦ-богатых линкерах. Высокие же концентрации как ХМ, так и ДМ (антибиотик/ДНК = 0.1) стимулируют фосфорилирование как в Я-1, так и в Я-2 неэкстрагируемой ПГ фракции H1, расположенной на линкерах, где АТ ≈ ГЦ. Из ядер, фосфорилированных в присутствии ХМ, в ПГ-экстракт выходит небольшая фракция H3, которая в 4—6 раз повышает удельную радиоактивность экстракта. Обнаружено влияние предварительного метилирования гистонов H1 и H3 в ядрах на их последующее фосфорилирование в зависимости от структуры хроматина, прочности связи гистонов в ней и концентрации ДМ. Полученные результаты по фосфорилированию гистонов и влиянию на него антибиотиков в разных структурах хроматина обсуждаются с точки зрения изменений положения N-концов гистонов H1 и H3 и их взаимодействия.

Показанные нами возможность дополнительного фосфорилирования гистонов в ядрах и его зависимость от структуры хроматина могут иметь отношение к измене-

нию динамических свойств хроматина и сказываться на его функционировании.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ВЕГЕТАТИВНОГО БЕЛКА Vp67 В СПЕРМАТОГЕНЕЗЕ ЛЯГУШКИ XENOPUS LAEVIS. © А. А. Реунов,¹ М. Клок,² Ю. А. Реунова.¹ ¹ ФГБУН Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия, arkadiy_reunov@hotmail.com, и ² Исследовательский институт Методистского госпиталя, Хьюстон, США.

Зародышевая плазма (ЗП) — цитоплазматическая субстанция клеток половой линии — у лягушки *Xenopus laevis* представлена компактными герминальными гранулами, состоящими из нескольких типов иРНК и белков, детально описанных в целом ряде обзоров. Одним из компонентов ЗП, роль которого остается все еще невыясненной, является Vp67, белок различающийся гомологией с митохондриальным белком дигидролипоамид-ацетилтрансферазой, выполняющим функцию E2 компонента пируват-дегидрогеназного комплекса. Сродство Vp67 с герминальными гранулами пока не имеет объяснения, но предположительно связано с участием митохондриального матрикса в формировании герминальных гранул. С целью выяснения стабильности присутствия Vp67 в герминальных гранулах молодых лягушек следующего поколения было предпринято исследование методами иммуноблотинга, иммунной электронной микроскопии и обычной электронной микроскопии. Было показано, что, несмотря на присутствие Vp67 в составе материнской зародышевой плазмы, этот белок отсутствует в структурах зрелой зародышевой плазмы, претерпевшей трансэмбриональную транспортировку. Можно предположить, что Vp67 играет вспомогательную роль, связанную с формированием герминальных гранул, но не участвует в премейотической функции данных структур.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ БЕЛКА VASA В СПЕРМАТОГЕНЕЗЕ ДРОЗОФИЛЫ И МЫШИ. © А. А. Реунов,¹ М. Клок,² Ю. А. Реунова,¹ Д. Брилл.³ ¹ ФГБУН Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия, arkadiy_reunov@hotmail.com, ² Исследовательский институт Методистского госпиталя, Хьюстон, США, и ³ Департамент клеточной биологии, Исследовательский институт госпиталя для больных детей, Департамент молекулярной генетики, Университет Торонто, Канада.

Известно, что РНК-хеликаза VASA является одним из основных белков, входящих в состав так называемой зародышевой плазмы (ЗП) — цитоплазматической субстанции, определяющей дифференциацию клеток половой линии. Данная субстанция формируется в поздних ооцитах, в процессе эмбриогенеза сохраняется в цитоплазме первичных половых клеток (ППК), а в гонадах особой нового поколения подвергается трансформации, стимулирующей переход ППК от митоза к мейозу. В силу того что роль VASA в трансформации ЗП неизвестна, исследование премейотической локализации этого белка, а также его связи со структурами, вовлеченными в функционирование ЗП, является актуальным.

В данной работе проведен сравнительный анализ локализации VASA в сперматогенных клетках дрозофилы и

мышы методами иммуноблотинга, иммунной электронной микроскопии и обычной электронной микроскопии. У обоих видов VASA в большом количестве присутствовал в цитоплазме сперматогониев и сперматоцитов, в сперматидях его количество уменьшалось, а в спермиях этот белок полностью отсутствовал. Преимущественно VASA был локализован в скоплениях ЗП, которые как у дрозофилы, так и у мыши контактировали с митохондриями. Характерно, что митохондрии, контактирующие с VASA, выделяли часть митохондриального матрикса в цитоплазму. В обоих случаях локализация VASA наблюдалась на ядерной мембране первичных сперматоцитов, а также внутри ядра. На основе полученных результатов впервые предполагается, что VASA может являться одним из факторов индукции мейоза. Аналогичность локализации VASA в сперматогенезе дрозофилы и мыши свидетельствует об универсальности его функции у беспозвоночных и позвоночных.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ МЕТ-РЕЦЕПТОРОМ И Е-КАДГЕРИНОМ. © Г. Ф. Решетникова. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, greshet@mail.cytspb.rssi.ru.

Высококкачественные формы рака характеризуются ослаблением межклеточных контактов и усилением подвижности клеток, что приводит к развитию метастазов. Многочисленные исследования показали высокую корреляцию между активацией Мет-рецептора и усилением инвазивного роста опухолевых клеток. Однако механизмы, лежащие в основе этого процесса, до сих пор остаются невыясненными.

Исследование взаимодействия между Е-кадгерином и Мет-рецептором мы проводили на перевиваемых опухолевых линиях клеток человека, различающихся экспрессией структурных белков адгезивного комплекса и вследствие этого имеющих различный статус межклеточной адгезии. Клетки, утратившие Е-кадгерин, основной структурный белок межклеточных контактов, обладают более злокачественным фенотипом (образование колоний в полужидкой среде, подвижность и инвазия). С помощью конфокальной микроскопии нами показано, что Мет локализуется с Е-кадгерином в области зрелых межклеточных контактов на базолатеральной стороне клеток. Кроме того, с помощью перекрестных сшивок и метода иммунопреципитации мы обнаружили, что в интактных клетках НТ-29 на мембране присутствуют комплексы Е-кадгерин/Мет-рецептор. Наши данные впервые доказали физическое взаимодействие между Мет-рецептором и Е-кадгерином.

Однако в клетках, не способных формировать контакты вследствие дисфункции Е-кадгерина, Мет преимущественно локализуется в цитозоле и гиперфосфорилирован в отсутствие лиганда. Экзогенная экспрессия Е-кадгерина в таких клетках восстанавливает мембранную локализацию рецептора и приводит к дефосфорилированию рецептора. Гепатитарный фактор роста (ГФР), связываясь с Мет-рецептором, индуцирует его фосфорилирование и разрушение межклеточной адгезии. Обнаружено, что разрушение межклеточной адгезии с помощью нейтрализующих антител против Е-кадгерина или EGTA индуцирует фосфорилирование Мет-рецептора. Однако в этом случае фосфорилируются околосмембранный домен (Y1003) и киназный домен (Y1230, 1234, 1235), но не ак-

тивируется «посадочный» домен (Y1349, 1356), который фосфорилируется ГФР. Такой же тип фосфорилирования обнаруживается в Е-кадгерин-негативных клетках.

Можно предположить, что Е-кадгерин является негативным регулятором фосфорилирования рецептора и может таким образом регулировать функции Мет-рецептора.

НАРУШЕНИЕ МОРФОГЕНЕЗА КОЖИ И ЕЕ ПРИДАТКОВ У МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ WE/WE WAL/WAL С РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ АЛОПЕЦИЕЙ. © А. Л. Punna, Е. А. Воротеяк, В. В. Терских. ФГБУН Институт биологии развития РАН, Москва, rippa86@yandex.ru.

Кожа млекопитающих — орган, состоящий из подочно-жировой клетчатки, дермы и эпидермиса и выполняющий широкий ряд функций — от барьерных до физиологических. Эпидермис отделен от дермы базальной мембраной и в волосистой части туловища состоит из 4 слоев кератиноцитов — базального, лежащего на базальной мембране, шиповатого, зернистого и рогового. В эмбриогенезе мыши базальный слой эпидермиса образуется на 12-е сут эмбрионального развития. По мере развития базальные кератиноциты дифференцируются в кератиноциты шиповатого слоя, а на 17-е сут эмбрионального развития происходит дальнейшая дифференциация в кератиноциты зернистого слоя. Одной из отличительных особенностей млекопитающих является наличие кожных придатков, в том числе волосяных фолликулов. Волосяные фолликулы закладываются на 14—15-е сут эмбрионального развития в виде поляризованных плакод базальных кератиноцитов, под которыми в дерме образуется конденсат дермальных клеток. Далее плакоды пролиферируют, инвагинируют, элонгируют и на поздних стадиях развития включают в себя дермальный конденсат, который уже в составе волосяной луковицы называется дермальной папиллой.

Мутанты we/we wal/wal имеют фенотип с четко выраженной алопецией к 21-м сут постнатального развития, дегенерацией или отсутствием вибрисс. В эмбриогенезе у этих мутантов нами были обнаружены существенные аномалии в развитии кожи и ее придатков. Через 18.5 сут в норме в волосяном покрове у мыши наблюдаются генерации всех 4 типов волосяных фолликулов на разных стадиях развития. В волосяном покрове мутантов в это время волосяных фолликулов было значительно меньше, и они запаздывали в развитии. Исследовав экспрессию маркера базальных кератиноцитов цитокератина 5, синтез которого в норме ограничен базальным слоем и зачатками волосяных фолликулов, мы выявили у мутантов зоны мультипликации базального слоя. Анализ экспрессии маркера пролиферирующих клеток Ki-67 показал, что клетки в этих зонах пролиферируют без инвагинации в дерму. С помощью иммуногистохимического анализа экспрессии маркера кератиноцитов зернистого слоя лорикрина нами также были обнаружены зоны уменьшения или отсутствия клеток шиповатого слоя, что свидетельствует об их преждевременной дифференциации в кератиноциты зернистого слоя. Сравнив паттерн экспрессии Е-кадгерина у мутантов с диким типом, мы обнаружили нарушение его асимметричной экспрессии в патологических зонах закладки волосяных фолликулов. Изучив экспрессию маркеров дермальной составляющей волосяных фолликулов, мы обнаружили, что дермальный конденсат

не компактизуется или компактизуется вблизи аномальной зоны, что говорит о нарушении эпителио-мезенхимных взаимодействий, необходимых для формирования полноценной структуры фолликула. Анализ экспрессии белков базальной мембраны, ламинина 5 и перлекана свидетельствовал об их аномальном распределении в виде «утолщений» базальной мембраны в зонах мультипликации базального слоя.

Исследовав паттерн экспрессии рецепторов к внеклеточному матриксу, интегринов $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha 1\beta 1$, которые в норме преимущественно экспрессируются в базальной части базальных кератиноцитов, мы обнаружили нарушение базальной ориентации рецепторов в эмбриональной коже мутантов. В зонах мультипликации базального слоя $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha 1\beta 1$ интегрин экспрессировались по всему периметру базальных кератиноцитов. Мы полагаем, что обнаруженные изменения могут опосредовать нарушение поляризации и миграции эпидермальных клеток в дерму и как следствие — аномальную закладку волосных фолликулов у мутантов *we/we wal/wal*.

ОБОНЯТЕЛЬНАЯ РЕЦЕПЦИЯ ГЕТЕРОГЕННА.
© В. О. Самойлов,¹ Е. В. Бигдай.¹ ¹ ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург.

Обонятельная рецепция пахучих веществ начинается с их взаимодействия с рецептором, локализованным в плазмалемме обонятельных жгутиков (ОЖ). В настоящее время накоплены доказательства, опровергающие равные возможности для всех рецепторных клеток взаимодействовать с веществами с различными запахами. Однако эти данные не позволяют непосредственно связать восприятие одоранта данного качества с обонятельными клетками, способными с ним провзаимодействовать.

Опыты проводили на изолированной обонятельной выстилке (ОВ) лягушки *Rana temporaria*. Роль внутриклеточных сигнальных систем в обонятельной рецепции камфоры, амилового спирта, амилацетата, цинеола, ванилина (одоранты 1-й группы), аммиака и сероводорода (одоранты 2-й группы) изучали методом прижизненной флуоресцентной микроскопии с применением фармакологического анализа. В качестве флуоресцентного зонда использовали раствор хлортетрациклина (25 мкМ). Стилизовали обонятельную выстилку в течение 3—4 с обдуванием парами одорантов (10^{-6} М).

Результаты наших исследований показали, что рецепция одорантов 1-й и 2-й групп обеспечивается разными молекулярными механизмами. Аммиак и сероводород способны проникать через внутриклеточные мембраны и прямо влиять на митохондриальное дыхание обонятельных клеток, ингибируя его. Такие мембранопроникающие свойства этих одорантов позволяют, вероятно, воспринимать их без участия молекулярных рецепторов.

В рецепцию камфоры, амилового спирта, амилацетата, цинеола и ванилина вовлекаются внутриклеточные сигнальные системы. Однако сами посредники и механизмы их активации у веществ с качественно разными запахами различны. Так, восприятие амилацетата, амилового спирта и цинеола обеспечивается внутриклеточной сигнальной системой цАМФ, тогда как в рецепцию камфоры и ванилина вовлекается фосфоинозитидная сигнальная система.

На основании полученных нами данных можно полагать, что активация синтеза специфических внутрикле-

точных посредников разными одорантами сопряжена с их взаимодействием со специфическими рецепторными молекулами плазмалеммы ОЖ: камфора и цинеол связываются с рецепторами, подобными рецепторным тирозинкиназам, а амиловый спирт, амилацетат и ванилин связываются с рецепторами, сопряженными с G-белками. При этом, например, амиловый спирт не конкурирует за свое место связывания в активном центре рецептора с какими-либо другими одорантами.

Нами показано, что стимуляция ОВ одорантами 1-й и 2-й групп изменяла двигательную активность ОЖ. Однако характер этих изменений различен. Под действием NH_3 и H_2S движения ОЖ активизируются на всей поверхности ОВ. Вероятно, способность к восприятию аммиака и сероводорода у всех обонятельных клеток одинакова, и в их плазмалемме нет молекулярных структур, специфически взаимодействующих с этими мембранопроникающими одорантами.

В отличие от них на стимуляцию каждым из одорантов 1-й группы реагируют ОЖ, локализованные в определенной зоне ОВ, при этом они не изменяют своей активности под действием другого одоранта этой же группы. Вероятно, реакция на данный раздражитель возникает только в тех обонятельных клетках, в жгутиках которых экспрессируются мембранные рецепторы, специфические для восприятия данного химического вещества.

Таким образом, можно предположить, что обонятельная рецепция обеспечивается разными физико-химическими механизмами, сосредоточенными в обонятельных клетках, экспрессирующих один тип обонятельных рецепторов и локализованных в определенных зонах обонятельного эпителия лягушки.

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ПРОДУКЦИЮ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В-КЛЕТОЧНЫМИ ЛИНИЯМИ NAMALVA И U266. © М. П. Самойлович,¹ О. А. Шашкова, А. А. Пиневиц, Н. Л. Вартамян, В. Б. Климович. ФГБУ РНЦ радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург, ¹mpsamoylovich@gmail.com.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) способны угнетать или стимулировать размножение трансформированных клеток в зависимости от гистогенеза последних, уровня их дифференцировки и(или) условий культивирования. Задача работы состояла в изучении влияния МСК жировой ткани здоровых доноров и пациентов с солидными новообразованиями на пролиферацию В-лимфобластоидных клеток линии Namalva и миеломных клеток линии U266 при разных условиях культивирования и на продукцию ими иммуноглобулинов (Ig). Клетки культивировали в атмосфере с 5 % CO_2 и 20 % O_2 (нормоксия) или 5 % O_2 (гипоксия). Дефицит ростовых факторов создавали за счет использования сыворотки со сниженной ростостимулирующей активностью.

Гипоксия стимулировала пролиферацию клеток Namalva при выращивании в среде, богатой ростовыми факторами, и оказывала подавляющий эффект при дефиците ростовых факторов. При сокультивировании клеток Namalva с МСК наблюдали образование тесных контактов между клетками обоих типов. Совместное культивирование клеток Namalva с МСК в стандартной ростовой среде снижало минимально эффективную посевную дозу лим-

фобластоидных клеток и стимулировало их пролиферацию. В присутствии МСК клетки Namalva поддавались клонированию методом лимитирующих разведений. В условиях дефицита сывороточных ростовых факторов сокультивирование с МСК обеспечивало выживание клеток Namalva как в нормоксии, так и при гипоксии, а также способствовало их пролиферации. Сокультивирование с МСК также стимулировало пролиферацию миеломных клеток U266. Культивирование клеток Namalva и клеток U266 в присутствии МСК не влияло на продукцию этими клетками IgM и IgE соответственно.

Таким образом, МСК из жировой ткани обеспечивают выживание и пролиферацию трансформированных В-лимфобластоидных клеток линии Namalva и миеломных клеток U266 при разных условиях культивирования и не влияют на синтез этими клетками Ig. Данные об установлении тесных контактов между МСК и клетками В-лимфоидных линий дополняют опубликованные ранее сообщения о контактном взаимодействии МСК с кардиомиоцитами или Т-лимфоцитами и позволяют думать, что выявляемая при сокультивировании склонность МСК к установлению тесных контактов с клетками разных линий дифференцировки представляет собой универсальное свойство, которое может проявляться и в условиях целостного организма. Важно отметить, что МСК от пациентов с новообразованиями, не получавших лучевой и полихимиотерапии, оказывали на В-клеточные линии такое же воздействие, как МСК, выделенные из липоаспиратов здоровых доноров.

ВЛИЯНИЕ ДОКОЗАГЕКСАЕНОИЛДОФАМИНА НА ПРОХОЖДЕНИЕ РАННИМИ ЗАРОДЫШАМИ МЫШЕЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ЭТАПОВ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ. © Н. Ю. Сахарова,¹ Л. Н. Маркова,² А. А. Смирнов,¹ Е. Ф. Вихлянцева,¹ Л. А. Филаловская,³ В. В. Безуглов.⁴ ¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, ² ФГБУН Институт биологии развития РАН, Москва, ³ ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, и ⁴ ФГБУН Институт биоорганической химии РАН, Москва.

На ранних стадиях развития доимплантационных зародышей млекопитающих происходят важные морфогенетические события, определяющие направление клеточной дифференцировки потомков первых бластомеров. К таким событиям прежде всего относятся асинхронное деление бластомеров, их поляризация на стадии 8 бластомеров, сопровождающаяся последующей компактизацией, разделение клеток на внешний и внутренний слои на стадии морулы, дифференцирующихся соответственно на трофобласт и внутреннюю клеточную массу бластоцисты — конечный результат доимплантационного развития. Выяснение факторов, регулирующих последовательные ступени дифференцировки клеток раннего зародыша, составляют важную проблему современной эмбриологии. Такими факторами могут быть и нейротрансмиттеры (ацетилхолин, серотонин и катехоламины). В ооцитах, зрелых яйцеклетках и в доимплантационных зародышах мышей показано присутствие как самих транзиттеров, так и всех компонентов транзиттерных систем. Исследование действия агонистов и антагонистов серотонина, адреналина и ацетилхолина показывает их функциональную активность и участие в процессах кле-

точной дифференцировки на ранних стадиях эмбриогенеза млекопитающих. Антагонисты транзиттеров останавливают или тормозят деления дробления и нарушают формирования бластоцисты. Внесение соответствующих транзиттеров нормализует процессы раннего эмбриогенеза. Наименее изучено действие такого важного транзиттера, как дофамин, из-за его нестабильности в инкубационной среде. В данной работе мы использовали конъюгат дофамина с докозагексаеновой кислотой (ДГК-ДА). Этот липофильный аналог дофамина легко проникает через клеточную мембрану и устойчив в инкубационной среде. ДГК-ДА обладает и собственной биологической активностью, что представляет самостоятельный интерес. 2-, 4- и 8-клеточных зародышей мышей линии SHK культивировали в среде M-16 (Sigma), в которую вносили ДГК-ДА (2 мкМ). Культивирование проходило в стандартных условиях до достижения контрольными зародышами стадии бластоцисты. Полученные результаты показывают, что ДГК-ДА действует по-разному на зародышей в зависимости от их стадии. ДГК-ДА останавливал дробления 2-клеточных зародышей, но нарушал следующий процесс — компактизацию на стадии 8 бластомеров. Он не прерывал деления 4-клеточных зародышей и последующую компактизацию, но подавлял следующий процесс — формирование многоклеточной морулы. У 8-клеточных зародышей в присутствии ДГК-ДА проходили процессы компактизации и образования морулы, но нарушалось формирование бластоцист. Эти результаты показывают, что ДГК-ДА не нарушает протекания какой-то определенной стадии, но блокирует переход на следующую. По-видимому, ДГК-ДА влияют на процессы, которые детерминируют следующую стадию развития, но не препятствуют завершению уже происходящих морфогенетических событий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01-469А).

НЕКОТОРЫЕ НОВЫЕ СВОЙСТВА СИГНАЛОВ ЯДРЫШКОВОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ. © Д. М. Свистунова, Я. Р. Мусинова, Е. В. Шеваль. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, sheval_e@genebee.msu.su.

Специфическое накопление белков в ядрышке может определяться несколькими различными механизмами. Наиболее детально охарактеризованы два механизма — за счет РНК-связывающих доменов и за счет сигналов ядрышковой локализации (NoLS). В настоящее время описано почти 100 белков, в которых присутствие NoLS доказано экспериментально (с разной степенью аккуратности); предсказывается же наличие NoLS в ~54 % ядрышковых белков, т. е. этот тип сигналов распространен достаточно широко. Однако молекулярные механизмы, посредством которых NoLS обеспечивают накопление белков в ядрышке, изучены слабо. В настоящей работе представлены результаты биоинформационного изучения известных NoLS и экспериментального изучения механизмов опосредованного NoLS накопления белков в ядрышке. Анализ известных NoLS показывает, что подавляющее большинство описанных сигналов этого типа обогащены положительно заряженными аминокис-

лотами (лизины и аргинины составляют почти 50 % от общего числа аминокислот). Выявляются некоторые различия между NoLS вирусных белков и белков животных. Так, NoLS вирусных белков располагаются преимущественно на N-конце белка (у животных NoLS могут располагаться как на N-, так и на C-конце). Также для NoLS вирусных белков характерно иное соотношение аргининов и лизинов, а также обогащение пролинами. Для исследования механизмов действия NoLS нами были использованы специально подобранные последовательности аминокислот, которые способны обеспечивать оптимальное накопление EGFP в ядрышке (imitative NoLS, iNoLS). Мы показали, что свойства iNoLS весьма похожи на свойства NoLS, что позволяет использовать данную модель для экспериментального изучения данного типа сигналов. С использованием iNoLS показано, что накопление EGFP в ядрышке пропорционально заряду сигнала и пропорционально плотности расположения положительно заряженных аминокислот в сигнале. EGFP свободно обменивается между ядрышком и нуклеоплазмой, причем скорость обмена снижается с увеличением суммарного заряда iNoLS.

Морфологический анализ показывает, что iNoLS обеспечивает накопление EGFP в гранулярном компоненте ядрышка. Предпринята попытка выявить молекулярные партнеры, с которыми взаимодействуют iNoLS в ядрышке. Согласно литературным данным, на такую роль могут претендовать мажорный ядрышковый белок B23 и РНК. С использованием двух независимых методов нами показано, что iNoLS в живых клетках не взаимодействуют с B23 (или взаимодействует столь слабо, что это не тестируется при помощи использованных методов). По-видимому, накопление EGFP в ядрышке за счет iNoLS происходит путем взаимодействия с РНК. Полученные результаты косвенно подтверждают ранее высказанную гипотезу об электростатическом механизме реализации активности NoLS.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01237).

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СВЧ-ГИПЕРТЕРМИИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ. © Л. Б. Снопина,¹ Н. Н. Проданец,¹ М. А. Сироткина,^{1,2} А. А. Кордюкова,² А. В. Стриковский,³ Е. В. Загайнова.^{1,2} ¹ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ, npr.71@mail.ru, ²Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского и ³ФГБУН Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород.

Температурное воздействие на опухоль с применением излучения СВЧ широко применяется в мире и имеет преимущество перед хирургическим вмешательством, так как метод локальной СВЧ-гипертермии является неинвазивным. Высокая эффективность данного метода обусловлена тем, что при воздействии электромагнитных полей (ЭМП) сверхвысоких частот на биологические ткани происходит распределенное по объему преобразование электрической энергии в тепловую. Это обеспечивает большую эффективность нагрева.

Предполагается, что к более равномерному и интенсивному прогреву биологической ткани может привести введение в область СВЧ-воздействия металлических на-

ночастиц, например золотых наностержней. В связи с этим целью работы явилось изучение структурных изменений опухолевой ткани под воздействием СВЧ-энергии и металлических наночастиц.

Исследование проводилось на модели перевиваемой солидной опухоли мышей рак шейки матки (РШМ-5). Локальное СВЧ-воздействие выполнено на приборе КСТД-1, разработанном в Институте прикладной физики РАН (Нижний Новгород). На опухоль воздействовали контактным способом с помощью биполярного электрода, используя два режима воздействия — 150 Дж (однократно) и 50 Дж трехкратно через день. Перед сеансом СВЧ-гипертермии животным вводили внутривенно раствор золотых наночастиц. Опухолевую ткань забирали на морфологический анализ через 24 ч после последнего воздействия. Образцы ткани окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Анализ гистологических препаратов опухоли показал, что структурные изменения имеют однотипные характер и степень выраженности как при однократном СВЧ-воздействии (150 Дж), так и после трех сеансов (50 Дж). В ткани опухоли выявлены полнокровные сосуды и участки разрежения опухолевых клеток. В клетках отмечаются нарушение тинкториальных свойств цитоплазмы и гиперхромия ядер. Применение золотых наночастиц для СВЧ-гипертермии в обоих режимах привело к более серьезным разрушениям ткани: в опухолевых клетках отмечены деструктивные изменения в виде вакуолизации цитоплазмы, внутриклеточного отека, иногда с разрывом клеточной оболочки и отеком ядер.

Таким образом, СВЧ-воздействие на опухоль, содержащую золотые наночастицы, оказывает более значительные деструктивные изменения в ткани опухоли, чем без наночастиц. Однократное воздействие 150 Дж сопоставимо по повреждающему действию с трехкратным (50 Дж).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК 02.740.11.0713, 11Г.34.31.0017 и 16.512.11.2053).

ОБЩАЯ И МЕСТНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СИНГЕННЫХ КЛЕТОК ДИКОГО КОСТНОГО МОЗГА ВОССТАНАВЛИВАЕТ СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ mdx. © А. В. Соколова,¹ В. В. Кравцова,² В. В. Зенин,¹ Е. В. Каминская,¹ Н. А. Тимонина,² И. И. Кривой,² В. М. Михайлов.¹ ¹ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и ²С.-Петербургский государственный университет, vmikhailov@mail.cytspb.rssi.ru.

Мыши mdx являются экспериментальной моделью неизлечимого моногенного заболевания миодистрофии Дюшенна. Из-за мутации структурного гена дистрофина развивается гибель мышечных волокон (МВ), сопровождающаяся смертью пациентов. Отсутствие синтеза дистрофина также сопровождается нарушением структуры нервно-мышечных соединений (синапсов), когда ацетилхолиновые рецепторы (Ац-хол-рецепторы) скапливаются в виде островков и равномерно распределены по длине плазматической мембраны МВ. После местной внутримышечной трансплантации Lin(-) популяции клеток костного мозга (ККМ) в M. quadriceps femoris происходило усиление синтеза дистрофина до 2 % МВ. При

этом островки Ац-хол-рецепторов собираются вместе, образуя отдельные скопления — синапсы. Также происходит увеличение общей площади НМС до 666.0 ± 46.1 мкм², достоверно превосходящей величину площади синапсов, характерную для НМС дикого типа — 403.8 ± 77.1 мкм². Однако скоплений Ац-хол-рецепторов в виде ветвей не было зарегистрировано.

При общей клеточной терапии использовали свежесделанные ККМ, которые трансплантировали мышам mdx после их облучения в дозе 5 или 3 Гр. Трансплантация после облучения в летальной дозе 5 Гр не сопровождалась усилением синтеза дистрофина выше 2 % при наблюдении до 6 мес после трансплантации. Трансплантация ККМ после облучения в полублетальной дозе 3 Гр сопровождалась усилением синтеза дистрофина через 6 мес до 27 %. Такой значительный рост экспрессирующих дистрофин МВ соответствует минимальной доле 20 % экспрессирующих дистрофин МВ, при которой наблюдается восстановление функции мышц большого организма. В соответствии с 20%-ным критерием результатом проведенного эксперимента стало частичное излечение мышей mdx от миодистрофии. При этом также происходили уменьшение гибели МВ до 0.7 % и повышение доли МВ без центральных ядер до 22 %. Полученные данные указывают на прогрессивное усиление дифференцировки скелетных мышц после общей трансплантации ККМ. В диафрагме через 4 мес также происходит усиление синтеза дистрофина до 11 % мышечных волокон и частичное восстановление структуры НМС диафрагмы. При этом в составе НМС накапливаются Ац-хол-рецепторы в виде ветвей до 43 % и уменьшается доля скоплений Ац-хол-рецепторов в виде островков с 76 до 54 %, что указывает на более значительное улучшение структуры НМС, чем в случае местной клеточной терапии.

Таким образом, замена костного мозга у мышей mdx на костный мозг дикого типа приводит к усилению синтеза дистрофина и более выраженному восстановлению НМС МВ, чем в случае местной клеточной терапии. Важно было узнать, происходит ли функциональное восстановление синапсов. Для решения задачи были изучены мембранные потенциалы покоя как в области НМС, так и между ними. Согласно электрофизиологическим измерениям в МВ диафрагмы после трансплантации костного мозга происходит восстановление мембранного потенциала покоя синапсов от -75 до -81 мВ и в участках мембран между синапсами от -74 до -77 мВ. Гиперполяризация концевых пластинок нейромусcularных синапсов также достигает нормальной величины -3.7 мВ. Эти данные показывают, что в результате замены ККМ после облучения в дозе 3 Гр происходит восстановление функции нейромусcularных соединений. В мазках костного мозга через 6 мес после трансплантации обнаружено 3 % клеток донорского происхождения, что указывает на возникновение у реципиентов костного мозга мышей mdx смешанного химеризма. Трансплантация костного мозга после облучения в дозе 1.6—3.0 Гр носит название немизлоаблативная трансплантация костного мозга. Полученные результаты указывают на восстановление синтеза дистрофина у мутантных животных после проникновения в саркоплазму ядер трансплантированных клеток после немизлоаблативной трансплантации ККМ дикого типа и функции НМС.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы «Молекулярно-клеточная биология»

РАН, Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00970а) и научно-исследовательского гранта С.-Петербургского государственного университета № 1.131.118.2011.

ТЕЛОМЕРНЫЕ И ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫЕ ПОВТОРЫ (TTAGGG) В КЛЕТКАХ СИРИЙСКОГО ХОМЯЧКА. © Л. В. Соловьева, С. Ю. Демин, Н. М. Плескач, М. О. Кузнецова, М. П. Светлова. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Повторы (TTAGGG)_n в клетках млекопитающих и человека находятся не только на концах хромосом (ТП), но также и в интерстициальных сайтах (ИТП). С использованием FISH с теломерной PNA-пробой на метафазных хромосомах сирийского хомячка оценен относительный размер ТП и ИТП. Наиболее значительные по размеру ИТП располагаются в перичентромерных районах хромосом 2, 4, 14, 20 и X. Незначительные по размеру ИТП обнаруживаются в остальных метацентрических хромосомах, за исключением хромосомы 21. С помощью инвертированного DAPI-бэндинга высокого разрешения уточнена структура перичентромерных районов хромосом, в которых обнаруживаются большие блоки ИТП. Идиограммы указанных хромосом отличались от идиограмм, созданных на основе G-бэндинга (Li et al., 1982), главным образом в перичентромерных областях. В разных хромосомах сигналы FISH на ИТП охватывали от 1 до 4 хромосомных бэндов, причем располагались как в темных, так и светлых бэндах, что может быть связано с присутствием повторяющейся ДНК другого типа.

Расположение ТП и ИТП в интерфазных ядрах исследовали с помощью FISH или после трансфекции клеток плазмидой, экспрессирующей TRF1, белок комплекса шелтерин, слитый с GFP. Для определения стадий клеточного цикла использовали иммунофлуоресцентную окраску на пролиферативный маркер Ki-67 и включение EdU в качестве маркера S-фазы. Описаны характерные картины окраски антителами к Ki-67 для разных стадий цикла клеток сирийского хомячка.

Анализ последовательных серий конфокальных изображений ядер клеток, трансфицированных GFP-TRF1 или после проведения FISH, показал наличие хорошо различимых глазок ассоциаций ТП (2—4 сближенных фокуса) на всех стадиях интерфазы, причем ассоциации фокусов FISH регистрировались чаще, чем ассоциации фокусов TRF1.

Среднее количество всех регистрируемых фокусов GFP-TRF1 на ядро в G₀ и G₁/ранней S-фазе было меньше, чем среднее количество фокусов FISH на ядро в соответствующих фазах, что может быть связано с увеличением кластеризации ТП за счет сверхэкспрессии TRF1 и образованием тесных ассоциаций ТП, регистрируемых как единые фокусы. Среднее количество фокусов GFP-TRF1 и фокусов FISH на ядро было незначительно увеличено в G₁/ранней S-фазе по сравнению с G₀, возможно в связи с тем, что уже в начале S-фазы реплицируется часть ТП.

В живых клетках наблюдалось постоянное стохастическое движение ТП, маркированных GFP-TRF1, которое, однако, в условиях ограниченного времени наблюдения не приводило к образованию стабильных ассоциаций. Наличие на фиксированных клетках «зеленых мостиков» между соседними ТП, отмеченных белком

GFP-TRF1, позволяет предположить, что, хотя образование ассоциаций ТП является редким событием в течение интерфазы, оно может быть обратимым.

СИНЦИТИАЛЬНАЯ СВЯЗЬ НЕЙРОНОВ IN VIVO И IN VITRO. © О. С. Сотников, А. А. Лактионова, Н. М. Парамонова. ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, лаборатория функциональной морфологии и физиологии нейрона, Санкт-Петербург.

В литературе есть неопровержимые факты наличия в нервной системе настоящей цитоплазматической синцитиальной межнейронной связи. В первую очередь это касается гигантских аксонов беспозвоночных (Young, 1939). У позвоночных межнейронный синцитий обнаружен у кошек и крыс (Santander et al., 1988; McCarthy et al., 2009). Нами синцитиальные связи нервных отростков были обнаружены в энтеральном нервном сплетении у 1—2-месячных поросят, в симпатических ганглиях, у эмбрионов крыс 14—22 дней развития, в гиппокампе и мозжечке кроликов и в коре большого мозга крыс и человека. Описаны структурные закономерности синцитиальных перфораций спаренных мембран смежных нейронов. Для более детального исследования процесса синцитиального слияния нейронов нами впервые разработан метод массового получения синцитиальных связей и слияния нейронов в культуре ткани.

При нашем способе нейроны вначале освобождали от соединительнотканной капсулы ганглия и сателлитной глии с помощью протеолитической обработки. Затем их исследовали в культуральной среде Игла MEM (Sigma) в течение 5 сут. В другой серии опытов агрегировали клетки с помощью центрифугирования и сохраняли в таком виде в культуральной среде в течение 2 сут. Затем с помощью стандартной трансмиссионной электронной микроскопии исследовали ультраструктуру границ контактирующих нейронов.

В культуре ткани на 2-е сут культивирования у нейронов начинают расти отростки, с помощью которых они контактируют, и, сокращаясь, сближают тела клеток друг с другом. Контактующие тела нейронов формируют 8-образные структуры, которые отделяются вакуолеподобными образованиями. С помощью компьютерной обработки изображения вакуолеподобные структуры на границе клеток видны отчетливо.

На полутонких срезах удается обнаружить образование вдоль контактирующих краев нейронов множественные цитоплазматические мостики слияния. Мостики отделены друг от друга крупными вакуолеподобными образованиями, которые представляют собой локально резко расширенные фрагменты межклеточного пространства. Чередующиеся мостики слияния и вакуолеподобные образования располагаются четко по границам клеток и могут служить достоверным ориентиром этих границ под световым микроскопом, особенно при использовании компьютерной программы ACDSee. Именно мостики слияния представляют собой синцитиальные связи, объединяющие цитоплазму смежных клеток.

С помощью электронного микроскопа это действительно подтверждается. Вместо контактирующих наружных клеточных мембран, разграничивающих цитоплазму смежных нейронов, обнаруживаются только их короткие остаточные фрагменты. Нейроплазмы смежных клеток непосредственно переходят друг в друга.

Таким образом, в этих опытах впервые удалось смоделировать синцитиальную связь между нейронами *in vitro*, доказать их слияние и тем самым подтвердить принципиальное сходство нейронов с другими ненервными клетками в вопросе межклеточных взаимоотношений.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ДИНАМИКА ХРОМОСОМ (ОНТО- И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ). © В. Н. Стегний, Г. Н. Артемов, Т. В. Ананьина, А. А. Коханенко, К. Е. Усов. Томский государственный университет, gene@res.tsu.ru.

Важным механизмом эпигенетической регуляции функционирования отдельных генов и генома в целом являются пространственная организация и динамика хромосом в онто- и филогенетических аспектах (Стегний, 2006; Cremer, Cremer, 2010). Выявление хромосомных территорий в интерфазных ядрах (Ананьина и др., 2005) и анализ свойств гетерохроматина в регуляции экспрессии генов (Grewal, Rice, 2004) показывают, что онтогенетическая закономерная динамичность ядерной архитектуры (Kokhanenko et al., 2012) — ключ к разгадке принципов структурно-функциональной организации геномов. При этом установленная видоспецифичность хромосомно-мембранных ассоциаций (Стегний, 1979) демонстрирует важную эволюционную значимость архитектуры хромосом.

С помощью 3D FISH было показано, что в ходе политенизации хроматина *C. erythrocephala* происходят существенные изменения в организации хромосомы 6 в пространстве ядра. На ранних стадиях политенизации хроматина трофоцитов и слюнных желез *C. erythrocephala* материал хромосомы 6 занимает компактное положение в центральной части ядра. В ходе эндоредупликации хроматина трофоцитов постепенно происходит перемещение материала хромосомы 6 на периферию ядра. В ядрах трофоцитов на поздних стадиях политенизации часть материала хромосомы 6 располагается на периферии ядра, а в пространстве ядра распределены мелкие сигналы ДНК-зонда хромосомы 6 (Kokhanenko et al., 2012). В высокополитенизированных ядрах слюнных желез материал хромосомы 6 распределен в пространстве ядра.

FISH ДНК-пробы района прикрепления хромосомы XL к ядерной оболочке трофоцитов малярийного комара *An. messeae* с хромосомами *An. atroparvus* и *An. beklemishevi* показал отсутствие специфичности ДНК-пробы только районам прикрепления, так как сигнал был локализован и в районах хромосом, не образующих жестких контактов с оболочкой ядра. Для выявления функционально значимых последовательностей была получена и просеквенирована библиотека клонов из района прикрепления хромосомы XL, а также проведен ее скрининг на наличие последовательностей гомологичных ДНК районов прикрепления других хромосом. В результате были выявлены район специфичные (найденные только в хромосоме XL *An. messeae*) хромосомно-специфичные последовательности (характерные только для хромосом XL *An. atroparvus* и *An. messeae*), а также ДНК районов прикрепления хромосом 3R и XL (Артемов и др., 2007, 2010, 2011).

В результате *in situ*-гибридизации район-специфичной библиотеки ДНК хромосомы трофоцитов *D. oreana* с политенированными хромосомами трофоцитов видов подгруппы *melanogaster* показано, что у восьми видов — *D. erec-*

ta, D. teissieri, D. yakuba, D. santomea, D. simulans, D. melanogaster, D. sechellia и *D. mauritiana* — прицентромерный гетерохроматин характеризуется частичным сходством состава ДНК с составом ДНК хромосомы *D. orena*. Общим компонентом хромосомы трофоцитов *D. orena* и прицентромерного гетерохроматина хромосом у видов подгруппы *melanogaster* являются повторные последовательности ДНК (диспергированные повторы: LTR-ретротранспозоны, LINE-элементы, ДНК-транспозоны; тандемные повторы; последовательности, гомологичные генам, кодирующим белок). Установлено, что ДНК из хромосомы трофоцитов *D. orena* консервативна в плане своего распределения преимущественно в прицентромерных районах хромосом у всех видов подгруппы *melanogaster* (Усов и др., 2008, 2011).

АКТИВАЦИЯ p53 В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ ВЕДЕТ К СНИЖЕНИЮ ИХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СВОЙСТВ И АПОПТОЗУ.
© И. И. Суворова, О. Г. Магнес, В. А. Поспелов. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, irsuvogv@yandex.ru.

Белок p53 является опухолевым супрессором и вовлечен в регуляцию клеточного цикла и клеточный ответ на повреждение ДНК. При действии генотоксических факторов p53 активируется, стабилизируется и функционирует как транскрипционный фактор, запуская экспрессию многочисленных генов-мишеней, участвующих в регуляции клеточного цикла и апоптоза. Известно, что в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) отсутствует контрольная точка G₁/S, в основе функционирования которой лежит сигнальный путь p53-p21/Waf1. Так как ЭСК обладают плюрипотентностью и высоким пролиферативным потенциалом, возможно, что функционирование этого пути может быть ограниченным. В данной работе был проведен анализ последствий реактивации p53 на основные клеточные процессы — пролиферацию, дифференцировку и апоптоз в ЭСК мыши.

Для реактивации p53 был использован нутлин, который ингибирует взаимодействие между p53 и его негативным регулятором белком МДМ2. Согласно полученным данным, через 1 сут после обработки нутлином наблюдаются аккумуляция клеток в контрольной точке G₁/S и снижение доли клеток в фазе S. Это коррелирует с быстрым накоплением белка p53, его фосфорилированием по ser-15 и увеличением трансактивационного потенциала. Было показано, что реактивированный p53 способен запускать экспрессию своего главного гена-мишени p21, белковый продукт которого ингибирует циклинзависимые киназные комплексы, и снижать экспрессию плюрипотентных генов, таких как Oct4, Sox2 и Nanog. Кроме того, действие нутлина вызывает заметную клеточную гибель в популяции ЭСК мыши уже через 24 ч после обработки. Таким образом, в ЭСК мыши имеет место дисфункция сигнального пути p53-p21/Waf1, что, вероятно, необходимо для поддержания самообновления и плюрипотентности. Соответственно направленная реактивация p53 в ЭСК мыши может блокировать самообновление и индуцировать запуск дифференцировки и апоптоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ, МКБ РАН и СПбГУ.

ИССЛЕДОВАНИЕ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВА ENaC И ИХ СВЯЗИ С ДИНАМИКОЙ АКТИНА В КЛЕТКАХ ЛИНИИ U937 И M-1. © А. В. Сударикова,¹ А. С. Кириюшкин,¹ Д. В. Илатовская,^{1,2} Е. А. Морачевская,¹ Ю. А. Негуляев.¹ ¹ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, anastasia.sudarikova@gmail.com, и ² Медицинский колледж Висконсина, США.

Одной из важнейших клеточных систем, структурно и функционально связанных с работой ионных каналов плазматической мембраны, является актиновый цитоскелет. Как показано ранее, активация и инактивация потенциалнезависимых натриевых каналов в клетках лейкемии человека K562 контролируется процессами разборки и сборки примембранных микрофиламентов (Negulyaev et al., 2000; Schumilina et al., 2003). Основная цель настоящей работы — исследование функциональных свойств натриевых каналов в клетках лимфомы U937 и собирательных трубочек почки M-1, оценка связи каналов с динамикой актина. В экспериментах патч-кламп на клетках U937 обнаружена активация натриевых каналов (проводимость 11—12 пСм) при действии деструктора актиновых филаментов цитохалазина Д (10 мкг/мл). Добавление к цитоплазматической стороне мембранного фрагмента (конфигурация inside-out) G-актина, который полимеризуется при повышении ионной силы раствора, приводило к инактивации каналов. Эти данные указывают на сходство цитоскелетзависимой регуляции натриевых каналов в клетках U937 и K562.

С помощью ОТ-ПЦР и ингибиторного анализа показано, что амилорид-нечувствительные натриевые каналы в клетках K562 и U937, вероятно, принадлежат к семейству ENaC. В целом наблюдаемый феномен роста активности натриевых каналов клеток K562 и U937 при действии цитохалазина близок к аналогичным эффектам, описанным для натриевых каналов апикальных мембран почечного эпителия ENaC (Cantiello et al., 1991; Prat et al., 1993; Kapushev et al., 2010). Однако, несмотря на обилие данных, полученных за последние десятилетия, конкретные механизмы регуляции каналов ENaC с участием микрофиламентов остаются неясными. На основании результатов, полученных на клетках K562 и U937, мы предположили, что активация (открытие) каналов ENaC происходит при разборке кортикального цитоскелета, а сборка актина приводит к инактивации (закрыванию) каналов. Для проверки нашей гипотезы проведены эксперименты inside-out на клетках линии M-1 с использованием глобулярного (G) актина. Клетки собирательных трубочек почки M-1, в которых экспрессируются каналы ENaC, являются одной из распространенных моделей для исследования их активности. Однако, исследуя эндогенную активность каналов в клетках M-1, мы обнаружили широкий набор катионных каналов различной проводимости и селективности. Среди них наблюдались каналы, подобные семейству TRPC, а также каналы с проводимостью 12—14 пСм, кинетические свойства которых позволяли отнести их к ENaC. При подаче цитохалазина Д наблюдали повышение вероятности открытого состояния каналов как в экспериментах на участке мембраны нативной клетки (cell-attached), так и на изолированных мембранных фрагментах (inside-out). В серии проведенных экспериментов inside-out не выявлено инактивации эпителиальных натриевых каналов при полимеризации актина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00995а) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦИТОЛИЗА МОНОСЛОЙНЫХ КУЛЬТУР ГЕПАТОМ СПЛЕНОЦИТАМИ КРЫС. © Н. П. Терюкова, О. Н. Погодина, Г. И. Блинова, В. А. Иванов. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, npter@yandex.ru.

Для оценки цитотоксической активности естественных киллерных клеток (ЕКК) — эффекторных клеток (ЭК) естественного противоопухолевого иммунитета — в отношении опухолевых клеток-мишеней (КМ) разработаны разнообразные методы и подходы, основанные на применении радиоизотопов, проточной цитометрии, флуоресцентных меток, ферментов и пр. Выбор метода определяется задачами, возможностями и во многом — адгезионными свойствами КМ. Так, наиболее распространенный стандартный цитотоксический тест, основанный на использовании радиоактивного хрома, рекомендуется для работы с адгезионными и суспензионными КМ, поскольку оценивает цитотоксическую активность ЭК по выходу ^{51}Cr в инкубационную среду. В то же время при постановке ^3H -уридинового теста, применяемого в нашей лаборатории, уровень цитотоксичности определяется по соотношению радиоактивности в неповрежденных КМ в опыте и контроле, что сопряжено с методическими трудностями при работе с адгезионными культурами опухолевых клеток. В одной из первых работ с прикрепляющимися клетками МН-22а предлагалось на дно лунок пластиковых микропластинок помещать бумажный фильтр, который после совместной инкубации КМ и ЭК извлекать вместе с надосадочной жидкостью и использовать для измерения радиоактивности неповрежденных КМ (Малыгин, Апреликова, 1982). Удачной альтернативой такому подходу является морфометрический анализ цитолиза, который разработан именно для адгезионных мишеней и основан на откреплении погибающей клетки от пластика (Geldhof et al., 2002). Задача нашей работы — изучение механизмов киллинга клеток монослойных культур гепатом крысиными спленоцитами (Терюкова и др., 2009, 2011), в составе которых ЕКК являются основными исполнителями функций ЭК естественного иммунитета. Ранее с помощью морфометрического анализа нами установлено, что спленоциты крыс индуцируют гибель клеток крысиных гепатом, причем киллинг клеток гепатомы НТС осуществляется путем классического апоптоза, а гепатомы Зайдела — с помощью перфорин-гранзимного механизма. При этом в ответ на введение животным противоопухолевого цитостатика циклофосфида (ЦФ) на фоне выраженной спленопатии активность ЭК в отношении клеток гепатомы НТС возрастает, а гепатомы Зайдела — подавляется. В настоящей работе с помощью спленоцитов, обработанных 0.5%-ным параформальдегидом, показано, что спленоциты крыс поражают клетки мышинной гепатомы МН-22а посредством обоих механизмов киллинга, причем около 70 % активности приходится на апоптоз. Более того, как и в случае гепатомы НТС, гибель клеток гепатомы МН-22а под воздействием спленоцитов крыс, инъекционных ЦФ, достоверно увеличивается. Иная картина складывается с другим противоопухолевым препара-

том — 5-фторурацилом, введение которого крысам не приводит к активации киллинга КМ, и отмечается тенденция к снижению активности спленоцитов в отношении всех трех линий гепатом. Другой рассмотренный нами вопрос касается участия опухолеассоциированных антигенов в цитолитическом процессе. С этой целью клетки гепатомы Зайдела обрабатывали опухолеспецифической иммуносывороткой, которая наиболее активно реагирует с компонентом 57 кДа, идентифицированным ранее как протеин дисульфидизомеразы (PDI) A1, или ингибитором PDI — 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБ). Предобработка клеток гепатомы Зайдела иммуносывороткой на 9—20 % подавляет лизис КМ, а ДТНБ — на 17 %. Локализованный на поверхности клеток PDI участвует в изомеризации дисульфидных связей экзофациальных белков и может быть вовлечен в процесс конъюгации ЭК с КМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-0115-а).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА IN VITRO. © Н. П. Терюкова, Г. И. Блинова, В. А. Иванов. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, npter@yandex.ru.

Перевиваемые асцитные гепатомы Зайдела — штаммы С и D — индуцированы у крыс, содержащихся на диете с добавлением 4-диметиламиноазобензола. В асцитной жидкости животных обнаружены островки (кластеры) из 2 клеток и более, причем «некая синхронность, гомогенность активности островка» может быть связана «с клоновым характером островка» (Зайдела, 1963). Задача исследования — изучение биологии клеток гепатомы Зайдела и выяснение природы клеточных кластеров. В результате многократных пассажей in vitro клеток штамма С гепатомы Зайдела и селекции прикрепляющихся клеток от флотирующих получены 2 линии клеток — монослойная и суспензионная. Белки плазматических мембран разделяли методом SDS-электрофореза и после переноса на нитроцеллюлозу обрабатывали опухолеспецифической иммуносывороткой, полученной против фракции плазматических мембран клеток первичной культуры гепатомы Зайдела и тщательно истощенной гомогенатом печени интактных крыс. По данным иммуноблоттинга, иммуносыворотка практически не связывается с белками высокодифференцированных клеток — интактных гепатоцитов, но активно взаимодействует с компонентами наружных мембран суспензионной культуры — опухолеассоциированными антигенами с мол. массами 45, 57, 80 и 130 кДа, идентификация которых была проведена ранее методом масс-спектрометрии; в монослойной культуре клеток существенно снижается синтез опухолеассоциированных компонентов с мол. массой 80 кДа (включает в себя α -фетопротейн и GRP78) и 130 кДа (β 1-интегрин). Иммуносыворотка также связывается с двумя высокомолекулярными компонентами плазматических мембран клеток суспензионной культуры, один из которых с мол. массой более 300 кДа в адгезионных клетках отсутствует. Подавление экспрессии ряда опухолеассоциированных антигенов в прикрепляющихся клетках, т. е. сдвиг антигенного спектра в сторону высокодифференцированных гепатоцитов, свидетельствует о более высоком уровне их

дифференцировки по сравнению с клетками флолирующих островков. Для определения туморогенности клеточных линий клетки суспензионной культуры вводили интраперитонеально 6 животным в диапазоне от $12 \cdot 10^6$ до $0.5 \cdot 10^6$ кл. на крысу. В результате развития опухолей на 9—13-е сут наблюдалась 100%-ная гибель животных, тогда как введение клеток монослойной культуры — $12 \cdot 10^6$ и $17 \cdot 10^6$ — не привело к образованию асцита. Полученные данные указывают на высокую злокачественность и низкий уровень дифференцировки клеток суспензионной культуры. Проведено клонирование клеток флолирующих островков. Для этого клетки дезагрегировали и сеяли в лунки 96-луночных планшетов из расчета 1 кл. на лунку. Лунки просматривали на 2-е и 3-и сут после посева, отмечая лунки, содержащие не более 1 клетки, и продолжали наблюдать за их судьбой, фиксируя образующиеся клоны с помощью цифровой камеры. Наряду с гибелью части клеток обнаружено развитие клонов 3 типов — сферических, монослойных компактных и монослойных, образованных широко распластанными клетками. В итоге получены 3 клональные линии, 2 из которых — 4G и 10E — в результате развития монослойных компактных клонов, при разрастании которых в среду отделялись флолирующие группы клеток, возможно в результате спонтанного шеддинга (shedding), т. е. схода опухолевых клеток с поверхности пластика. Третья клональная линия — 1С — возникла при разрастании сферического клона, часть клеток которого на 9-е сут после посева стала прикрепляться и распластываться при активной пролиферации флолирующих многоклеточных кластеров. Интраперитонеальное введение 2 крысам клеток линии 1С в дозе 10^7 привело к развитию асцитной опухоли и гибели 1 крысы на 16-е сут.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-0115-а).

ПОВЕДЕНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НЕЙРАЛЬНЫХ КЛЕТОК РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЭМБРИОНОВ КРЫС ЛИНИИ WISTAR ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В РАЗНЫХ СРЕДАХ. © Н. П. Токмакова, Т. В. Васильева. Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, nrtokmak@mail.ru.

В работе для культивирования были взяты отделы головного мозга — средний мозг, обонятельные луковицы и кора эмбрионов крыс. Культивирование нейральных клеток различных отделов эмбрионального головного мозга крыс проводили в культуральных матрасах без подложек при использовании среды DMEM с содержанием сыворотки 12 % и без ростовых факторов и в специальной среде Neurobasal с добавлением ростовых факторов EGF и FGFb. Культуральный прижизненный материал анализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 510 Meta (Carl Zeiss).

После посева в течение 1-х сут морфология и поведение нейральных клеток среднего мозга, обонятельные луковицы и кора эмбрионов крыс оказываются сходными при культивировании в разных средах. Клетки имеют округлую форму. В центре клеток располагаются ядра с ядрышком, окруженные небольшим слоем цитоплазмы. На 3-и сут культивирования выявлялись клетки различной морфологии: недифференцированные ошаренные

нейральные клетки, не прикрепленные к субстрату и клетки, вступившие на путь дифференцировки. По мере дифференцировки клетки принимали вытянутую форму и формировали небольшие поля дифференцированных клеток. Отдельные ошаренные клетки, адгезируя друг с другом, образовывали конгломераты, состоящие из 3—15 недифференцированных клеток. На 3-и сут культивирования были выявлены нейросферы на разной стадии развития. Одни нейросферы имели шаровидную форму и состояли из недифференцированных клеток, в других на периферии около недифференцированных клеток формировался темный слой в виде базальной мембраны. При прикреплении нейросфер к культуральному пластику матрасов происходило разрушение межклеточных контактов, целостности базальной мембраны, устанавливалась связь клеток с субстратом. При культивировании клеток в среде DMEM с 12%-ной сывороткой наблюдается миграция клеток из нейросфер с последующей их пролиферацией и размножением. По степени миграции дифференцированных клеток из нейросфер условно выделили несколько стадий: начальная стадия миграции единичных дифференцированных клеток; прекофлюэнтная стадия развития — вокруг внешнего слоя клеток нейросферы появляются множественные дифференцированные клетки; кофлюэнтная стадия развития нейросфер — дифференцированные клетки образуют сплошной монослой вокруг нейросферы, заполняя постепенно всю площадь матраса. При культивировании клеток в среде Neurobasal с добавлением ростовых факторов EGF и FGF наблюдаются дифференцировка клеток нейросфер и их выход, но кофлюэнтной стадии они не формируют.

В работе проводили оценку уровней ploидности культивируемых клеток. Изменение уровня ploидности является признаком злокачественной трансформации клеточной культуры, поэтому сохранение стабильного диплоидного кариотипа является важной характеристикой нормальных клеток. На 20-е сут культивирования в культуре среднего мозга и обонятельных луковиц, коры появляется небольшая доля (5—10 %) тетраплоидных и октаплоидных (2—3 %) клеток. Выявление ядер с массой ДНК $4c$ может свидетельствовать о том, что часть культивируемых клеток сохраняет способность к пролиферации и перед митозом происходит удвоение массы ДНК ($2n4c$). В то же время появление в диплоидной популяции среднего мозга и обонятельных луковиц нейральных клеток с уровнями ploидности $4c$ и $8c$ может быть и следствием аномальных митозов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ БЕЛКОВ НА ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ ТРОФОЦИТОВ ЯИЧНИКОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПРОСТРАНСТВЕННУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ЯДРА. © К. Е. Усов,¹ Е. Н. Андреева,² И. Э. Вассерлауф,¹ В. Н. Стегний.¹ ¹ Томский государственный университет, usovke@rambler.ru, и ² ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск.

Проблема пространственной организации интерфазного ядра является одной из ключевых в современной генетике. Известно, что в результате осуществления двух типов связей (межхромосомные связи и связь хромосом с ядерной оболочкой) достигается пространственная упорядоченность ядра (Прокофьева-Бельговская, 1986; Стег-

ний, 1993). *D. melanogaster* является удобным объектом для изучения вопросов, касающихся пространственной организации ядра. Было показано, что особое значение имеет исследование архитектуры ядер именно в генеративной клеточной системе (Стегний, 1979, 1993, 2006). Архитектура ядер трофоцитов *D. melanogaster* видоспецифична и определяется взаимоотношением хромосом между собой и главным образом с ядерной оболочкой. Ранее было установлено, что прицентромерные районы политенных хромосом трофоцитов яичников *D. melanogaster* (линия Canton'S) имеют контакты с ядерной оболочкой (Стегний, Вассерлауф, 1994). Однако это было показано лишь на уровне световой микроскопии, и четко определить эти районы хромосом, имеющие связь с ядерной оболочкой, не представлялось возможным. Основной задачей работы было показать и подтвердить наличие контактов прицентромерных районов хромосом трофоцитов с ядерной оболочкой у *D. melanogaster*. В качестве объекта в настоящем исследовании была использована мутантная линия *otu*[11] *Drosophila melanogaster*, так как у мух, гомозиготных по ней, в трофоцитах яичников развиваются политенные хромосомы с хорошо развитой дисковой исчерченностью. В результате иммунофлуоресцентной локализации антител против белка ламина Dm0 в псевдопитающих клетках яичников мутантной линии *otu*[11] *Drosophila melanogaster* удалось выявить ядерную оболочку. В свою очередь иммунофлуоресцентная локализация антител против белка HP1 в псевдопитающих клетках яичников позволила выявить прицентромерные районы хромосом XL, 2L, 2R, 3L и 3R. В результате анализа полученных данных было установлено, что политенные хромосомы псевдопитающих клеток яичников мутантной линии *otu*[11] *Drosophila melanogaster* располагаются на периферии ядра и прицентромерные районы всех хромосом контактируют с ядерной оболочкой.

Кроме того, была изучена пространственная ассоциация прицентромерных районов хромосом XL, 2 и 3 в ядрах псевдопитающих клеток яичников *Drosophila melanogaster* (линия *otu*[11]) на разных стадиях эндорепликации. В результате установлено, что на более ранних стадиях эндорепликации выявляется следующий тип ассоциаций — прицентромерные районы хромосом 2 и 3 располагаются рядом друг с другом, а прицентромерный район XL-хромосомы расположен обособленно в пространстве ядра. В то же время на более поздних стадиях эндорепликации прицентромерный район XL-хромосомы располагается рядом с прицентромерным районом хромосомы 3, а прицентромерный район хромосомы 2 расположен обособленно в пространстве ядра. Таким образом, на разных стадиях эндорепликации наблюдается динамика в пространственной ассоциации прицентромерных районов хромосом XL, 2 и 3, вероятно, это имеет какое-то функциональное значение и может послужить основой для проведения дальнейших исследований в этом направлении.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ХЕМОТАКТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И ТЕМПЫ РОСТА ИНФУЗОРИЙ *DILEPTUS ANSER*. © З. И. Успенская,¹ К. В. Деркач,² А. Л. Юдин,¹ А. О. Шнаков.² ¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, alyudin@mail.ru, и ² ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург.

Одними из регуляторов физиологических и биохимических процессов у одноклеточных эукариот являются природные аминокислоты и их производные, как это показано нами для свободноживущих инфузорий *Dileptus anser* и *Tetrahymena pyriformis* и другими авторами для гриба *Cryptococcus neoformans*. На основе скрининга природных аминокислот и их производных было показано, что у инфузории *D. anser* активность фермента аденилатциклазы (АЦ) в значительной степени стимулируется метионином, глицином, аланином, тирозином, аргинином и в меньшей степени триптамином и гистидином, в то время как активность фермента гуанилатциклазы (ГЦ) стимулируется триптамином, триптофаном, лейцином, глутаминовой кислотой, серином, цистеином, гистидином и аланином. Мы предположили, что некоторые из этих аминокислот способны влиять на хемотаксис инфузорий и темпы их деления. Цель предпринятого исследования состояла в проверке этого предположения.

Изучение хемотактической активности аминокислот в культуре инфузорий *D. anser* показало, что отчетливо выраженные свойства хемоаттрактантов проявляют аланин и гистидин, менее выраженные — глицин. Поскольку эти аминокислоты наряду с хемотактической активностью стимулируют активность АЦ и ГЦ *D. anser*, есть основания полагать, что одним из молекулярных механизмов, вовлеченных в хемотактический ответ инфузорий, является регуляция ими активности ферментов-циклаз, как это имеет место у некоторых других одноклеточных в отношении цАМФ и фолиевой кислоты, активаторов АЦ и ГЦ. Установлено, что триптами, аланин, гистидин и в меньшей степени аргинин и триптофан (10^{-6} — 10^{-4} М) дозозависимым способом повышают темпы деления инфузорий. При этом если в случае действия триптамина и гистидина значительное увеличение темпов деления клеток наблюдали на 2-е и 3-и сут с последующим снижением до уровня в контроле, то аланин во всем диапазоне изученных концентраций отчетливо повышал темпы деления инфузорий уже в 1-е сут опыта. При этом аминокислоты, которые не стимулируют активность АЦ и ГЦ, были не способны влиять и на рост инфузорий. Эти данные указывают на то, что регулируемые природными аминокислотами сигнальные каскады, включающие в себя в качестве эффекторных звеньев ферменты с циклазной активностью, могут быть вовлечены в ростовую активность инфузорий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00692).

РЕГУЛЯЦИЯ NMDA-РЕЦЕПТОРАМИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ Th, У БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ. © У. Ш. Фаткуллина,¹ С. М. Фаррахова,² К. З. Бахтиярова,² Ю. В. Вахитова.¹ ¹ ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, juvv73@gmail.com, и ² ГБУЗ РКБ им. Г. Г. Куватова, Уфа.

Среди иммуновоспалительных заболеваний ЦНС рассеянный склероз (РС) привлекает внимание исследователей в связи с широкой распространенностью заболевания, поражением лиц молодого трудоспособного возраста и ранней инвалидизацией больных (Гусев, 2001).

В патогенезе хронического воспалительного и аутоиммунного процессов значительная роль отводится дисбалансу субпопуляций Th1/Th2. Считается, что формирование хронического патологического процесса в мозге при РС определяется избыточной продукцией провоспалительных цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-1, IL-2, IL-12 и т. д.). Повышенная секреция этих цитокинов субпопуляцией Th1 при РС сочетается со снижением синтеза противовоспалительных цитокинов (IL-5, IL-10, IL-13, IL-4 и т. д.), продуцируемых субпопуляцией Th2. Помимо аутоиммунных механизмов значительная роль в токсическом поражении нейронов отводится глутамату, который образуется в больших количествах в мозге под влиянием провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α) и энцефалитогенных Т-лимфоцитов, индуцирующих воспаление в ЦНС при РС (Takahashi et al., 2003). Отметим, что в последние годы возрастает интерес к исследованию роли возбуждающих аминокислот, в частности глутамата и его рецепторов, в патогенезе РС (Bolton, Paul, 2006). Нами изучена зависимость от NMDA-рецепторов экспрессия генов транскрипционных факторов, контролирующих дифференцировку субпопуляций CD4 $^{+}$ -клеток у больных РС. Как известно, транскрипционные факторы GATA3, TBX21 и FOXP3 ответственны за дифференцировку субпопуляций CD4 $^{+}$ -клеток Th2, Th1 и Treg соответственно. Т-лимфоциты выделяли из периферической крови условно здоровых доноров (группа сравнения) и больных РС. Т-лимфоциты стимулировали PMA (25 нг/мл) и иономицином (1 мкг/мл) в течение 2 ч, одновременно в среду добавляли неконкурентный антагонист NMDA рецепторов (+)-MK801 (100 мкМ). Уровень мРНК соответствующих генов транскрипционных факторов оценивали методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Как следует из полученных нами данных, в стимулированных Т-лимфоцитах доноров — больных РС — при действии (+)-MK801 наблюдается снижение экспрессии генов транскрипционных факторов GATA3 в 3 раза, TBX21 в 2 раза и FOXP3 в 3 раза по сравнению с Т-лимфоцитами здоровых доноров. Кроме того, в лимфоцитах больных РС выявлено нарушение баланса Th1/Th2 в сторону субпопуляций Th1, о чем судили по изменению соотношения экспрессии TBX21/GATA3. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об участии NMDA-рецепторов в направленной регуляции экспрессии генов транскрипционных факторов, контролирующих дифференцировку CD4 $^{+}$ -Т-клеток у больных РС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований—Поволжье (проект 11-04—97093).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРОСПИДИНА В МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА МЫШАХ. © Н. А. Филатова,¹ Н. А. Князев,¹ А. А. Кладиев,² В. А. Иванов.¹
¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, p_filat@mail.ru, и ² ООО «Биотехнологическая компания ТНК», Москва.

В экспериментах *in vivo* изучали противоопухолевое действие проспирина (N,N'-бис(γ-хлор-β-оксипропил)-N',N'' диспиротрипиперазинил дихлорида) — оригинального отечественного препарата, относящегося к алкилирующим соединениям. Противоопухолевая ак-

тивность проспирина была изучена на линейноспецифической гепатоме 22а, являющейся субштаммом гепатомы 22, индуцированной ортоаминоазотолуолом у мышей СЗНА В. И. Гельштейн в 1951 г. По данным цитологического изучения, это опухоль гепатоцеллюлярного происхождения, относящаяся к анапластическим карциномам. О влиянии препарата на опухоль судили по скорости ее роста, измеряя объем в разные сроки после трансплантации мышам СЗНА, оценивали продолжительность жизни животных с опухолью, а также регистрировали количество излечившихся животных. После трансплантации мышам СЗНА 2 · 10⁵ клеток гепатомы 22а подкожно в область спины на 10-е сут опухоль появилась у 100 % животных, затем различным группам опытных мышей внутрибрюшинно трехкратно вводили проспирин по 10—250 мг на 1 кг массы соответственно. При таком способе и дозе введения препарата все животные выживали, гибель начиналась только с дозы 500 мг на 1 кг массы. Контрольным мышам вводили физиологический раствор в том же объеме. Наиболее эффективным препарат оказался в дозе 250 мг на 1 кг при трехкратном введении. Излечение от появившейся опухоли (полное ее рассасывание) наблюдалось у 60 % мышей. К концу срока наблюдения на 40-е сут после трансплантации клеток гепатомы 22а, когда в контрольной группе погибло 80 % животных-опухоленосителей, во всех опытных группах животные были живы. Торможение роста опухолей, а у некоторых мышей и полное их рассасывание наблюдались начиная с 5-х сут после начала инъекций. Размер опухоли у оставшихся неизлеченными опухоленосителей на 15-е сут наблюдений был в 12 раз, а к концу срока наблюдений на 40-е сут — в 26 раз меньше, чем у животных контрольной группы. Результаты опытов показали, что проспирин обладает отчетливой противоопухолевой активностью.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01152-а).

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ВНЕ- И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕАСОМ ПРИ ГЕНОТОКСИЧЕСКОМ СТРЕССЕ В КЛЕТКАХ K562. © А. С. Цимоха,¹ Ю. Я. Зайкова,^{1,2} Н. А. Барлев.¹ ¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru, и ² С.-Петербургский государственный политехнический университет.

Большинство процессов в клетке находится под контролем убиквитин-протеасомной системы за счет избирательной деградации ключевых белков-регуляторов. Протеолитическим ядром этой системы является протеасома. Протеолитическим «ядром» этой системы является белковый комплекс — 26S протеасома, часто называемый просто протеасома. Ранее было обнаружено, что эукариотические клетки способны выделять как в культуральную среду, так и в межклеточное пространство протеасомы. Мы показали, что протеасомы, покидая клетку, сохраняют свои основные им субъединичный состав и ферментативные активности, однако активности внеклеточных протеасом отличаются от таковых внутри клетки. Кроме того, изменения в активностях внутри- и внеклеточных протеасом при индукции апоптоза также различны, что предполагает рассматривать экскрецию определенной

популяции протеасом из клеток как часть регулирующего механизма, управляющего внутриклеточной деятельностью этих частиц. Исследуя экскрецию протеасом трансформированными и нетрансформированными клетками линий человека K562 и ДМЕ/F12 (мезенхимные клетки человека), мы показали, что усиленный выход протеасом во внеклеточное пространство не является особенностью трансформированных клеток, поскольку оказалось, что этот процесс, по всей видимости, постоянный и характерен как для трансформированных клеток, так и для нормальных. Однако следует отметить, что рассматриваемый процесс, по всей видимости, является регулируемым. Так, воздействие диэтилмалата на клетки K562 в течение 1 ч ингибировало выход протеасом из клеток в культуральную среду, в то время как доксорубин не оказывал никакого влияния.

Принято считать, что активность и стабильность белка, так же как его функционирование в клетке, в основном определяются за счет его посттрансляционных модификаций. Для исследования посттрансляционных модификаций субъединиц протеасом проводили двумерное электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях с последующим анализом с помощью тандемной масс-спектрометрии и Вестерн-блот-анализом с применением специфических антител против отдельных субъединиц протеасом. Мы показали, что паттерн посттрансляционных модификаций внеклеточных протеасом более разнообразен, чем таковой у внутриклеточных комплексов из клеток линии K562. Кроме того, внеклеточные протеасомы, очищенные из культуральной среды контрольных и индуцированных к апоптозу клеток, также различаются по своему составу. Результаты масс-спектрометрического исследования показали, что субъединицы внеклеточных протеасом значительно более убиквитинированы, чем белки внутриклеточных протеасом. Кроме того, интересен тот факт, что мы наблюдаем разное соотношение 20S и 26S протеасом внутри и вне клетки. Важно подчеркнуть, что внутри- и внеклеточные популяции протеасом различаются также ассоциированными с ними белками, что, возможно в совокупности с убиквитинированием, определяет выход протеасом из клетки.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01234) и в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (№ 16.740.11.0366) и «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России» на 2007—2013 гг. (№ 16.512.11.2242).

ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СТАБИЛЬНОСТИ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. © В. О. Чагин, Н. М. Плескач, Г. А. Сакута, Ю. М. Розанов. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Культуры клеток широко используют в качестве экспериментальных систем для изучения биологических процессов, протекающих *in vivo*, или для получения аллотрансплантатов для лечения. В данной работе мы применили проточную ДНК-цитометрию для мониторинга стабильности культур первичных фибробластов чело-

века. Исследованы изменения диплоидного индекса культур фибробластов, полученных в результате механической или ферментативной дезинтеграции кожи, при длительном культивировании и после криоконсервации. При тех же условиях окраски измерены ДНК-индексы культур клеток, выделенных из костного мозга человека, и клеток постоянных (трансформированных) клеточных линий человека с диплоидным набором хромосом.

Результаты. 1. Измеряемый ДНК-индекс для фибробластов не соответствует ожидаемому значению для генома человека и превышает его на 1.0—1.5 %. Различие ДНК-индексов мужских и женских линий соответствует различию в содержании ДНК между хромосомами X и Y. 2. Измеряемые индексы для культур фибробластов, полученных ферментативным или миграционным способом, достоверно различаются. 3. Аликвоты одной клеточной линии при переводе в культуру после криоконсервации могут давать различные значения индекса. 4. При длительном (более 20 пассажей) культивировании фибробластов может происходить скачкообразное увеличение измеряемого ДНК-индекса без изменения кариотипа. 5. Данное изменение ДНК-индекса связано с изменением фенотипа фибробластов по принципу «старый» => «молодой» в отношении размера клеток и скорости удвоения клеток в культуре. 6. ДНК-индексы для фибробластов, полученные с использованием разных ГЦ-специфичных красителей (оливомицина или митромицина), существенно различны. В то же время ДНК-индексы клеток постоянных клеточных линий, полученные при окраске оливомицином или митромицином, не различаются. После скачкообразного увеличения ДНК-индекса фибробластов, наблюдаемого при длительном культивировании, рассматриваемое различие достоверно уменьшается.

Выводы. При культивировании клеток *in vitro* происходит увеличение количества ядерной ДНК или(и) изменение цитохимических свойств хроматина без изменения кариотипа. Наблюдаемые изменения ДНК-индекса при длительном культивировании клеток *in vitro*, возможно, представляют собой ранний маркер трансформации первичных фибробластов, переведенных в культуру.

АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ mTOR В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ. © М. Ю. Черепкова,¹ Г. С. Синева, В. А. Поспелов. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ¹maria.cherepkova@gmail.com.

Киназа mTOR (mammalian target of rapamycin) играет важную роль в регуляции роста клеток, трансляции, аутофагии и клеточного цикла. mTOR может находиться в клетке в составе двух комплексов — mTORC1, который позитивно регулирует уровень трансляции в клетке, фосфорилируя киназу рибосомального белка S6 (S6K1) и ингибитор инициации трансляции 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1), и mTORC2, функции которого не так хорошо изучены. Известно, что его мишенью является PKB (protein kinase B)/Akt. mTOR-киназа играет роль и в регуляции самообновления и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Модуляция активности mTOR-содержащих комплексов влияет на запуск дифференцировки, а также эффективность репрограммирования соматических клеток в ЭСК-подобные (получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток).

При дифференцировке ЭСК мыши происходит накопление фосфорилированных форм белков PKB/Akt (Ser 473) — мишени mTORC2 — и 4EBP-1 (Thr 37/36) — мишени mTORC1. Таким образом, дифференцировка сопровождается повышением активности обоих комплексов mTOR. Обработка недифференцированных мЭСК рапамицином, специфическим аллостерическим ингибитором mTORC1, подавляет прирост клеточной популяции и снижает клональную выживаемость недифференцированных ЭСК. Однако рапамицин не влияет на распределение клеток по фазам клеточного цикла, и только при использовании высоких концентраций рапамицина наблюдается небольшое накопление клеток в фазе G₁. В то же время обработка ЭСК мыши каталитическим ингибитором mTOR-киназы PP242, который ингибирует работу обоих комплексов, значительно снижает скорость прироста клеточной популяции и полностью отменяет клональную выживаемость ЭСК мыши. При этом происходит накопление ЭСК в G₁-фазе клеточного цикла. Эти данные свидетельствуют о том, что функции комплекса mTORC2 являются более значимыми для выживания и пролиферации недифференцированных ЭСК мыши, чем активность mTORC1. Чувствительность к рапамицину ЭСК приобретали лишь при дифференцировке, и культивирование этих клеток в среде без LIF (leukemia inhibitory factor) и в присутствии рапамицина вызывало массовую гибель клеточной популяции. Таким образом, активность mTORC1 необходима для дифференцировки ЭСК мыши.

Известно, что пути Wnt и mTOR взаиморегулируют друг друга на нескольких уровнях. GSK3 может подавлять активность mTORC1 за счет фосфорилирования TSC2. В свою очередь mTOR может регулировать транскрипцию Wnt-зависимых генов: обработка ЭСК человека рапамицином вызывает активацию бета-катенин/Tcf-зависимой транскрипции и запуск экспрессии генов-маркеров мезодермы и эндодермы. С помощью временной трансфекции в ЭСК мыши репортерной конструкции, несущей ген люциферазы под контролем Tcf-связывающих элементов, мы показали, что трансактиваторная активность бета-катенина не повышается при действии рапамицина или PP242. Это подтвердили данные обратной транскрипции с последующей ПЦР на продукт гена-мишени Wnt-сигнального пути *Axin2*. Таким образом, в ЭСК мыши активность комплекса mTORC1 не влияет на трансактиваторную функцию бета-катенина.

ИНДУКЦИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ГЛИОМЫ U251 ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ФЕТАЛЬНЫМИ МЕЗЕНХИМНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА FETMSC. © И. А. Чистякова,¹ Н. Ю. Басанцова,² А. Ф. Гурчин,³ Г. П. Пинаев.¹
¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ichi_spb@yahoo.com, ² С.-Петербургский государственный университет и ³ ФГБУН Институт мозга человека РАН, Санкт-Петербург.

Злокачественная глиома является самой распространенной и агрессивной опухолью головного мозга. Традиционная комбинированная терапия злокачественных глиом, включающая в себя радио- и химиотерапию, продолжает оставаться малоэффективной. В связи с этим возникает необходимость в разработке альтернативных способов лечения этого вида опухолей. Клеточная

терапия, основанная на применении мезенхимных стволовых клеток (МСК), может стать такой альтернативой. МСК секретируют большой набор цитокинов и проявляют иммуномодуляторные свойства. Недавно были продемонстрированы цитотоксичность МСК пуповинной крови для клеток злокачественных глиом *in vitro* и торможение роста данной опухоли *in vivo* при внутривенном введении МСК. Было показано, что цитотоксические эффекты МСК пуповинной крови на клетки глиом опосредуются как межклеточными контактами, так и белками иммунного ответа, секретируемыми мезенхимными клетками.

В нашей предыдущей работе был обнаружен феномен «инкапсуляции» в смешанной культуре клеток глиомы U251 и МСК, полученных из костного мозга взрослого человека. В определенных условиях мезенхимные клетки инкапсулировали островки глиомных клеток, предотвращая таким образом их разрастание. Однако пролиферативная активность клеток глиомы сохранялась на прежнем уровне. Так как МСК, полученные из разных источников, различаются по набору секретируемых цитокинов, мы предприняли попытку получения дополнительных эффектов при культивировании клеток U251 совместно с клетками неиммортилизованной линии FetMSC, полученной из костного мозга 5—6-недельного зародыша. Сокультивирование привело к блоку пролиферации и определенной морфологической трансформации клеток глиомы. Такие изменения претерпевали даже клетки, образующие плотный монослой, при расщепе FetMSC и U251 в разных половинах чашки Петри. Пролиферативная активность FetMSC также значительно снижалась. Первые эксперименты по иммуноцитохимическому окрашиванию на маркерные белки выявили инициацию мультипотентной дифференцировки клеток глиомы U251 в нейроглиальном и мезенхимном направлениях. Так, были обнаружены изменения в экспрессии и локализации маркера астроглиальной дифференцировки — GFAP (glial fibrillary acidic protein). В части клеток наблюдалась повышенная экспрессия β-тубулина III — маркера нейрональной дифференцировки — и мышечного α-актина — маркера мезенхимной дифференцировки.

Мы не наблюдали формирования выраженной капсулы FetMSC вокруг групп клеток глиомы U251, как в случае сокультивирования с МСК из костного мозга взрослого человека. Однако в условиях превалирования FetMSC также наблюдалась картина ограничения отдельных групп морфологически измененных клеток глиомы тяжами из мезенхимных клеток. По-видимому, белки внеклеточного матрикса, секретируемые одними клетками, обладают аттрактивными свойствами по отношению к другим клеткам, так как U251 и FetMSC не распространялись в области расположения друг друга. В связи с полученными результатами неиммортиализованные линии фетальных МСК могут рассматриваться как возможный источник для клеточной терапии злокачественных глиом.

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ ЖЕСТКОСТИ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ЭКСТРАКЦИИ МЕМБРАННОГО ХОЛЕСТЕРИНА. © В. И. Чубинский-Надеждин,¹ И. А. Няпшаев,² Е. А. Морачевская,¹ А. В. Анкудинов.²
¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, vchubinskiy@gmail.com, и ² ФГБУН Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург.

Работа посвящена изучению роли мембранного холестерина в клеточной механике и регуляции механочувствительных ионных каналов — основных участников процессов механотрансдукции в живых клетках. Для оценки механических свойств плазматической мембраны был использован метод атомно-силовой микроскопии. Для уменьшения повреждающего воздействия на клетку использовали модифицированные зонды с прикрепленной к ним гранулой аморфного SiO_2 . Вычисление модуля Юнга живых клеток (оценка жесткости) проводили на основе модели Герца из записей силовых кривых. Механозависимые ионные токи регистрировали с помощью метода локальной фиксации потенциала (патч-кламп). В ответ на уменьшение гидростатического давления в регистрирующей стеклянной микропипетке наблюдали активацию механочувствительных (стретчактивируемых) каналов в участке клеточной мембраны.

Проведено сравнительное исследование изменений жесткости мембраны и характеристик механочувствительных каналов в различных условиях. Для частичной экстракции холестерина клетки обрабатывали акцептором стеролов метил-бета-циклодекстрином (МБЦД, 5 мМ, 1 ч). Для разрушения актинового скелета клетки с пониженным содержанием холестерина инкубировали с деструкторами актиновых филаментов латрункулином Б (10 мкМ, 30 мин) или цитохалазином Д (40 мкМ, 10 мин). Методом патч-кламп показано, что частичная экстракция мембранного холестерина приводила к подавлению активности механочувствительных каналов в клетках K562. Обнаружено, что обработка клеток МБЦД привела к снижению вероятности открытого состояния каналов и повышению уровня стимула, необходимого для их активации. Сопоставление результатов атомно-силовой микроскопии с электрофизиологическими экспериментами показывает, что подавление каналов было опосредовано повышением жесткости плазматической мембраны. Данные флуоресцентной микроскопии свидетельствовали о том, что инкубация клеток с МБЦД приводила к разрушению богатых холестерином липидных микродоменов и полимеризации актина в клетках K562. Обработка клеток с пониженным содержанием холестерина деструкторами актиновых филаментов приводила к восстановлению высокого уровня активности механочувствительных каналов. Таким образом, в основе изменений механических свойств мембраны клеток K562 и параметров активации механочувствительных каналов лежат процессы полимеризации актина, вызванные деструкцией липидных микродоменов после экстракции холестерина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований.

КЛЕТКИ ЦЕЛОМИЧЕСКОГО ЭПИТЕЛИЯ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS* L. СОХРАНЯЮТ ПОВЫШЕННУЮ ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ЛАМИНИНЕ. © Н. С. Шарлаимова, О. А. Петухова. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, nashar@yandex.ru.

Культивирование — один из методов, моделирующих процессы, происходящие *in vivo*, в частности процессы дифференцировки и трансдифференцировки. На сегодняшний день постоянных клеточных культур морских беспозвоночных не существует, однако широко

используются первичные культуры. Ранее показана повышенная по сравнению с *in vivo* ДНК-синтетическая активность клеток целомического эпителия (ЦЭ) при культивировании на гидрофильной поверхности культуральных плат и флаконов. При этом способностью включать BrdU в первичной культуре — характеристика малых эпителиоцитов (ЭЦ) с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением диаметром 4—6 мкм, формирующих колониоподобные агрегаты в ходе культивирования. Выявлена новая субпопуляция клеток ЦЭ (ЦЭ-с) морской звезды *Asterias rubens*, обогащенная малыми ЭЦ. Выявлено обогащение популяции клеток ЦЭ малыми ЭЦ через 1 ч прикрепления к ламинину (Лм). Целью работы является анализ поведения и пролиферативной активности клеток ЦЭ и ЦЭ-с при культивировании на Лм.

Суспензии клеток ЦЭ и ЦЭ-с наносили в 24-луночные пластины на покровные стекла, покрытые Лм, на 1 ч, после чего снимали неприкрепившиеся клетки и добавляли культуральную среду. Анализ пролиферативной активности проводили как для прикрепленных к Лм клеток, так и для клеток, открепившихся в процессе культивирования. Через 12 ч культивирования одиночные прикрепленные к Лм малые ЭЦ проявляют ДНК-синтетическую активность на более высоком уровне, чем наблюдали *in vivo*; доля этих клеток составляла 7.7—9.9 %. Через 5 сут культивирования малые ЭЦ диаметром 46 мкм формируют колониоподобные агрегаты. Доля клеток, включающих BrdU, составляет 20—35 %, причем высокая доля сохраняется по крайней мере в течение 1 мес. Клетки ЦЭ-с, выделенные через 5 ч после травмирования, характеризуются самой низкой пролиферативной активностью (3 %). Анализ пролиферативной активности клеток, открепившихся в ходе культивирования, показал, что способность включать BrdU — характеристика малых ЭЦ с плотно окрашиваемым DAPI ядром (2—3 мкм) и видимой цитоплазмой. Доля этих клеток ниже, чем в случае клеток, прикрепленных к ламинину, и достигает максимума 10 % для клеток ЦЭ, выделенных через 5 ч после травмирования. В ходе культивирования клетки этого типа теряют ДНК-синтетическую активность.

Анализ митотической активности после окраски клеток антителами к H3-фосфогистону подтвердил пролиферативную активность клеток ЦЭ при культивировании на Лм — через 12 ч после посева выявляли отдельные клетки, а через 5 и 21 сут после посева были выявлены окрашенные малые ЭЦ в колониоподобных агрегатах, прикрепленные к ЦЦ-подобным клеткам.

Таким образом, малые ЭЦ, выявленные ранее *in vivo*, сохраняют свою пролиферативную активность при культивировании на Лм, причем демонстрируют различный пролиферативный потенциал — прикрепленные к Лм клетки проявляют более высокую способность к делению в течение длительного времени. Морфологические характеристики этих клеток, пролиферативная активность и способность к формированию колониоподобных агрегатов свидетельствуют о том, что малые эпителиоциты обладают рядом свойств стволовых клеток и могут принимать участие в восполнении пула целомоцитов в ответ на травмирование животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 7852.2006.4) и гранта правительства Санкт-Петербурга в сфере научной и научно-технической деятельности 2011 г.

МИОГЕННЫЕ ПОТЕНЦИИ КЛЕТОК ИЗ ПЕЧЕНИ ЗАРОДЫШЕЙ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ IN VITRO И IN VIVO. © О. Н. Шевелева, О. В. Паюшина, Н. Н. Буторина, Т. М. Никонова, В. И. Старостин. ФГБУН Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, payushina@mail.ru.

Как было показано нами ранее, печень зародышей крысы содержит клетки-предшественники, экспрессирующие специфичный для скелетного миогенеза фактор транскрипции MyoD и спонтанно формирующие при культивировании in vitro многоядерные структуры с иммунофенотипическими признаками скелетных мышц. В настоящей работе проанализированы адгезивные свойства миогенных клеток зародышевой печени, исследованы функциональные характеристики образуемых ими миосимпласов и оценена способность к реализации миогенных потенциалов при трансплантации животным-реципиентам в диффузионных камерах. Клетки из печени 17-суточных зародышей крыс породы Wistar культивировали в течение 10—12 сут в среде DMEM с 10 % сыворотки плодов коровы в 12-луночных платах, покрытых фибронектином, коллагеном I типа или ламинином, либо в стандартных пластиковых платах без белкового покрытия. При культивировании на фибронектине или коллагене I типа численность образующихся миосимпласов значительно превышала таковую на пластике, что может свидетельствовать о высокой адгезивности содержащихся в печени миогенных предшественников к этим компонентам внеклеточного матрикса либо о стимулирующем влиянии последних на миогенную дифференцировку. В то же время ламинин не оказывал подобного эффекта. Для анализа сроков адгезии миогенных предшественников к субстрату суспензию клеток печени инкубировали в пластиковой плате в течение 1, 5 или 24 ч, после чего переносили в плату, покрытую фибронектином, и культивировали до образования миотуб, как и исходную пластиковую плату с прикрепившимися за этот срок клетками. Число миотуб, образованных клетками, прикрепившимися и не прикрепившимися к пластику за 1 или 5 ч, было сопоставимо, однако после 24 ч инкубации миогенные предшественники обнаруживались только среди прикрепившихся клеток. В ходе наблюдений за миосимпласами в первичных культурах клеток из печени зародышей было отмечено спонтанное сокращение некоторых из них. Функциональная полноценность миотуб подтверждена также результатами экспериментов по связыванию меченого α -бунгаротоксина, показавшими присутствие никотиновых холинорецепторов на их мембранах. Для анализа возможности спонтанной миогенной дифференцировки некультивированных клеток из зародышевой печени в условиях in vivo они были помещены в диффузионные камеры (10 млн клеток на камеру) и трансплантированы в перитонеальную полость половозрелых крыс. Положительным контролем служили клетки, выделенные из мышц задних конечностей зародышей того же срока развития и трансплантированные аналогичным образом в количестве 5 млн клеток на камеру. После 11 сут нахождения диффузионных камер в организме реципиента в них были обнаружены структуры, морфологически подобные формирующимся in vitro миотубам. В камерах, содержащих клетки из мышц зародышей, их количество было значительным, тогда как в камерах с клетками из печени присутствовали лишь единичные миотубоподобные структуры. Подтверждение их скелетно-мышечной

природы методами иммуногистохимического и молекулярно-генетического анализа станет предметом дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-00011).

ИССЛЕДОВАНИЕ ТУМОР-СУПРЕССОРНЫХ ПРОГРАММ СТАРЕНИЯ И АУТОФАГИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ ОБЛУЧЕНИЯ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ, УСТОЙЧИВЫХ К АПОПТОЗУ. © Ж. В. Шитикова, С. А. Гордеев, Т. В. Поспелова. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В работе исследовали возможность активации опухолевых супрессорных программ старения и аутофагии в клетках, устойчивых к апоптотической гибели в ответ на облучение. Исследование проводили на линии E1A+E1B 19 кДа, полученной из эмбриональных фибробластов крысы, путем введения района HindIII аденовируса человека типа V, кодирующего белки E1A и вирусный гомолог E1B 19 кДа антиапоптотического гена Bcl-2.

Мы показали, что рентгеновское излучение в дозе 6 Гр вызывает кратковременный G₂/M-блок клеточного цикла в клетках E1A+E1B 19 кДа. Согласно данным по включению бромдезоксипридина, после выхода из блока через 48 ч после облучения клетки исследуемой линии вновь начинают синтезировать ДНК, однако, по данным кривых роста, пролиферация в них не возобновляется до 7-х сут после облучения. В облученных клетках наблюдаются увеличение плоидности, появление ядер различной формы и блеббинг ядерной мембраны. В отсутствие цитокинеза происходит накопление клеток с гигантскими ядрами, плоидность которых не позволяет выявить их с помощью проточной цитометрии. Методом окраски ДНК по Фельгену и вычислением интегральной оптической плотности удалось определить, что к 10-м сут после облучения плоидность клеток может достигать 246n.

В исследуемых трансформантах через 10 сут после облучения происходит временная активация β -галактозидазы, ассоциированной со старением (SA- β -Gal), значительно снижающаяся к 20-м сут. Активация аутофагии после облучения коррелирует во времени с падением активности комплекса mTORC1, определяемой по уровню фосфорилирования его мишеней: рибосомного белка S6 и ингибитора инициации трансляции 4E-BP1. Одновременно с падением активности mTORC1 выявлено подавление активности комплекса mTORC2, согласно снижению фосфорилирования одной из его мишеней — киназы PKB/Akt по Ser473.

Долговременное, в течение 20 сут, наблюдение за облученными клетками показало, что исследуемая популяция выживает, преодолевая стадию гигантских многоядерных клеток и замещаясь одноядерными околодиплоидными клетками. Согласно анализу клеточной гибели с помощью окраски бромистым этидием и акридиновым оранжеем, количество гибнущих клеток увеличивается от $1.18 \pm 0.21\%$ в необлученном контроле до $12.5 \pm 3.8\%$ на 8-е сут после облучения, а затем к 10-м сут снижается до $6.8 \pm 0.7\%$ и на 20-е сут после облучения составляет $1.3 \pm 0.4\%$.

Установлено, что аутофагия может быть альтернативным апоптозу опухолевых супрессорных механизмов гибели

ли опухолевых клеток при действии ДНК-повреждения и стресса. Однако она играет двойственную роль в канцерогенезе, способствуя как гибели, так и выживанию опухолевых клеток. В устойчивых к апоптозу трансформантах E1A+E1B 19 кДа аутофагия, возникающая в ответ на облучение, может быть фактором, способствующим выживанию и обновлению популяции. Дальнейшее исследование механизмов гибели и выживания устойчивых к апоптозу клеток имеет важное значение для перспективных разработок новых стратегий в борьбе с устойчивыми опухолевыми клетками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, МКБ РАН и СПбГУ.

ДИНАМИКА РЕОРГАНИЗАЦИИ ЯДРЫШКОВОГО АППАРАТА И ЛОКАЛИЗАЦИИ рРНК В СОЗРЕВАЮЩИХ ООЦИТАХ МЫШИ. © К. В. Шилова, О. В. Зацепина. ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, kseniya.shishova@inbox.ru.

В процессе роста и созревания ооцитов в ядрышке происходит ряд характерных морфологических изменений, которые сопровождаются снижением транскрипционной активности ядрышка и хроматина, а также формированием антральной полости фолликула. Компартменты ядрышка замещаются тонкофибрилярным материалом неизвестной химической природы, а ключевые белки ядрышка, такие как РНК-полимераза I, фибрилларин и B23/нуклеофозмин, распределяются на поверхности этого материала. Результатом трансформации ядрышка является формирование постядрышка, или кариеосферы, структуры, получившей в иностранной литературе название ядрышкоподобного тельца (nucleolus-like body, NLB), которая наиболее отчетливо выявляется в GV-ооцитах на стадии зародышевого пузырька. В зависимости от организации хроматина GV-ооциты мыши делят на две группы: первая включает в себя ооциты, в которых присутствуют хромоцентры, ассоциированные с постядрышком (not surrounded nucleolus oocytes, или ооциты NSN-типа); ко второй группе относят ооциты, в которых постядрышко окружено кольцом конденсированного хроматина, а хромоцентры отсутствуют (surrounded nucleolus oocytes, или ооциты SN-типа).

Для изучения химической организации постядрышка мы проследили динамику изменений в структуре ядрышка ооцитов мыши, начиная со стадии ооцита однослойного фолликула, до стадии зародышевого пузырька с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с олигонуклеотидными пробками к 18S и 28S рРНК. Пробы к 18S и 28S позволяют выявить зрелую рРНК в ядрышке, в цитоплазме в составе рибосом, а также частично процессированные транскрипты в ядрышках. В результате было показано, что ядрышки ооцитов из одно- и двухслойных фолликулов содержат 18S и 28S рРНК и по характеру гибридизации не отличаются от ядрышек соматических клеток, включая культивируемые фибробласты мыши и клетки гранулезы фолликулов. На стадии многослойного фолликула характер локализации рРНК в ооците изменяется: 18S и 28S рРНК преимущественно выявляются в ядрышке в составе более ярких гранул диаметром 1—2 мкм, которые не колокализуются с

белком фибрилларинном. Локализация 18S и 28S рРНК в гранулах в составе постядрышка также была выявлена в ооцитах NSN-типа GV-ооцитов, хотя при этом фибрилларин проявляет характерную для этого типа ооцитов локализацию на поверхности постядрышка. В ооцитах SN-типа в экспериментах, выполненных по стандартному протоколу гибридизации с олигонуклеотидными пробками к 18S и 28S рРНК, рРНК в составе постядрышек не выявляется.

Таким образом, в работе впервые по стадиям развития ооцита была показана трансформация ядрышка в постядрышко при созревании ооцитов с точки зрения изменения локализации рРНК. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что процесс формирования постядрышка включает в себя не только перераспределение ядрышковых белков, но и изменение в локализации рРНК. Невозможность выявления рРНК в постядрышках ооцитов SN-типа указывает либо на особое состояние рРНК, либо на уникальность структуры постядрышка, которые не позволяют в стандартных условиях гибридизации *in situ* выявлять нуклеиновые кислоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (грант 14.740.11.0171).

ГОРМОНОЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНАЯ СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА В МОЗГЕ КРЫС С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА. © А. О. Шпаков, К. В. Деркач, И. В. Мойсеев, О. В. Чистякова, В. М. Бондарева. ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, alex_shpakov@list.ru.

Нейродегенеративные заболевания являются частыми осложнениями сахарного диабета 1-го типа (СД1), что свидетельствует о тесной взаимосвязи между ними и метаболическими нарушениями, возникающими при СД. Одной из первопричин их развития в условиях СД являются изменения активности гормональных сигнальных систем мозга, в том числе аденилатциклазной системы. Цель работы состояла в исследовании активности аденилатциклазной сигнальной системы, регулируемой биогенными аминами, аденозином, соматостатином и питуитарным АЦ-активирующим полипептидом-38 (РАСАР-38), в мозге крыс с СД1 и в изучении влияния на эту систему лечения интраназальным инсулином (ИИ). Исследования проводили на разработанной авторами стрептозотоциновой модели СД1, которая развивалась на протяжении 6 мес, что существенно отличает ее от традиционно используемых моделей краткосрочного СД1, и которая наиболее близка реально протекающему заболеванию. Для коррекции нейродегенеративных изменений нами был использован ИИ, который положительно влияет на функционирование мозга в условиях острой гипoinsулинемии, но в отличие от периферического инсулина не вызывает гипогликемию, которая усугубляет нарушения в ЦНС.

Показано, что в мозге крыс с пролонгированным СД1 не наблюдается существенных изменений базальной активности АЦ и ее чувствительности к GppNHp и форсколину, активаторам G-белков стимулирующего типа (G_s) и аденилатциклазы (АЦ), что свидетельствует в пользу сохранения каталитических функций АЦ и ее сопряжения с G_s-белками при этой модели СД. В мозге крыс с пролонгированным СД1 снижались стимулирующие АЦ эффекты изопротеренола, РАСАР-38 и серотонина, в то время

как эффекты агониста серотониновых рецепторов 6-го типа (CP₆) EMD-386088 не менялись, что указывает на рецепторную специфичность изменений в G_s-сопряженных сигнальных каскадах. В мозге диабетических крыс также ослаблялись ингибирующие АЦ эффекты норадреналина и соматостатина, а эффекты CP_{1B}-агониста 5-нонилситриптамина блокировались полностью. Полученные результаты подтверждают нашу гипотезу о том, что при СД1 в наибольшей степени нарушаются сигнальные каскады, сопряженные с G-белками ингибирующего типа (G_i). Лечение диабетических крыс ИИ в течение 5 мес приводило к частичному или полному восстановлению АЦ эффектов гормонов. Учитывая тот факт, что нарушения в гормональных сигнальных системах мозга при СД1 являются ключевыми причинами развития нейродегенеративных заболеваний, обнаруженная нами способность ИИ восстанавливать функции аденилатциклазной сигнальной системы свидетельствует о перспективности применения интраназального способа доставки гормона для их лечения и профилактики.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00434).

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА 612—627 РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ И НЕТИРЕОИДНЫХ ТКАНЯХ КРЫС.
© Е. А. Шпакова,¹ К. В. Деркач,² А. О. Шпаков.^{2, 1} ФГБУН Институт высокомолекулярных соединений РАН и ² ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, alex_shpakov@list.ru.

Одна из актуальных проблем современной эндокринологии — поиск и разработка GPCR-пептидов, соответствующих участкам цитоплазматических петель (ЦП) рецепторов серпантинного типа, которые способны селективно взаимодействовать с G-белками и запускать сигнальные каскады в отсутствие гормона. Наибольший интерес представляют GPCR-пептиды, регулирующие активность рецептора тиреотропного гормона (ТТГ), которые могут быть использованы для контроля функций щитовидной железы (ЩЖ), поскольку в настоящее время препараты, непосредственно влияющие на рецептор ТТГ, отсутствуют. Цель исследования состояла в разработке селективных регуляторов функций рецептора ТТГ на

основе пептидов, производных С-концевого участка 612—627 третьей ЦП (С-ЦП-3) рецептора ТТГ, и изучении их активности по влиянию на аденилатциклазную сигнальную систему в ЩЖ и нетиреоидных тканях крыс. Пептид Gln-Tyr-Asn-Pro-Arg-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Arg-Nle-Ala^{61–627}-Lys-Ala-амид, в котором Met⁶²⁶ заменен близким ему норлейцином, и его аналог 612—627-K(Palm)A, модифицированный пальмитатом по С-концевому лизину, были синтезированы твердофазным методом.

Пептид 612—627-K(Palm)A повышал базальную активность аденилатциклазы (АЦ) и ГТФ-связывание G-белков во фракциях мембран ЩЖ, в то время как модифицированный пептид 612—627-КА был менее активен. В мембранах, обработанных коклюшным токсином (КТ), инактивирующим G_i-белки, эффекты пептида 612—627-K(Palm)A сохранялись, в то время в мембранах, обработанных холерным токсином (ХТ), выключающим из сигнальной трансдукции G_s-белок, они в значительной степени ослаблялись. Эти данные указывают на то, что пептид 612—627-K(Palm)A, как и активированный гормоном рецептор ТТГ, осуществляют свое действие на компоненты АЦ системы в ЩЖ крыс через ХТ-чувствительные G_s-белки, но не через КТ-чувствительные G_i-белки. Пептид 612—627-K(Palm)A (10⁻⁵—10⁻³ М) дозозависимым способом снижал стимулирующие АЦ и ГТФ-связывание эффекты 10⁻⁸ М ТТГ в ЩЖ крысы. Немодифицированный пептид в этом отношении был малоэффективен. Действие пептида 612—627-K(Palm)A характеризовалось рецепторной и тканевой специфичностью. Так, в концентрации 10⁻⁴ М он практически не влиял на стимулирующие АЦ и ГТФ-связывание эффекты β-адренергических агонистов и питуитарного АЦ-активирующего полипептида-38 в ЩЖ, хорионического гонадотропина в семенниках и агонистов серотониновых рецепторов в мозге.

Таким образом, пептид 612—627-K(Palm)A селективно активирует АЦ и G_s-белки и ингибирует передачу гормонального сигнала через гомологичный ему рецептор. Это доказывает ключевую роль С-ЦП-3 рецептора ТТГ во взаимодействии с G_s-белками. Биологическая активность пептида 612—627-K(Palm)A указывает на перспективность модификации GPCR-пептидов гидрофобными радикалами для создания на их основе селективных регуляторов гормональных сигнальных систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00351).