

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА ВСЕРОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ И ШКОЛУ-КОНФЕРЕНЦИЮ ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО БИОЛОГИИ КЛЕТКИ В КУЛЬТУРЕ

(Санкт-Петербург, 23—25 октября 2013 г.)

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНАЗ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ИНДУЦИРОВАННОЕ ИНГИБИТОРАМИ HDAC ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНА H2AX. © М. В. Абрамова, О. О. Гнедина, Е. А. Филиппова, С. Б. Светликова, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, mav_2004@mail.ru

Ранее нами было показано, что обработка E1A+Ras-трансформированных фибробластов ингибитором HDAC бутиратом натрия (NaB) приводит к накоплению фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX), которые, формируясь к 24 ч, персистируют не менее 72 ч. Митогенактивированные протеинкиназы (МАРК) представляют собой семейство белков, проводящих различные сигналы, которые являются мишенями для разнообразных внеклеточных стимулов или стрессорных воздействий. Сигнальные пути МАРК играют важную роль в регуляции клеточных функций, включая пролиферацию, репарацию, дифференцировку и апоптоз. Выделяют три семейства МАРК: ERK, JNK и p38. Для выявления сигнальных путей, ответственных за фосфорилирование гистона H2AX при действии ингибиторов HDAC, мы изучали влияние NaB на активность МАРК-киназ. Методом иммуноблотинга было показано, что наряду с усилением фосфорилирования гистона H2AX NaB индуцирует фосфорилирование киназ p38 и JNK, тогда как активность ERK снижается уже в первые часы действия ингибитора. Однако при использовании специфических ингибиторов МАРК, а также клеток с нокаутом по соответствующим киназам были получены данные о том, что подавление активности киназ p38 и JNK приводит к усилению уровня фосфорилированности гистона H2AX. При этом ингибирование ERK снижает как базальный уровень, так и NaB-индуцированное фосфорилирование H2AX. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что подавление активности только киназы ERK из ряда МАРК-киназ приводит к снижению NaB-индуцированного фосфорилирования гистона H2AX. Для сигнального пути MEK/ERK показана положительная роль в регулировании сигнального пути DDR (Wu et al., *Oncogene*. 2006. 25 : 1153—1164). При этом подавление активности MEK/ERK снижает эффективность HR-репарации ДНК (Golding et al., *Cancer Res*. 2007. 67 : 1046—1053). Таким образом, можно предположить, что индуцированное ингибиторами HDAC подавление активности ERK-сигналинга, приводящее к нарушению репа-

рации ДНК, вызывает активацию DDR-сигналинга и накопление фокусов фосфорилированного H2AX.

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

ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛАБОРАТОРНЫХ ПРИМАТОВ. © В. З. Агрба, Д. Д. Каралоглы, И. Е. Игнатова. Научно-исследовательский институт медицинской приматологии РАН, Сочи—Веселое-1.

Экспериментальные исследования на животных, моделирование на них заболеваний людей позволяют решать многие вопросы патологии человека. Известно, что исследования на животных ограничены и регулируются этическими комитетами, но в ряде случаев использование животных в медико-биологических исследованиях незаменимо. Это прежде всего касается обезьян. Данные, полученные в эксперименте на обезьянах, наиболее адекватно отражают аналогичные процессы у человека.

Цель наших исследований — создание коллекции культур мезенхимных стволовых клеток (МСК) обезьян разных видов, изучение их культуральных, морфоиммунологических характеристик и попытки их аллогенной трансплантации.

В работе были использованы половозрелые обезьяны самцы трех видов: макаки-резус (*Macaca mulatta*), павианы гамадрилы (*Papio hamadryas*) и макаки яванские (*Macaca fascicularis*). Культуры МСК выводили из костного мозга, полученного с помощью миелоаспирации, из головки плечевой кости транквилизованных обезьян в объеме 1—1.5 мл по ранее описанному методу (Агрба и др., 2012). Пролиферация клеток костного мозга обезьян после эксплантации в культуру наблюдается через 3—4 сут. К 7-м сут культивирования формировалась сеть вытянутых фибробластоидных клеток, а к 10—14-м сут — конфлюэнтный монослой. В этих культурах клетки упаковывались правильно, параллельно друг другу, не изменяя размера и морфологии, оставаясь мононуклеарными на протяжении всего периода культивирования. На 3-и сут культивирования в культуры вводили деметилирующий агент 5-азациитидин (в концентрации 3 мМ) — индуктор дифференцировки полипотентных

МСК в направлении развития кардиомиоцитов, чтобы предупредить возможную спонтанную реализацию остеогенного потенциала МСК. Во флаконах, куда был внесен 5-азациитидин, клетки постепенно увеличивались в размерах (в длину и ширину), что приводило к нарушению правильной их упаковки. Через 2—3 нед культивирования после введения дифференцирующего агента появлялись тяжи, состоящие из 2—3 клеточных слоев, аналогичные наблюдениям других авторов (Цыб и др., 2004; Tomita et al., 1999) в культурах клеток костного мозга людей и крыс. Прослежена иммунофенотипическая характеристика культур МСК обезьян разных видов с помощью проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре (фирма Beckman Coulter Epics XL-MCL). Для типирования клеток использовали меченные флуорохромами МАТ — CD34-PE, CD45RA-PE, CD90-FITC, HLA-DR-FITC (фирма Becton Dickinson), специфичные к клеткам обезьян. Установлено, что во всех культурах маркеры гемопоэтических клеток CD34, CD45 и HLA-DR не экспрессировались. Большинство клеток (78—97 %) в культурах МСК на разных уровнях культивирования экспрессируют маркер CD90. Полученные иммунофенотипические характеристики культур МСК свидетельствуют об их стволовости. На протяжении 55 пассажей субкультивирования с индексом пролиферации 1 : 2—1 : 3 каждую неделю МСК обезьян не проявляли признаков морфологической трансформации. Аллогенная системная трансплантация МСК обезьянам своего или другого вида не приводила к заметным реакциям со стороны реципиента. Таким образом обезьяны представляют собой модель для изучения особо важных теоретических и прикладных аспектов в области регенеративной медицины.

ИММУНОСУПРЕССИВНОЕ ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ С ЛИМФОЦИТАМИ, АКТИВИРОВАННЫМИ АЛЛЕРГЕНОМ. © А. А. Айзенштадт,¹ А. С. Хрупина,¹ С. А. Смирнова,¹ А. Б. Смолянинов,² М. П. Самойлович,³ В. Б. Климович.³ ¹Северо-западный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Научно-исследовательская лаборатория клеточных технологий, ²ООО «Покровский банк стволовых клеток», ³Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург.

Известно, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) способны оказывать супрессивное влияние на функциональную активность Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток и естественных киллеров (NK). Эти свойства позволяют рассматривать МСК в качестве возможного средства клеточной терапии иммунопатологических состояний, в том числе аллергических реакций, которые на данный момент являются очень распространенными заболеваниями. Характер действия МСК на лимфоидные клетки, участвующие в аллергических реакциях, изучен недостаточно. Задача работы состояла в изучении влияния МСК на стимулированные аллергенами лимфоциты пациентов, страдающих аллергией. МСК были получены из пупочного канатика при неосложненных родах (при наличии подписанного информированного согласия) в соответствии с принятыми протоколами. Из крови пациентов с пищевой моноаллергией на градиенте Фиколла выделяли лейкоцитарную фракцию. Клетки суспендировали в концентрации 5 млн/мл в ростовой среде RPMI с 10 % фетальной бычьей сыворотки, добавляли 200 мкл

раствора аллергена и вносили в лунки 6-луночного планшета с подложкой из МСК в состоянии 70 % конfluence. Сокультивирование клеток в присутствии аллергена проводили в течение 3 сут. Контролями служили лейкоциты тех же пациентов, инкубированные с аллергеном, а также нестимулированные. Для изучения пролиферации лимфоцитов перед началом культивирования их метили CFSE. Поверхностные лимфоцитарные маркеры выявляли с помощью меченных флуорохромами антител на проточном цитофлуориметре FC500 Beckman Coulter. Содержание IgE и IL10 в культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа. При культивировании лейкоцитов с аллергеном процентное содержание среди них В- (CD19+) и Т- (CD3+) лимфоцитов, а также Т-хелперов (CD3+ и CD4+), Т-цитотоксических клеток (CD3+ и CD8+) и Т-регуляторных клеток (CD3+ и CD25+) не отличалось от значений для нестимулированного контроля. Сокультивирование с МСК также не влияло на состав лейкоцитарной фракции. При культивировании с аллергеном изменения проявлялись в состоянии активации клеток. Так, фракция активированных Т-лимфоцитов (CD45+, CD3+ и HLA-DR+) при инкубации с аллергеном увеличивалась с 5 % (в контроле) до 17—19 % (в опыте). При сокультивировании лимфоцитов с МСК аллерген не вызывал роста количества активированных Т-лимфоцитов — их доля не превышала 5 %. Присутствие МСК при инкубации лейкоцитов с аллергеном снижало содержание CD69+ NK-клеток и одновременно повышало долю CD69+ В-лимфоцитов. Сокультивирование с МСК подавляло индуцированную аллергеном пролиферацию лимфоцитов, а также приводило к снижению продукции IgE и повышению секреции противовоспалительного цитокина IL-10. Таким образом, было показано, что при совместном культивировании МСК вызывают торможение активации лимфоцитов в присутствии аллергена.

БЕЛКИ ЦИТОСКЕЛЕТА В ТРАНСКРИПЦИИ И БИОГЕНЕЗЕ мРНК. © В. Ю. Аксенова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vasilisina@gmail.com

Актин и актинсвязывающие белки являются основными компонентами цитоскелета, обеспечивающими поддержание формы клетки, клеточную адгезию, подвижность клетки, активность ионных каналов, секрецию, апоптоз и выживание клеток. Их цитоплазматические функции изучены достаточно подробно. Однако присутствие актина и актинсвязывающих белков в ядре продолжительное время ставилось под сомнение. К настоящему моменту многие из белков цитоскелета обнаружены в ядре. Показано, что актин принимает участие в процессе элонгации транскрипции, сборке преиницирующего комплекса (PIC) и взаимодействует с эукариотическими РНК-полимеразами (RNAP), а также с первичными транскриптами. Показано, что в процессе элонгации транскрипции актин не только взаимодействует напрямую с РНК-полимеразой II, но также и с hnRNP (гетерогенными ядерными рибонуклеопротеинами) и является существенным для элонгации транскрипции. Актин и некоторые актинсвязывающие белки идентифицированы в комплексах с пре-мРНК и hnRNP. Нарушение взаимодействия актина с hnRNP *in vivo* снижает уровень ацетилирования гистонов в хроматине, блокирует транскрипцию, опосредованную РНК-полимеразой II, и влияет

на локализацию НАТ (histone acetyltransferases) вдоль активно транскрибируемых генов. Наличие актина в составе комплекса ремоделирования хроматина необходимо для полной активации АТФазной активности ВАФ (Brg1-associated factor) и его ассоциации с хроматином. Кроме актина в ядре обнаружены и многие актинсвязывающие белки, такие как гельзолин, профилин, кофилин, спектрин, филламин, альфа-актинин 4, пластин, ядерный миозин и некоторые другие, которые взаимодействуют с транскрипционными факторами и определяют их внутриклеточную локализацию, участвуют в регуляции экспрессии генов, созревании и экспорте мРНК, поддержании структуры оболочки ядра, репарации ДНК, митозе и реорганизации хроматина. На сегодняшний день исследователи предлагают различные модели, описывающие участие актина и некоторых актинсвязывающих белков в процессах транскрипции и биогенеза мРНК. Предполагают, что специфичное взаимодействие актина с hnRNP способствует связи между хроматином, РНК-полимеразой и первичными транскриптами за счет привлечения транскрипционных коактиваторов, НАТ и комплексов ремоделирующих хроматин в области активно транскрибируемых генов. Однако накапливающиеся экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что актин и актинсвязывающие белки являются не только вспомогательными, но и довольно часто необходимыми элементами в ходе реализации генетической информации, не дают четкого представления о том, каким образом актин и актинсвязывающие белки участвуют в вышеописанных процессах.

ОРГАНИЗАЦИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ АДГЕЗИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ С МОНОСЛОЕМ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ EA.hy 926 В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ. © А. В. Александрова,¹ С. А. Александрова,² Г. П. Пинаев.² ¹С.-Петербургский государственный политехнический университет и ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ju2005@ Rambler.ru

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), выделенные из костного мозга и наработанные в культуре, обладают высокой биологической активностью и рассматриваются в качестве участников репаративных процессов. Однако несмотря на высокие адгезионные способности, только небольшое количество клеток (от 0.1 до 2.7 %, по разным данным) после системного введения доходит до места повреждения. Специфическим регулятором миграции клеток из кровеносного русла в ткани является эндотелий, который изменяет свою проницаемость в участках острого и хронического воспаления. Важно выяснить характер взаимодействия МСК с эндотелиальными клетками (ЭК) под влиянием провоспалительных цитокинов и плазмы крови. Целью настоящей работы являлся сравнительный анализ организации актинового цитоскелета в клетках МСК при их специфической адгезии к эндотелиальным клеткам и неспецифической — к поверхности культуральной посуды — в разных условиях.

В работе использовали популяцию МСК костного мозга беспородных крыс 3—4-го пассажа культивирования и ЭК линии EA.hy 926. ЭК культивировали на стеклах, помещенных в лунки 12-луночного планшета до

формирования конфлюэнтного монослоя, в некоторые лунки вносили ФНО α (200 ЕД/мл), плазму крови крысы (10 %) или оба компонента на 1 сут. Суспензию клеток костного мозга (200 тыс. клеток) окрашивали прижизненным флуоресцентным красителем CFSE, вносили в лунки с ЭК и инкубировали в течение 1 ч. Для изучения неспецифической адгезии МСК клетки в количестве 100 тыс. добавляли в ростовую среду с добавками или в среду, кондиционированную ЭК в течение 1 сут, и инкубировали 1 ч. Неадгезировавшие клетки удаляли фосфатно-солевым буфером, оставшиеся клетки фиксировали, обрабатывали раствором Тритона X-100 и окрашивали родамин-фаллоидином (Invitrogen, США). Готовые препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа LSM 5 Pascal. Проведенный анализ организации актинового цитоскелета МСК позволил выделить семь основных типов клеток в зависимости от их формы и актиновых структур (от округлых клеток без определенных актиновых структур до хорошо распластанных вытянутых клеток с многочисленными филоподиями и выраженными стресс-фибриллами). В обычных условиях культивирования после 1-часовой неспецифической адгезии одна половина популяции МСК была представлена округлыми клетками, а другая половина — немного более распластанными клетками с небольшой ламеллой по краю. Под влиянием ФНО α и плазмы крови количество клеток с такой морфологией увеличивалось до 68.9 %. После инкубации МСК в кондиционной среде от ЭК большинство клеток было окружено широкой ламеллой при всех вариантах инкубации. МСК, прикрепившиеся к ЭК в течение 1 ч, отличались наименее распластанной морфологией — примерно половина МСК в разных условиях совместной инкубации сохраняла округлую малоадгезивную форму. Практически все остальные клетки взаимодействовали с ЭК с помощью тонкой ламеллы. Возможно, именно эти типы клеток, обладающие минимальными адгезионными способностями, способны к трансмиграции через эндотелиальный монослой и интеграции в ткани. Кроме того, изредка попадались хорошо распластанные вытянутые клетки, контактирующие с ЭК с помощью фокальных контактов. Интересно, что в условиях инкубации клеток в среде с плазмой, содержащей ФНО α , количество таких клеток вырастало до 14.3 %.

СПОСОБНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ КАПИЛЛЯРОПОДОБНЫХ СТРУКТУР ЭНДОТЕЛИОЦИТАМИ ПУПЛОЧНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ. © О. И. Александрова, Н. М. Юдина, М. И. Блинова, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ellga@bk.ru

В настоящее время одной из актуальных проблем современной регенеративной медицины является разработка клеточных технологий, используемых для восстановления структурной и функциональной целостности поврежденных органов и тканей. На одном из этапов процесса восстановления поврежденной кожи происходит формирование грануляционной ткани, в которой находят новообразующиеся кровеносные сосуды, играющие важную роль в обеспечении трофической функции ткани. Ведущая роль в образовании этой капиллярной сети принадлежит эндотелиоцитам. Впервые *in vitro* феномен ангиогенеза удалось воспроизвести в 1980 г. (Folkman et al., 1980). Известно, что при культивировании эн-

дотелиоциты могут образовывать капиллярноподобные структуры как при воздействии индукторов ангиогенеза, так и спонтанно (Hockel et al., 1987). Кроме того, формирование капиллярноподобных трубок зависит от источника получения эндотелиоцитов и условий их культивирования (Grant et al., 1990).

В данной работе была проанализирована способность эндотелиоцитов пупочной вены человека к образованию капиллярноподобных структур при культивировании клеток в различных условиях. Культивирование клеток осуществляли на поверхности и внутри коллагенового геля, применяемого для приготовления дермального эквивалента, в качестве контроля использовали стандартные условия культивирования эндотелиальных клеток на желатине. Эндотелиоциты были выделены из пупочной вены человека по методу Гимброна (Gimbrone et al., 1974) с использованием модификации Антонова (Антонов и др., 1981). Идентификацию эндотелиоцитов проводили методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью окраски на маркер эндотелиальных клеток фактор Виллебранда (vWF). Нанесение суспензии эндотелиоцитов на поверхность коллагенового геля осуществляли после предварительной полимеризации геля, а введение в коллагеновый гель — в момент его приготовления. Культивирование клеток осуществляли в стандартных условиях на среде для эндотелиоцитов (Endothelial Cell Growth Medium) без использования факторов, индуцирующих ангиогенез.

Взаимодействие эндотелиоцитов с поверхностью желатин и коллагенового геля носило сходный характер. Распластывание клеток было отмечено уже через 2 ч после посева. Внутри коллагенового геля процесс взаимодействия клеток с субстратом был более медленным. Спонтанное образование капиллярноподобных структур было отмечено во всех вариантах эксперимента: на поверхности и внутри коллагенового геля — после 10—14 сут культивирования, в контроле — после 5—6 сут культивирования.

Проведенные исследования показали, что эндотелиоциты пупочной вены человека при культивировании их на поверхности и внутри коллагенового геля спонтанно образуют капиллярноподобные структуры. На основании этих результатов можно предположить, что эффективность тех клеточных продуктов, которые используются для восстановления поврежденной кожи, будет повышена при введении в них эндотелиоцитов.

ВЛИЯНИЕ СУБЛЕТАЛЬНОГО ТЕПЛООВОГО ШОКА НА ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ И МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА. © Л. Л. Алексеенко, И. И. Фридлянская, В. В. Зенин, С. В. Жеребцов, В. И. Земелько, Т. М. Гринчук, Н. Н. Никольский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Эмбриональные клетки человека являются плюрипотентными, обладают способностью к самовозобновлению и могут дифференцироваться в клетки любого типа. Стволовые клетки взрослого организма являются мультипотентными и обеспечивают нормальное развитие органов и тканей и их регенерацию. И эмбриональные, и взрослые стволовые клетки должны иметь механизмы, обеспечивающие их генетическую стабильность. Предполагается, что такими механизмами могут быть более высокая устойчивость к стрессу и надежная система репара-

ции повреждений ДНК. Тепловой шок является одним из наиболее распространенных типов природного стресса. В связи с этим целью нашей работы было изучение сублетального теплового воздействия на эмбриональные стволовые клетки человека (чЭСК) и эндометриальные мезенхимные стволовые клетки (эмСК). Результаты наших исследований показали, что и чЭСК, и эмСК являются чувствительными к гипертермии, но отвечают на тепловой шок по-разному. При одинаковом сублетальном тепловом воздействии чЭСК подвергаются апоптозу, а эмСК проявляют признаки стрессиндуцированного преждевременного старения (SIPS): арест клеточного цикла в фазах G₀/G₁ и G₂/M, усиление экспрессии p21^{Waf1/Cip1} — ингибитора циклинзависимых киназ, изменение клеточной морфологии и появление связанной со старением β-галактозиновой активности. Пережившие тепловое воздействие чЭСК сохраняют свойства исходных клеток. Они самовозобновляются, экспрессируют маркеры плюрипотентности OCT4, NANOG, SSEA4 и щелочную фосфатазу, способны образовывать эмбрионидные тельца и дифференцироваться в клетки трех зародышевых листов. Выжившие после теплового шока потомки эмСК не меняют свою морфологию, подтверждены репликативному старению и сохраняют высокую экспрессию поверхностных маркеров CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 и CD105, подтверждающих их мезенхимное происхождение.

РОЛЬ МИКРОТРУБОЧЕК В ЗАЩИТЕ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК. © И. Б. Алиева,^{1, 2} Е. А. Земсков,² А. Д. Верин.² ¹Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, irina.alieva@belozersky.msu.ru и ²Центр сосудистой биологии, Университет наук о здоровье Джорджии, США.

Основными функциями эндотелиальных клеток, выстилающих внутреннюю поверхность всех сосудов, являются регуляция проницаемости сосудистой стенки и контроль за обменом веществ между циркулирующей кровью и тканевой жидкостью, в том числе за транспортом макромолекул и движением клеток крови сквозь стенку сосуда. Цитоскелет эндотелиоцитов играет решающую роль в поддержании барьерной функции эндотелия. Реорганизация цитоскелета приводит к изменению формы клетки и обеспечивает структурную основу для усиления или ослабления барьерной функции. Нарушение барьерной функции — дисфункция эндотелиального пласта — характеризуется значительной перестройкой цитоскелета клеток, активацией актомиозинового сокращения и в конечном итоге образованием промежутков между эндотелиальными клетками. В организме человека дисфункция эндотелия приводит к отеку легкого и другим патологическим состояниям, вплоть до острой раны легкого. В связи с высокой клинической значимостью молекулярные механизмы укрепления барьерной функции эндотелия, защиты и восстановления барьерной функции после ее нарушения являются объектом интенсивных исследований. В литературе описан целый ряд веществ, повышающих барьерные возможности эндотелия и защищающие его от повреждающих воздействий *in vitro*. В наших предыдущих исследованиях мы продемонстрировали положительный эффект внеклеточного аденозина как вещества, защищающего барьерные свойства эндотелия

(Umapathy et al., 2010). Аденозин увеличивал трансэндотелиальное электрическое сопротивление (TER) эндотелиального монослоя легочной артерии человека (НРАЕС) *in vitro*, причем этот эффект был дозависимым. Дальнейшие исследования показали, что усиление барьерной функции, вызываемое воздействием аденозина, сопровождается увеличением количества микротрубочек (MT) в зоне межклеточных VE-кадгериновых контактов. Оказалось, что внеклеточный аденозин не только усиливает барьерные свойства эндотелия в норме, но также способен защищать/восстанавливать целостность монослоя НРАЕС, нарушенного воздействием нокодазола (вещества, разрушающего MT). Индуцированный аденозином защитный/восстанавливающий эффект зависит от степени деполимеризации MT. Значительная деполимеризация MT (2.5 мкМ нокодазола) снижает эффект аденозина и не позволяет TER восстановиться до нормального уровня. Таким образом, снижение количества концов динамических MT в зоне VE-кадгериновых контактов коррелирует с подавлением эффекта аденозина как вещества, усиливающего барьерные свойства НРАЕС. Изменение динамических свойств MT под действием наномолярной (100 нМ) концентрации нокодазола приводит к временно и полностью обратимому снижению TER в клетках, обработанных аденозином. Плюс-концевой белок MT, CLASP1, регулирует начальные стадии индуцированного аденозином повышения TER. Полученные нами данные впервые демонстрируют, что опосредованный пуриновыми рецепторами сигнальный каскад напрямую регулирует динамику MT в эндотелиоцитах человека, и эта регуляция, по крайней мере частично, опосредована CLASP1, плюс-концевым белком MT.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00488) и гранта NIH (HL101902).

ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЕНОМОВ АДЕНОВИРУСОВ И ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1-ГО И 2-ГО ТИПОВ В ОБРАЗЦАХ ТКАНИ ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА И ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НИХ КУЛЬТУРАХ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РАЗРАБОТКИ КРИТЕРИЕВ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ. © Н. Г. Антонович,¹ З. Б. Качева,¹ А. А. Штыров,¹ С. В. Орлова,¹ Е. С. Никитенко,¹ В. Л. Чекан,² И. В. Сидоренко.² ¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» и ²ГУО Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования, Минск.

Контроль вирусологической безопасности является необходимым этапом приготовления культур клеток для их последующего использования в клеточной терапии. На данный момент выявлены и описаны случаи развития вирусных инфекций в посттрансплантационный период у пациентов-реципиентов, которым вводили различные типы стволовых клеток. Слабая изученность рисков переноса возбудителей вирусных инфекций при трансплантации клеток обонятельного эпителия (ОЭ) требует проведения контроля как источников, так и получаемых из них культур на присутствие наиболее значимых в патологии человека вирусов. Известно, что верхние отделы воздухоносных путей являются входными воротами для многих

патогенов. В связи с этим первостепенный интерес представляют ДНК-содержащие вирусы семейств Adenoviridae, Herpesviridae, Papillomaviridae и др., которые могут вызывать латентные и персистентные формы инфекции на клеточном уровне. Целью работы явилось исследование биопсийных образцов ОЭ человека и полученных из них культур стволовых и прогениторных клеток на присутствие геномов аденовирусов и вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ 1, 2) для установления степени рисков инфицированности клеточного материала, предназначенного для трансплантации, и разработки соответствующих критериев оценки вирусологической безопасности. Было проведено исследование биопсийных образцов тканей ОЭ из операционного материала области верхнего и среднего носовых ходов, посылаемого на гистологическое исследование при проведении плановых хирургических вмешательств у 10 пациентов разного возраста и пола с искривлением носовой перегородки, у которых отсутствовали острые респираторные инфекции и сопутствующие заболевания (гепатиты В, С, ВИЧ и др.). Приготовили и исследовали 10 культур стволовых и прогениторных клеток ОЭ 1—5-го пассажей. Из образцов ДНК выделяли с помощью набора Нуклеосорб С (ОДО Праймтех) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Содержание ДНК аденовирусов и ВПГ 1, 2 определяли методом ПЦР с последующей детекцией в агарозном геле. В результате полученных данных установлено, что все исследуемые образцы ткани ОЭ и приготовленные из них культуры стволовых и прогениторных клеток не содержали ДНК аденовирусов и ВПГ 1, 2. Однако малая выборка не позволяет исключить необходимость исследования клеточного материала, предназначенного для использования в клеточной терапии, на данные вирусные патогены. Исследования будут продолжены для разработки статистически обоснованных критериев оценки безопасности. Представляет интерес расширение перечня исследуемых возбудителей: цитомегаловирус, вирус Эпштейна—Барра, папилломавирусы. Полученные результаты позволят определить вклад различных вирусов в потенциальную опасность использования ткани ОЭ как источника культур стволовых и прогениторных клеток и разработать критерии оценки вирусологической безопасности применения данных клеток в регенеративной медицине.

ЗАВИСИМОСТЬ ИЗМЕНЕНИЙ В ОРГАНИЗАЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ ОТ СЕКРЕТИРУЕМЫХ ИМИ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА. © Н. Б. Бильдюг, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, relapse@yandex.ru

В процессе культивирования кардиомиоцитов новорожденных крыс наблюдается обратимая реорганизация сократительного аппарата, которая заключается в преобразовании типичных миофибрилл в структуры немышечного типа. Было сделано предположение о том, что обнаруженные перестройки могут быть связаны с потерей клетками естественного микроокружения при переводе их в культуру, в частности внеклеточного матрикса, при этом возвращение к исходному состоянию может объясняться наработкой необходимых компонентов внеклеточного матрикса. Для проверки предположения проводили исследование с помощью адаптированного для культуры

кардиомиоцитов метода получения и анализа внеклеточного матрикса. Было показано, что кардиомиоциты в процессе их культивирования синтезируют компоненты внеклеточного матрикса, при этом наблюдаются количественные различия его белкового состава в зависимости от срока культивирования. Максимальная наработка внеклеточного матрикса наблюдается на таких сроках культивирования кардиомиоцитов, которые, по данным иммунофлуоресцентного анализа, предшествуют восстановлению исходной организации сократительного аппарата клеток. Таким образом, перестройка миофибрилярного аппарата кардиомиоцитов при переводе их в культуру, вероятно, связана с необходимостью синтеза компонентов внеклеточного матрикса и временной сменой сократительной функции кардиомиоцитов на синтетическую, не типичную для этих клеток в условиях *in vivo*, тогда как восстановление миофибрилярных структур после длительного культивирования кардиомиоцитов может объясняться постепенной наработкой соответствующего для них внеклеточного матрикса. Несмотря на подтверждение нашего предположения, при культивировании кардиомиоцитов на внеклеточном матриксе, наработанном такими же кардиомиоцитами, происходило сокращение периода нахождения сократительного аппарата в перестроенном состоянии, однако непрерывного поддержания его типичной организации не наблюдалось. Следовательно, существуют еще другие факторы, отвечающие за перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре.

РОЛЬ РЕОРГАНИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТА ПОД ВЛИЯНИЕМ ВНЕШНИХ ИНДУКТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ. © Д. Е. Бобков. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, bobkovde@yandex.ru

При действии на культивируемые клетки различных биологически активных молекул, таких как ростовые факторы, гормоны и белки внеклеточного матрикса, происходит быстрая реорганизация актинового цитоскелета, которая заключается в частичной или полной разборке системы актиновых структур с последующим постепенным восстановлением организации цитоскелета. Одним из возможных универсальных механизмов регуляции процесса разборки актинового цитоскелета может быть изменение внутриклеточного уровня активных кислородных радикалов. Считается, что внешние сигналы не влияют непосредственно на структуры цитоскелета, а передаются сначала в общую интегрирующую систему, основными элементами которой являются малые ГТФазы Rho-семейства. Rho-ГТФазы действуют через систему своих эффекторных киназ на актинсвязывающие белки и регулируют образование специфичных структур актинового цитоскелета. Так, активация Rho приводит к образованию в клетке стресс-фибрилл, Rac участвует в образовании ламелл, а Cdc42 — филоподий. Rho действует через киназу ROCK, Rac и Cdc42 активируют JNK и p38-МАР-киназные пути. Специфичность вновь образуемых цитоскелетных структур определяется набором актинсвязывающих белков, взаимодействующих друг с другом и с цитоскелетными структурами. Было обнаружено, что многие актинсвязывающие белки, например тропомиозин или альфа-актинин, выявляются в цитоплазме культивируемых клеток не только в составе структур цитоскелета, но и в виде отдельных частиц, представляю-

щих собой мультимолекулярные белковые комплексы. При формировании таких комплексов большую роль играют белки с мультидоменной организацией, способные вступать во взаимодействие с другими цитоскелетными, адапторными, моторными и сигнальными белками, а также транскрипционными факторами и белками теплового шока. Регуляция межбелковых взаимодействий осуществляется путем вторичных модификаций вовлеченных белков, таких как ацетилирование или фосфорилирование. Количество и состав таких комплексов изменяются в ходе реорганизации актинового цитоскелета. Мы предполагаем, что они вовлечены в процесс реорганизации цитоскелета под влиянием внешних лигандов и являются предшественниками будущих актиновых структур, а также могут принимать участие в проведении внутриклеточных сигналов. Кроме того, характер пространственной организации и стабильность актинового цитоскелета могут зависеть от типа синтезируемых в данных условиях конкретных изоформ актинсвязывающих белков.

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК К БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНВАЗИИ. © Е. С. Божоккина, О. А. Цаплина, И. А. Гамалей, С. Ю. Хайтлина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, bozhokkina@yahoo.com

Антиоксиданты широко используются в фармакологии как восстанавливающие агенты, уменьшающие окислительный стресс клетки (Zafarullah et al., 2003). N-ацетилцистеин (NAC) благодаря наличию в молекуле свободной SH-группы действует как антиоксидант, нейтрализуя различные радикалы и расщепляя дисульфидные связи. Альфа-липоевая кислота (ALA) не содержит свободных SH-групп до проникновения в клетку. В клетке ALA восстанавливает SH-группы и образует дигидролипоевую кислоту (DHЛА), которая действует как прямой внутриклеточный антиоксидант (Packer et al., 1995). И NAC, и ALA используются в фармакологической практике как восстанавливающие агенты для уменьшения активных форм кислорода (АФК) в клетке при лечении различных болезней. Однако действие антиоксидантов сопровождается не только изменением уровня АФК. Модифицируя белки, в том числе и сигнальные, через восстановление SH-групп, они могут менять экспрессию ряда генов и изменять функции нормальных и трансформированных клеток (Zafarullah et al., 2003; Gustafsson et al., 2005; Parasassi et al., 2010). Примером может служить NAC-зависимое уменьшение чувствительности фибробластов 3T3-SV40 к бактериальной инвазии, связанное, по-видимому, с изменением поверхностных белков клетки-хозяина (Gamaley et al., 2006). Задача настоящей работы состояла в том, чтобы сравнить влияние NAC, ALA и DHЛА на чувствительность клеток аденокарциномы шейки матки HeLa и аденокарциномы кишечника *S. grimesii*, к инвазии условно-патогенными бактериями *S. grimesii*, *S. proteamaculans* и рекомбинантными *E. coli* K-12, экспрессирующими ген металлопротеазы гримелизин. Обработка клеток HeLa и CaCo2 тиоловыми антиоксидантами NAC (5—30 мМ) и DHЛА (1.25 мМ) увеличивала инвазию *S. grimesii* в 1.5—2 раза, а *S. proteamaculans* — в 4—6 раз. Инвазия рекомбинантных *E. coli* K-12 в клетки HeLa и CaCo2, обработанные NAC или DHЛА, также увеличивалась в 3—3.5 раза. Напротив, действие ALA, не имеющей свободных SH-групп, не вызывало из-

менений количества инвазивировавших бактерий как дико-го, так и рекомбинантного штаммов. Увеличение чувствительности клеток HeLa к инвазии коррелирует с увеличением экспрессии E-кадгерина и α - и β -катенинов, участвующих в адгезии и межклеточных контактах. Увеличение экспрессии E-кадгерина происходило и в обработанных НАС клетках CaCo2. Полученные данные свидетельствуют о том, что тиоловые антиоксиданты могут активировать клеточные факторы, способствующие бактериальной инвазии. Кроме того, различие в чувствительности клеток HeLa и CaCo2 к инвазии бактериями *S. grisei*, *S. proteamaculans* и рекомбинантными *E. coli* указывает на то, что интернализация этих бактерий осуществляется через разные рецепторы, активность которых по-разному регулируется тиоловыми антиоксидантами.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов 11-04-00393, 12-04-00935, 12-04—31109_мол и гранта ОПТЭК.

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАЦИИ ДВОЙНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В КЛЕТКАХ СИРИЙСКОГО ХОМЯЧКА, ПРЕЖДЕВРЕМЕННО СТАРЕЮЩИХ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ. © А. А. Василишина, Д. В. Фирсанов, Л. В. Соловьева, Н. М. Плескач, М. П. Светлова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vasilishina.a@gmail.com

Для культивируемых клеток грызунов нехарактерно репликативное старение, которое связано с укорочением теломера. Принято считать, что остановка деления и старение этих клеток индуцируются накоплением свободных радикалов, возникающим в стандартных условиях культивирования. В настоящей работе исследовали способность молодых (1-й пассаж) и стареющих (5-й пассаж) клеток сирийского хомячка осуществлять репарацию двойных разрывов (ДР) ДНК после действия радиомиметика блеомицина. Задачей исследования было проверить, происходит ли изменение эффективности репарации ДР в культивируемых клетках грызунов в условиях внешнего стресса. Первичную культуру фибробластов сирийских хомячков получали ферментативным методом из кожи новорожденных животных. В процессе культивирования происходило постепенное замедление пролиферации клеток. Преждевременная остановка клеточного деления и увеличение количества клеток, имеющих морфологические признаки старения (увеличение расплывчатости клеток и площади ядра), происходили после ограниченного числа удвоений клеток (5-й пассаж). Однако отклонения в морфологии как в контроле, так и после действия блеомицина не сопровождалось повышением активности ассоциированного старением лизосомного фермента бета-галактозидазы. Образование фосфорилированной формы гистона H2AX (g-H2AX) является ранним ответом клетки на индукцию ДР, при этом фосфорилирование захватывает достаточно протяженные участки хроматина, так что после иммунофлуоресцентной окраски клеток с использованием антител к гамма-H2AX в местах ДР видны отчетливые фокусы. Индукцию и элиминацию ДР в клетках сирийского хомячка 1-го и 5-го пассажей, обработанных блеомицином, оценивали на стадии G₀/G₁ по средней интенсивности флуоресценции ядер клеток на максимальных проекциях серий конфокальных изображений клеток после иммунофлуоресцентной окраски ан-

тителами к g-H2AX. Фазы клеточного цикла определяли с помощью параллельной иммунофлуоресцентной окраски на белок Ki67 (маркер пролиферирующих клеток). Через 1 ч после обработки блеомицином в клетках 5-го пассажа наблюдалось статистически значимое увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с клетками 1-го пассажа. На более поздних сроках (до 72 ч) различия между клетками разных пассажей становились менее выраженными. Таким образом, обнаруженные различия в кинетике образования и элиминации g-H2AX в молодых и стареющих клетках сирийского хомячка свидетельствуют о возможном вкладе репарации ДНК в процесс преждевременного старения клеток в культуре.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОПУЛЯЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИМБА. © Т. А. Гайдукова, О. С. Роговая. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва.

Культивирование лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛСК) является важнейшей задачей современной клеточной биологии. Зона лимба является источником ЛСК, которые обеспечивают обновление эпителии роговицы. Целью нашего исследования было выделить и охарактеризовать культуру k19+ лимбальных эпителиальных стволовых клеток глаза кролика. Свойствами ЛСК являются способность к самоподдержанию, продукция дифференцированных дочерних клеток и образование клонов. Наиболее достоверными маркерами ЛСК можно считать ABCG2, Nr63a, k19 и k15. Анатомической нишей для ЛСК является зона в корнеосклеральном лимбе, которая получила название палисад Вогта. ЛСК располагаются на базальной мембране палисада Вогта между пигментированными меланоцитами, которые защищают их от действия ультрафиолета. В процессе нашей работы были изучены различные протоколы получения ЛСК, в результате чего разработан оптимальный, доступный, усовершенствованный метод выделения ЛСК, основанный на ферментативной обработке биоптатов. При данном способе из одного лимба кролика можно выделить до 300 тыс. ЛСК. В ходе работы была проведена серия экспериментов по культивированию клеток в различных условиях в течение 1.5 мес (до 12-го пассажа), в результате чего было показано, что на формирование популяции ЛСК влияет концентрация ионов кальция в среде культивирования. Клетки культивировали на средах следующего состава: DMEM/F12 (1 : 1), 10 % ЭТС, 4 мМ L-глутамин, 1 % незаменимых аминокислот (MEM), 5 мкг/мл митогенных добавок (инсулин, трансферрин и селенит натрия), 10 нг/мл EGF, 0.4 нг/мл гидрокортизон сукцината; либо в среде SFM с низкой концентрацией Ca²⁺ (<0.1 мМ). При этом были исследованы такие характеристики культуры, как скорость удвоения, кривые роста популяции, способность к колониеобразованию, был исследован фенотип клеток при помощи иммуногистохимии и проточной цитофлуориметрии. В результате показано, что на среде, обедненной кальцием, морфология клеток значительно меняется: они истончаются и приобретают фибробластоподобную форму, скорость удвоения популяции снижается в 3.5 раза по отношению к таковой на полной среде культивирования, увеличивается доля дифференцированных клеток (k13/12+ и клеток vimentin+). Способность к колониеобразованию культурой ЛСК на среде с низким содержанием кальция (SFM) снижена.

В то же время ЛСК, посаженные в концентрации 10 тыс. кл./мл на полной ростовой среде, образуют множественные колонии уже на 4-е сут культивирования. Иммуногистохимические исследования культуры ЛСК и данные проточной цитофлуориметрии показали, что в исследуемой нами популяции 90 ± 6 % клеток соответствуют эпителиальному фенотипу (k19, k3/12, k14 и k15). Причем при культивировании на двух сравниваемых средах уже на 2-м пассаже фенотип клеток несколько различается, к 4-му пассажу на среде SFM доля клеток k19+ снижается на 10 %. При длительном культивировании данной культуры появляется до 33 % примеси клеток vimentin+. Культивирование в коллагеновом геле (модель 3-мерного культивирования) показало, что ЛСК способны организовывать цепочки, состоящие из нескольких клеток, как в присутствии сыворотки на полной среде, так и на среде SFM.

Предложенный протокол выделения позволяет одновременно получить культуру клеток, состоящую на 90 % из ЛСК. При длительном культивировании ЛСК снижается количество клеток k19/k15+. Использование среды с пониженным содержанием кальция влияет на фенотип клеток, динамику роста культуры и фенотипический профиль клеток ЛСК *in vitro*.

ОТ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ К НУЛЛИПОТЕНТНОСТИ: РЕГУЛЯЦИЯ БАЛАНСА ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫХ СИГНАЛОВ В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ И ТЕРАТОКАРЦИНОМНЫХ КЛЕТКАХ. © О. Ф. Гордеева. Институт биологии развития РАН, Москва, olgagordeeva@yandex.ru

Плюрипотентные стволовые клетки различного происхождения способны к самообновлению и дифференцировке во все типы соматических и половых клеток *in vivo* и *in vitro*. Однако при адаптации и длительном культивировании *in vitro* в плюрипотентных стволовых клетках могут происходить генетические и эпигенетические изменения, приводящие к дисбалансу в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки, онкогенной трансформации и переходу их в нуллипотентный статус, аналогичный статусу клеток эмбриональной тератокарциномы. В наших исследованиях механизмов функционирования сигнальных путей факторов семейства TGF β , каскадов PI3K и ERK/MEK в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека было показано, что при их поддержании *in vitro* необходимость экзогенной стимуляции или ингибирования этих сигнальных путей обусловлена различиями в паттернах эндогенной экспрессии факторов TGF β 1, BMP4 и ActivinA, а также FGF2 в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека. Для поддержания плюрипотентного статуса эмбриональных стволовых клеток человека необходимо усиление ветвей ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 TGF β -сигналинга с помощью экзогенных факторов для ослабления эффектов аутокринного BMP/Smad1/5/8-сигналинга, стимулирующих дифференцировку в клетки внезародышевых структур. В наших работах также были исследованы функциональные роли ActivinA, TGFbeta и BMP сигнальных путей в поддержании нуллипотентного статуса тератокарциномы человека и мыши. Было показано, что в отличие от плюрипотентных стволовых клеток регуляция самообновления клеток тератокарцином и экспрессия в них ключевых транскрипционных факторов Oct4 и Nanog происходят при низкой

активности сигнальных каскадов ActivinA/Nodal, но высокой активности ERK/MEK- и PI3K-сигнальных путей. Обнаружено, что функциональная активность сигнальных путей, активируемых факторами ActivinA/Nodal/Lefty1 и BMP4, сохраняется, несмотря на низкие уровни экспрессии этих факторов в опухолевых тератокарциномных клетках по сравнению с нормальными эмбриональными стволовыми клетками. Экзогенная стимуляция сигнальных путей ActivinA/Nodal приводит к остановке роста клеток тератокарциномы, но не индуцирует их дифференцировку. Стимуляция экзогенными факторами BMP не оказывает влияния на пролиферацию и дифференцировку тератокарциномы, но ингибирование этих сигнальных путей приводит к снижению роста. При этом функциональные роли этих ветвей сигналинга факторов семейства TGF β различаются не только в эмбриональных стволовых и тератокарциномных клетках, но и в нуллипотентных клетках тератокарцином мыши и человека. Наши данные показывают, что перестройки сигнальных путей факторов семейства TGFbeta, а также ERK/MEK- и PI3K-сигнальных каскадов в нуллипотентных тератокарциномных клетках приводят к дисбалансу пролиферативных и антипролиферативных сигналов и как следствие — нарушению процессов дифференцировки. Полученные данные важны для понимания механизмов, регулирующих самообновление и дифференцировку плюрипотентных клеток в норме и при патологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-00379-а).

ПРОГРЕССИЯ КАРИОТИПИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ. © Т. М. Гринчук, М. А. Шилина, И. В. Кожухарова, Н. А. Пуговкина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Одной из актуальных проблем, широко обсуждаемой научной общественностью, является использование культуры эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека в медицинских целях, что подразумевает использование клеток с нормальным, неперестроенным кариотипом. Тем не менее на сегодняшний день однозначного ответа на вопрос о стабильности кариотипического набора ЭСК при культивировании не существует. По одним данным, ЭСК могут длительное время сохранять кариотипическую стабильность в процессе культивирования, по другим — стабильность кариотипа в процессе культивирования нарушается. Целью настоящей работы было провести сравнительный анализ степени стабильности кариотипа клеточных линий ЭСК человека на разных этапах культивирования. В качестве объектов исследования были использованы ЭСК двух линий (C910 и C612), полученные авторами работы из бластоцист, не использованных в процессе экстракорпорального оплодотворения, на стадии их вылупления. Метафазные хромосомы окрашивали дифференциально на G-диски и идентифицировали в соответствии с Атласом хромосом человека (Мамаева, 2002). При продолжительном культивировании анализируемые клеточные линии сохраняли маркеры плюрипотентности — активность щелочной фосфатазы, экспрессию Oct-4 и SSEA-4. Изучение структуры кариотипического

набора ЭСК обеих линий на относительно ранних пассажах (р. 13 и р. 10 соответственно) показало, что в проанализированных популяциях наряду с клетками, характеризующимися наличием нормального, неперестроенного, кариотипа присутствовали клетки с изменениями. Выявляемые изменения носили случайный характер и были связаны с присутствием в кариотипическом наборе дополнительных хромосомных копий, наличием изохромосом и неспецифических межхромосомных ассоциаций. Выявляемые изменения носили случайный характер. Продолжительное культивирование клеток обеих линий (пассажи 44 и 57 соответственно) приводило к прогрессии кариотипической нестабильности, выражающейся в усилении анеуплоидизации клеток, появлении суперполиплоидных вариантов и в возникновении закономерных кариотипических изменений с преимущественным участием в них определенных хромосом набора. Наличие на более поздних этапах культивирования ЭСК обеих линий экстракопий хромосомного материала, хромосомных поломок, в том числе прицентромерных и Робертсоновских транслокаций, позволяет говорить о том, что длительное культивирование ЭСК сопряжено с дестабилизацией клеточного генома.

ИЗУЧЕНИЕ ЖЕЛАТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ПЕРЕВИВАЕМЫХ И ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ЧЕЛОВЕКА, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСАМИ ГРИППА. © Д. М. Даниленко,¹ М. И. Дюков,¹ А. О. Дурнова,² Р. А. Кадырова,¹ Т. Д. Смирнова.¹ ¹ Научно-исследовательский институт гриппа МЗ РФ и ² Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой группу родственных по структуре цинкзависимых эндопептидаз, которые синтезируются во всех тканях на всех этапах онтогенеза. Желатиназы ММП-2 и ММП-9 участвуют в процессах клеточной пролиферации, дифференциации, миграции, апоптоза и ангиогенеза; их экспрессия активируется в условиях интенсивной тканевой перестройки, а также в процессе эмбриогенеза и инвазии зародыша в ткань эндометрия. Известно, что при инфекции клеток вирусом гриппа А (ВГА) экспрессия и синтез желатиназ изменяются, что может способствовать распространению вируса. В то же время роль ВГА при нарушении беременности изучена недостаточно, тогда как нарушение самых первых этапов имплантации зародыша в ткань эндометрия может привести к последующим тяжелым последствиям в развитии плода. В связи с этим нами было изучено влияние ВГА на активность желатиназ в перевиваемых клеточных линиях карциномы легких человека (А-549) и клеток эндотелия человека (ECV-304), а также первичной культуре клеток эндометрия человека методом зимографии и иммуноцитохимии. Для исследования были выбраны вирусы ВГ птиц А(Н5N1) и ВГ человека А(Н1N1)pdm и А(Н3N2). Активность ММП-2 и ММП-9 в клетках А-549 была низкой как в контрольных образцах, так и в инфицированных клетках независимо от вирусного штамма. В контрольных образцах от клеток ECV-304 активность ММП-9 была более выраженной, тогда как активность ММП-2 была слабой и сравнима с таковой для линии А-549. При инфицировании клеток эндотелия различными штаммами ВГА различий в интенсивности полос на зимограмме не наблюда-

лось, однако была выявлена интересная особенность. В образцах, инфицированных ВГА, на зимограммах наблюдалось снижение расположения полос, соответствующих ММП-9, относительно контрольных образцов, что свидетельствует об изменении молекулярной массы анализируемых фрагментов. Этот эффект был наиболее ярко выражен для ВГ птиц подтипа А(Н5N1) и менее заметен для ВГ человека А(Н1N1)pdm и А(Н3N2). Возможно, в вирусинфицированных клетках происходит дополнительный процессинг синтезированного (про)фермента. Нормальные клетки эндометрия человека характеризовались высоким уровнем активности ММП-9 и ММП-2. Результаты ферментативной активности желатиназ (зимогенов и активных форм) были сходными как в контроле клеток, так и при вирусной инфекции: во всех образцах отмечен высокий уровень активности обеих ММП. Денситография, выполненная на основе зимографии в геле, подтвердила, что в целом вирусная инфекция не приводила к значительным изменениям в уровнях активности ни ММП-2, ни ММП-9. Различий в расположении полос, соответствующих ММП-9 на зимограмме, при инфицировании разными вирусами гриппа не обнаружено. При иммуноцитохимическом изучении распределения маркерных белков было подтверждено, что нормальные клетки эндометрия обнаруживают высокий уровень активности ММП-9. В контрольных клетках эндометрия человека отмечен высокий уровень синтеза металлопротеиназы ММП-9, который незначительно повышался при заражении ВГ в высокой дозе, но снижался при низкой дозе вирусной инфекции. Эта же закономерность отмечена и относительно синтеза провоспалительного цитокина TNF α , синтез которого был выше при высокой дозе заражения вирусом, но снижался при низкой дозе вирусной инфекции. Нарушение ВГА баланса синтеза провоспалительных цитокинов и металлопротеиназ может вызвать дисфункцию клеток эндометрия, что может повлиять как на функционирование клеток эндометрия, так и на самые ранние стадии эмбриогенеза.

УЧАСТИЕ МИКРОФИЛАМЕНТОВ И ГДФ ВО ВЛИЯНИИ ТЕСТОСТЕРОНА НА МОБИЛИЗАЦИЮ Ca²⁺ ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО ООЦИТОВ СВИНЕЙ. © В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина, Е. А. Олексиевич. Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, prof. kouzmina@mail.ru

Механизм негеномного действия андрогенов зависит от типа клеток-мишеней. В мышечных Т-клетках рецепторы к андрогенам опосредуют вход Ca²⁺ через потенциалнезависимые кальциевые каналы (Benten et al., 1999). В остеобластах крысы тестостерон индуцирует вход внеклеточного Ca²⁺ через потенциалзависимые Ca²⁺-каналы, а также мобилизацию Ca²⁺ из внутриклеточных депо путем активации фосфолипазы С (Lieberherr, Grosse, 1994). Целью работы является идентификация механизмов внутриклеточной сигнализации, вовлеченных в трансдукцию гормонального сигнала (соматотропина — СТГ, «Monsanto») при воздействии тестостерона на основе мониторинга флуктуации содержания Ca²⁺ во внутриклеточных депо ооцитов свиней. В экспериментах использовали яичники половозрелых свиней породы ландрас на стадии фолликулярного роста. Инкубацию выделенных ооцитов

проводили в модифицированной среде Дюльбекко в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} . Концентрацию кальция внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью зонда хлортетрациклина. Интенсивность флуоресценции комплекса хлортетрациклин—мембрана— Ca^{2+} измеряли на люминесцентном микроскопе. В отборе используемых концентраций СТГ, тестостерона, ГТФ и теофиллина руководствовались данными Кузьминой и соавторов (Kuzmina et al., 2007) и Гилла и соавторов (Gill et al., 1988). В отсутствие тестостерона добавление 10 нг/мл СТГ или теофиллина в концентрации 10 мМ стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. При совместном действии СТГ и теофиллина в ооцитах свиней дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо отсутствовало. После обработки ооцитов 1 мкг/мл тестостерона в клетках отмечали освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Последующее добавление к обработанным тестостероном ооцитам СТГ или теофиллина не стимулировало выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо, тогда как при совместном действии СТГ и теофиллина мобилизация Ca^{2+} из внутриклеточных депо активировалась. Очевидно, тестостерон стимулирует образование связи между двумя внутриклеточными депо — рианодин- и IP_3 -чувствительными, которые активируются при добавлении СТГ и теофиллина (Денисенко, Кузьмина, 2010). Об образовании связи между различными внутриклеточными депо свидетельствует выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо при совместном действии СТГ и теофиллина. При обработке ооцитов ингибитором полимеризации микрофиламентов цитохалазином Д в концентрации 10 мкМ мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо, стимулированного совместным действием СТГ и теофиллина, не наблюдали. Если в стимулируемом тестостероном образовании связи между различными внутриклеточными депо участвует гуаниновый нуклеотид ГДФ, то действие ГДФ в данном случае не связано с его переходом в ГТФ, поэтому для ингибирования действия ГДФ мы использовали ГТФ. Внесение в среду инкубации ГТФ в концентрации 100 мкМ стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней. Добавление ГТФ к обработанным тестостероном ооцитам ингибировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, стимулированное при совместном действии СТГ и теофиллина. Таким образом, в стимулированное тестостероном образование связи между различными (рианодин- и IP_3 -чувствительными) внутриклеточными депо кальция вовлечены микрофиламенты и ГДФ.

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА РАЗВИТИЕ ДЕЦИДУАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКИ. © А. П. Домнина, В. М. Михайлов, Н. Н. Никольский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Одна из часто встречающихся причин невынашивания беременности — несостоятельность децидуальной реакции клеток эндометрия. Децидуальные клетки у человека развиваются в эндометрии из клеток-предшественников, локализующихся под эпителием матки (Михайлов, 1998; Mikhailov, 2003). Согласно одной из гипотез, подтвержденной экспериментальными данными, предшественником децидуальных клеток у крыс и человека является костный мозг (KearnsandLala, 1982; Peeletal, 1983; Bulmerand, Sunderland, 1984). Нами было изучено влияние локальной трансплантации клеток костного

мозга (ККМ) в стенку матки псевдобеременных крыс на рост и дифференцировку «ложных» дециду. В качестве ККМ использовали моноклеарную фракцию клеток костного мозга, выделенную из длинных костей конечностей крыс. Индукцию псевдобеременности у крыс осуществляли в фазу «эструс» раздражением влагалища фарадическим электрическим током на аппарате собственной конструкции на стадии «эструс». Этот день обозначали как 1-й день псевдобеременности. На 5-й день псевдобеременности в стенку правого рога матки трансплантировали суспензию ККМ крысы. Контролем служил левый рог матки, в который таким же образом вводили фосфатно-солевой буфер. Животных вскрывали на 11-й день псевдобеременности. На вскрытии обнаруживали хорошо развитую дециду. Оценку результатов проводили гистологическими и морфометрическими методами. Известно, что антимезометральная часть децидуа грызунов образована так называемыми большими децидуальными клетками (БДК), аналогами БДК человека, составляющими основную массу клеток децидуа у человека. Доля антимезометральной части крыс колеблется от 30 до 40 % площади среза децидуа (Михайлов, 1998). На приготавливаемых нами срезах децидуа имеет овальную форму, слегка вытянутую в мезометральном-антимезометральном направлении. По нашему мнению, величина этого расстояния достаточно точно отражает величину площади децидуа и позволяет ее вычислить. Определение доли БДК (%) в величине этого измерения используется для определения возможного влияния того или иного воздействия на дифференцировку основного компонента децидуа, больших децидуальных клеток. Так как децидуа имеет овальную форму, величина диаметра дает представление о размерах и позволяет сравнивать децидуа друг с другом по их площади. По данным морфометрии, срезы децидуа, в которые трансплантировали ККМ крысы, характеризовались увеличением диаметра в мезо-антимезометральном направлении примерно в 1.5—2 раза по отношению к диаметру срезов децидуалевого, контрольного рога. Общая масса опытного рога увеличивалась до 5 раз по сравнению с контрольным. Анализ полученных срезов показывает, что трансплантация ККМ в матку псевдобеременных крыс не нарушает дифференцировку децидуальных клеток и организацию децидуальной ткани, сохраняя в образовавшейся «ложной» дециду взаимное расположение участков дифференцированных клеток. Таким образом, при трансплантации ККМ в условиях ложной беременности было обнаружено стимулирующее влияние на развитие децидуальной оболочки, что открывает дальнейшие перспективы для детального изучения влияния стволовых клеток костного мозга и других мезенхимных стволовых клеток на функциональное состояние эндометрия.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГРИБОВ-ЭКСТРЕМОФИЛОВ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ ЗОНЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ. © А. С. Егорова,¹ Н. Н. Гесслер,¹ Т. В. Кулаковская,² Т. А. Белозерская.²
¹ Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, и
² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушкино, Московская обл.

Возможность исследования грибов-экстремофилов в лабораторных условиях при культивировании на искусственных питательных средах открывает широкие перспек-

тывы для выявления адаптационных механизмов, обеспечивающих способность к выживанию не только в экстремальных условиях внешней среды, но и в условиях конкурентной борьбы при наличии других патогенных микроорганизмов. Объектами исследования служили штаммы *Purpureocillium lilacinum* — индикатора радиоактивного заражения почв в зоне отчуждения Чернобыльской АЭС (10^6 — 10^8 Бк/кг). Этот эвриотопный вид широко распространен как в аэробных, так и в анаэробных условиях, способен паразитировать на насекомых и рыбах, вызывать поражения тканей и органов человека. Очень важными для процессов выживания в экстремальных условиях являются формирование защитных систем от стресса и способность к рациональному использованию энергетических ресурсов при росте на малодоступных источниках питания. Ранее было показано, что штаммы, выделенные с субстратов с фоновым уровнем радиоактивности, осваивали богатую питательную среду лучше, чем голодный агар, а штаммы, выделенные с территории ЧАЭС, осваивали обе среды практически одинаково. Способность существовать при минимальной концентрации источника углерода в среде — характерная особенность чернобыльских изолятов, как и других грибов экстремальных местообитания. Нами выявлено, что у чернобыльского штамма *P. lilacinum* при низкой концентрации доступного субстрата (0.2 % глюкозы) наблюдаются активация роста и повышенная устойчивость к H_2O_2 . При росте на среде с низкой концентрацией глюкозы (0.2 %) эффективность ее потребления у штамма из радиоактивно загрязненной почвы была на 30 % выше, чем у «фонового» штамма из почвы того же типа, что согласуется с повышением дыхательной активности у штамма, резистентного к заражению почв радионуклидами. Это способность к гетеротрофной фиксации CO_2 , обнаруженная у некоторых микроскопических грибов, наличие меланиновых пигментов, повышенное содержание которых выявлено нами у чернобыльских изолятов по сравнению с фоновыми штаммами, а также возможно наличие в клетках штаммов ЧАЭС таких запасающих энергию соединений, как неорганические полифосфаты, присутствующие у многих эукариотических микроорганизмов. Для выявления полифосфатов *in vivo* использовали окрашивание флуоресцентным красителем DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол; Sigma, США). Комплекс DAPI—ДНК флуоресцирует голубым цветом, а комплекс DAPI—полифосфаты — желтым или оранжевым. Флуоресценцию анализировали с помощью фазово-контрастного люминесцентного микроскопа AXIOImagerA1 (Zeiss, Германия), оборудованного соединенной с компьютером видеокамерой AxioCamMRc (Zeiss, Германия). Полифосфаты выявлены у чернобыльского штамма в цитоплазме и вакуолях, а также в районе межклеточных перегородок грибных гиф. Штамм из «фоновых» местообитаний демонстрирует слабое окрашивание на полифосфаты. Таким образом, можно предположить, что наличие неорганических полифосфатов восполняет энергетические потребности грибов-экстремофилов при росте в местообитаниях с минимальным содержанием углеродных субстратов.

СТАБИЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ПРОДУКТА ГЕНА РЕТИНОБЛАСТОМЫ В ПОЛИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ДЕТЕРМИНИРУЕТ ЖИРОВУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ. © О. В. Жидко-

ва, Н. С. Петров, П. С. Шило, Б. В. Попов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, borisvp478@gmail.com

Жировые клетки, избыточное образование которых вызывает ожирение, диабет и другие заболевания, образуются из полипотентных мезенхимных стволовых клеток (МСК). Жировая дифференцировка (ЖД) МСК включает в себя стадии детерминации (ДЖД) с образованием преадипоцитов и терминальной дифференцировки (ТДЖ). Регуляция ТДЖ к настоящему времени хорошо изучена в противоположность механизму детерминации, который определяет ключевое событие специализации клетки — выбор клеточной судьбы. Широко используемой моделью для изучения ДЖД являются эмбриональные фибробласты линии СЗН10Т1/2 (10Т1/2), индуцибельные к дифференцировке в жировые, костные, хрящевые и мышечные клетки. ДЖД осуществляется в делящихся клетках в контексте клеточного цикла, ход которого контролируется белками семейства продукта гена ретинобластомы (pRb). Инактивация pRb в МСК в опытах *in vivo* или *in vitro* лишает их способности образовывать жировые клетки, однако механизм влияния pRb на ДЖД не полностью изучен. Цель настоящего исследования заключалась в оценке роли pRb в ДЖД. В предварительных опытах мы получили и охарактеризовали линии клеток 10Т1/2 со стабильной экспрессией экзогенного pRb дикого ($\Delta B/X$) и мутантного типов с делецией в функциональном Т-антигенсвязывающем домене ($\Delta S/N$) или 8 сайтах фосфорилирования ($\Delta p34$). Гиперпродукция функционального pRb в линиях $\Delta B/X$ и $\Delta p34$ сопровождается значительным ускорением и усилением образования жировых клеток, выявляемых красителем масляным красным, по сравнению с таковой в материнских клетках, но резко замедляется и ослабляется в клетках $\Delta S/N$, экспрессирующих нефункциональный pRb. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) выявляет в индуцированных к жировой дифференцировке клетках $\Delta B/X$, $\Delta p34$ или $\Delta S/N$ соответственно высокий и низкий уровни экспрессии мРНК тканеспецифического индуктора жировой дифференцировки — PPAR γ . Интересно, что экспрессия этого гена изменена подобным образом уже в не индуцированных к ЖД клетках $\Delta B/X$ и $\Delta p34$, а их предварительная синхронизация в состоянии покоя в еще большей степени усиливает уровень индуцированной ЖД. Роль pRb в механизме ДЖД может быть изучена в дальнейших исследованиях особенностей регуляции клеточного цикла и выбора клеточной судьбы в клетках полученных нами линий при оценке взаимодействия pRb соответственно с белками семейства Polycomb и передатчиками сигналов Wnt/ β -катенин.

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

РОЛЬ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В ФОРМИРОВАНИИ И СТАБИЛИЗАЦИИ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ АДГЕЗИОННЫХ КОНТАКТОВ. © И. Ю. Житняк. Научно-исследовательский институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва.

Межклеточные адгезионные контакты (АК) способствуют структурному и функциональному объединению

индивидуальных клеток в тканевые структуры. Зрелые АК ассоциированы с актиновыми микрофиламентами. Характер взаимодействий АК с актиновым цитоскелетом различается в зависимости от типа клеток. В нормальных эпителиальных клетках актиновые филаменты, связанные с АК, направлены вдоль зоны межклеточного контакта и формируют так называемый периферический пучок. В фибробластах АК организованы в индивидуальные кластеры, ассоциированные с прямыми актиновыми пучками. Образование и поддержание АК фибробластов зависят от сократимости актина-миозина. Таким образом, характер внутриклеточного натяжения определяет пространственную организацию АК. Ключевая роль в процессе установления связи между АК и актином принадлежит α -катенину. Неопластическая трансформация может приводить к кардинальным изменениям актинового цитоскелета. В результате исследования эпителиальных клеток линии IAR, трансформированных мутантным онкогеном *RAS* и химическими канцерогенами, нами были получены данные, указывающие на возможность реализации при трансформации эпителиальных клеток двух направлений изменения морфологии, приводящих к одному и тому же результату, критическому для опухолевой прогрессии, — возникновению миграционного фенотипа у неподвижных, плотно сцепленных между собой эпителиальных клеток. Первый тип морфологической трансформации представляет собой классический эпителиально-мезенхимный переход (ЭМП), в ходе которого эпителиальные клетки утрачивают экспрессию E-кадгерина, теряют способность формировать плотные контакты, приобретают фибробластоподобный фенотип и миграционную активность. Такие клетки при высокой плотности популяции растут как многослойная культура, что характерно для трансформированных линий. Второй тип морфологической трансформации, напротив, характеризуется незначительными фенотипическими изменениями, в результате трансформации форма эпителиальных клеток меняется несущественно: клетки приобретают полигональную форму, АК таких клеток содержат E-кадгерин, клетки формируют плотные контакты и в густой культуре растут в виде монослоя. Кроме приобретения локомоторной активности оба направления трансформации имеют другие общие морфологические эффекты. Одним из главных изменений является реорганизация актинового цитоскелета, в частности исчезновение краевого актинового пучка — структуры, типичной для нетрансформированных эпителиальных клеток. Мы обнаружили нарушение целостности, непрерывности тангенциальных эпителиальных контактов, их превращение в индивидуальные

кластеры. АК трансформированных эпителиальных клеток ассоциированы с короткими актиновыми пучками или сгущениями F-актина. Мы предполагаем, что исчезновение краевого актинового пучка в результате трансформации является ключевым моментом, который существенным образом меняет межклеточные взаимодействия, угнетает контактный паралич, приводит к реорганизации АК и разрушению стабильной межклеточной адгезии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 13-04-01423 и 12-04-31453).

ВЛИЯНИЕ МНОГОСЛОЙНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК (8—10 НМ) НА РАННЕЕ РАЗВИТИЕ МОРСКОГО ЕЖА *SCAPHÉCHINUS MIRABILIS* (AGASSIZ, 1863) ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ. © Е. В. Журавель,^{1,4} О. Н. Лукьянова,² О. В. Подгурская,⁴ В. В. Чайка,¹ В. Л. Кузнецов,³ К. С. Голохваст¹ (drooru@mail.ru). ¹ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, ² ТИПРО-центр, Владивосток, ³ Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, и ⁴ Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток.

На сегодняшний день у многослойных углеродных нанотрубок из-за их уникальных свойств имеется широкая область применения: от создания сверхпрочных нитей, композитных материалов, нановесов, нанопипеток, нанопроводов, транзисторов, капсул для активных молекул, для хранения металлов и газов до дисплеев, светодиодов и применения в медицине. Рано или поздно наноматериалы могут попасть в окружающую среду, в том числе морскую воду. Цель данной работы — изучение влияния многослойных углеродных нанотрубок на раннее развитие морского ежа *Scaphéchinus mirabilis* (Agassiz, 1863) при кратковременном культивировании. Эксперименты проводили на МБС «Восток» ИБМ ДВО РАН. Для приготовления тестируемых растворов использовали многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ) производства Института катализа им. Г. К. Борескова СО РАН (Новосибирск, Россия) с диаметром 8—10 нм. Предварительно тестируемые растворы подвергали воздействию ультразвука с помощью ультразвуковой бани «Серьга» (Россия) в течение 5 мин. Тестирование проводили по методу эмбриотеста (Кобаяси и др., 1994), прослеживая раннее развитие эмбрионов и личинок в течение 2 сут. Экспозиции

Количество (в %) нормально развивающихся в растворах МУНТ эмбрионов и личинок (n = 8)

| Концентрация МУНТ, мг/л | Стадии развития | | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | образование оболочки оплодотворения | бластула | гаструла | ранний плутеус | средний плутеус |
| Контроль | 95.71 ± 2.87 | 93.50 ± 1.05 | 96.75 ± 1.83 | 98.00 ± 1.79 | 93.37 ± 2.62 |
| 0.1 | 90.80 ± 12.75 | 95.00 ± 3.66 | 98.00 ± 1.77 | 94.25 ± 5.28 | 91.13 ± 8.76 |
| 1 | 87.75 ± 11.37 | 95.62 ± 3.27 | 96.33 ± 2.50 | 94.50 ± 1.93 ^a | 94.33 ± 5.69 |
| 10 | 92.71 ± 7.02 | 95.70 ± 2.42 ^a | 96.75 ± 2.31 | 94.87 ± 1.73 ^a | 98.12 ± 0.99 ^a |
| 100 | 83.83 ± 5.67 ^a | 94.33 ± 3.00 | 91.37 ± 3.70 ^a | 93.55 ± 5.37 | 84.83 ± 16.68 |

^a Отличие от контроля достоверно при $P \leq 0.05$.

в тестируемых растворах, содержащих МУНТ (1 ч), подвергали как яйцеклетки, так и сперматозоиды. Далее развитие эмбрионов и личинок продолжалось в присутствии тестируемого вещества в сосуде. Температуру во время опытов поддерживали на уровне 17—17.5 °С. Соленость воды составляла 33.7 ‰, рН — 8.18. Результаты исследования для удобства приведены ниже в таблице.

Развитие тест-объекта происходило сходно с контролем, достоверное отличие от контроля выявлено только в растворах с самыми большими концентрациями (см. таблицу). Таким образом, кратковременное воздействие МУНТ не вызывало нарушения эмбрионального и личиночного развития *S. mirabilis*. Полученные данные вполне согласуются с результатами других исследователей (Гусев и др., 2012), что позволяет отнести многослойные углеродные нанотрубки (8—10 нм) во всех исследованных концентрациях к 3-му классу опасности аналогично обычной саже.

Список литературы

- Гусев А. А., Федорова И. А., Ткачев А. Г., Годымчук А. Ю., Кузнецов Д. В., Полякова И. А. 2012. Острое токсическое и цитогенетическое действие углеродных нанотрубок на гидробионтов и бактерии. Российские нанотехнологии. 7 (9) : 71—77.
Кобаяси Н., Найдено Т. Х., Ващенко М. А. 1994. Стандартизация биотеста с использованием зародышей морского ежа. Биол. мор. 20 (6) : 457—464.

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕАСОМ И АССОЦИИРОВАННЫХ С НИМИ БЕЛКОВ. © Ю. Я. Зайкова,¹ Н. А. Барлев,^{1–3} А. С. Цимоха.¹ ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vat-julia@yandex.ru ² Университет г. Лестер, Великобритания, и ³ С.-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет).

Убиквитин-протеасомная система деградации белка осуществляет программированный протеолиз и процессинг различных регуляторных белков, участвующих во множестве клеточных процессов: регуляция транскрипции, репарация ДНК, продвижение клетки по клеточному циклу, иммунный ответ, апоптоз. 26S протеасома, состоящая из протеолитической коровой частицы (20S протеасомы) и одного или двух 19S регуляторов, является протеолитическим «ядром» этой системы. Известно, что протеасомы кроме функции регулируемого протеолиза также обладают эндорибонуклеазной и геликазной активностями. Кроме того, протеасомы ассоциированы со множеством регуляторных белков, а также с малыми некодирующими РНК. Согласно недавним исследованиям нашей лаборатории, с PSMA3 ($\alpha 7$) субъединицей 20S протеасомы *in vitro* связываются белки, вовлеченные в регуляцию транскрипции, репарацию ДНК, белки цитоскелета, УПС и шапероны. В последние годы исследований протеасом в литературе появились данные об их присутствии во внеклеточном пространстве. Показано, что протеасомные белки присутствуют в составе экзосом. Биологические функции внеклеточных протеасом до сих пор неясны, однако были выявлены различия в количестве экспортируемых из клеток в плазму протеасом при опухолевой трансформации клеток. В настоящей работе впервые проведен iTRAQ масс-спектрометрический анализ различных популяций протеасом (внутри- и внеклеточных) и выявлены

посттрансляционные модификации субъединиц 26S протеасом. Обнаружены новые сайты убиквитинирования и ацетилирования протеасомных субъединиц $\alpha 2$ (K196), $\alpha 4$ (K189 и K234), $\alpha 6$ (K217) и Rpn6 (A2). Обнаружено, что в составе внеклеточных протеасом присутствует стандартный набор из субъединиц 26S протеасомы, а также регулятор PA200, который, как полагали ранее, локализуется лишь в ядре клеток. Получен первичный скрининг белков, взаимодействующих с протеасомами. Показано, что с протеасомами ассоциированы белки, участвующие в таких основных клеточных процессах, как транскрипция и репликация, репарация ДНК, сплайсинг и процессинг РНК, трансляция, передача сигнала и транспорт. Кроме того, с протеасомами ассоциированы шапероны, белки цитоскелета, метаболизма и УПС. Идентификация в числе белков, ассоциированных с протеасомами, шаперонов и белков цитоскелета не противоречит литературным данным. Методом иммуноблотинга мы подтвердили взаимодействие протеасом с девятью белками, выбранными из полученного белкового скрининга случайным образом. Используя антитела к белкам цитоскелета Filamin-A, Myosin-9, Beta-actin, Tubulin alpha и Tropomyosin alpha-3, мы обнаружили, что с протеасомами из среды ассоциируются больше такие белки, как Tubulin alpha и Tropomyosin alpha-3, в то время как в цитоплазме с протеасомами взаимодействуют Filamin-A и Myosin-9. Мы обратили внимание на тот факт, что Tubulin alpha в цитоплазме представлен двумя изоформами, что может быть обусловлено протеолизом белка протеасомами. Анализ выявленных белков, ассоциирующихся с протеасомами, является отправной точкой в дальнейших исследованиях белков корегуляторов секреции протеасом клетками.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01397), правительства Санкт-Петербурга и в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (№ 8787).

СТЕПЕНЬ СПИРАЛИЗАЦИИ СУБСТРАТНЫХ БЕЛКОВ ОПРЕДЕЛЯЕТ ХАРАКТЕР РАСПЛАСТЫВАНИЯ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ. © В. П. Иванова,¹ З. В. Ковалева.²

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Необходимым условием для полноценной дифференцировки клеток является их распластывание на субстрате, свойствами которого определяются особенности протекания этого процесса. Исследовали влияние трипептида GER на процессы распластывания фибробластов на следующих субстратах: необработанный культуральный пластик, иммобилизованные на пластике желатин и фибронектин. Показано, что пептид увеличивает количество распластанных клеток на всех использованных субстратах. При этом максимальный стимулирующий эффект пептид проявлял при распластывании клеток на фибронектине и минимальный — на желатине. Известно, что вскоре после первого контакта клеток с субстратом в местах локализации этих контактов формируются фокальные комплексы, в состав которых входят $\alpha_3\beta_3$ -интегрины, паксиллин, талин, винкулин и другие компоненты. Часть

фокальных комплексов подвергается разборке в ходе распластывания клеток, а оставшиеся фокальные комплексы укрупняются, вовлекая в свой состав дополнительные белки (зиксин, тензин и $\alpha_5\beta_1$ -интегрины), и затем формируют более зрелые фокальные контакты. Возможно, в ходе распластывания фибробластов на фибронектине после воздействия пептида быстрее происходит переход от лабильных фокальных комплексов, в которых обычно отсутствуют $\alpha_5\beta_1$ -интегрины, к ранним фокальным контактам с высоким содержанием $\alpha_5\beta_1$ -интегринов по сравнению с распластанными на желатине клетками, обработанными пептидом. Адгезированные фибробласты, как известно, секретируют молекулы фибронектина, которые после укладки в фибриллы ассоциируют с $\alpha_5\beta_1$ -интегринами. Связывание указанных интегринов с фибронектиновыми фибриллами, укладку которых может ускорять исследованный пептид, будет способствовать не только объединению в группы уже существующих фокальных контактов, но и формированию новых адгезий. Т. е. большее количество фокальных адгезий, образуемых обработанными пептидом клетками в единицу времени, приведет к увеличению числа распластанных клеток на фибронектине. При высеве клеток на желатин пептид также активизирует указанные процессы, но с меньшей интенсивностью. Не исключена также вероятность того, что в ходе распластывания фибробластов на разных субстратах пептид способен активировать образование различающихся по составу клеточно-субстратных адгезионных структур. Так, при распластывании на желатине клетки, обработанные пептидом, формируют сначала малые фокальные комплексы, активной единицей которых являются $\alpha_5\beta_3$ -интегрины, с последующей трансформацией этих комплексов в более зрелые фокальные контакты. У клеток, распластанных на фибронектине в тех же условиях, могут сразу собираться крупные фокальные контакты, созреванию которых способствует включение в их состав $\alpha_5\beta_1$ -интегринов. В результате распластывание клеток на фибронектине будет происходить быстрее, чем на желатине.

Формирующийся ответ клеток в ходе распластывания зависит не только от плотности молекул ВКМ на твердой поверхности, но и от пространственной организации субстратных белков. Различная степень спирализации молекул желатина (денатурированный белок) и фибронектина (нативный белок) является одной из возможных предпосылок для образования качественно и количественно различных модулей связывания с клетками, инкубированными с пептидом GER.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ К РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОМУ ВИРУСУ ЧЕЛОВЕКА. © *Е. И. Исаева, О. А. Лопатина, О. А. Гринкевич, Е. Н. Притчина, Р. Я. Подчерняева.* Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Министерства здравоохранения РФ, Москва, immunol.lab@mail.ru

Репликация респираторно-синцициального вируса (РСВ) в клеточных линиях человека изучена методом ОТ-ПЦР. На перmissивность к РСВ исследовали 7 онкогенных и 3 нормальные перевиваемые клеточные линии человека. Генетическое исследование инфицированных супернатантов показало присутствие РНК РСВ в 5 клеточных линиях — A549, Hep-2, Chang Conjunctiva, HeLa и HT29. В культуре Chang Conjunctiva РНК РСВ выявля-

лась с 3-х по 6-е сут после заражения, пик репликации вируса определялся на 4-е сут. В клеточной линии Hep-2 репродукция РСВ выявлялась со 2-х по 5-е сут с наибольшим уровнем вирусной нагрузки на 3-и сут. В клетках карциномы легкого A549 РНК определялась с 5-х по 8-е сут, пик вирусной активности приходился на 6-е сут. В культуре клеток HT29 репродукция вируса происходила наиболее медленно — с 6-х по 12-е сут после инфицирования, достигая максимума лишь к 8-м сут. Изучение вирусной активности РСВ в двукратных разведениях надосадочной жидкости клеточных культур показало, что наиболее чувствительными к изучаемому вирусу являются линии клеток эпителиальной карциномы Hep-2, менее — линия клеток Chang Conjunctiva, клетки карциномы кишечника HT29 и легкого A549. Из 9 исследованных клеточных линий животных способными поддерживать репродукцию РСВ оказались 5 — почки кошки CRFK, почки эмбрионов макак-резусов LLC-MK2, почки обезьяны Vero, почки свиньи СПЭВ и фибробластные клетки кошки CC-81. Клеточная линия мыши L₉₂₉, культура мозга хорька Mpf и почек собаки MDCK к РСВ оказались нечувствительны.

Наиболее чувствительной к РСВ оказалась культура почки кошки CRFK, в меньшей степени репродукция вируса проходила в культурах почек эмбрионов макак-резусов LLC-MK2 и почек обезьяны Vero, существенно слабее — в линиях почки свиньи СПЭВ. В клетках почек обезьяны Vero РНК РСВ выявлялась с 3-х по 10-е сут, и пик репродукции определялся к 4-м сут. В культуре почек эмбрионов макак-резусов LLC-MK2 репродукция РСВ выявлялась со 2-х по 9-е сут с наиболее высоким уровнем вирусной нагрузки на 3-и сут. При этом логарифмические показатели двукратных разведений супернатантов клеточной линии LLC-MK2 превышали таковые в культурах клеток почек обезьяны Vero и почек свиньи СПЭВ. Наиболее активно РСВ накапливался в клеточной линии почек кошки CRFK. Детекция РНК вируса показала, что репликация РСВ в этой культуре начинается значительно раньше, чем в других клеточных линиях человека и животных, — со 2-х сут после инфицирования. Пик вирусной активности в надосадочной жидкости культуры почек кошки был выше (≥ 3.0 lg) и определялся раньше по срокам — на 2—3-и сут, чем в других культурах клеток животных. Наиболее чувствительной к РСВ из клеточных линий человека является Hep-2 (4.0 lg), из линий животных — почки кошек CRFK (≥ 3.0 lg). Ранние сроки начала репликации РСВ и высокая вирусная нагрузка в этих культурах клеток дают возможность изучения молекулярной биологии вируса, патогенеза вызываемой им инфекции и проведения скрининга противовирусных препаратов *in vitro*.

АКТИВАЦИЯ КЛЕТОЧНОГО КАННИБАЛИЗМА ПРИ ЧАСТИЧНОЙ РАЗБОРКЕ МИКРОТРУБОЧЕК. © *О. П. Кисурин-Евгеньева, Г. Е. Онищенко.* Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Опухолевые клетки эпителиального происхождения способны к клеточному каннибализму (КК): они могут поглощать такие же клетки. Внедрение одной клетки в другую и дальнейшая лизосомерноопосредованная деградация связаны с работой цитоскелета. При полной деполимеризации актиновых филаментов и (или) микротрубочек

КК блокируется. Однако механизмы этого процесса и роль системы микротрубочек в осуществлении КК во многом неясны. Работа проводилась на клетках карциномы молочной железы (MCF7). В норме клетки-каннибалы составляют около 1 %. Частичная разборка микротрубочек с помощью винкристина (50 нМ), вызывающая гибель 50 % клеток через 72 ч, не препятствует КК. Наоборот, наблюдается стимуляция КК. Доля клеток-каннибалов увеличивается в 5 раз (до 5 %) через 24 ч культивирования, затем снижается до 3 % через 48 ч. При этом как клетки-каннибалы, так и поглощенные клетки способны вступать в К-митоз. Поглощенные клетки сохраняют эту способность дольше, чем клетки-каннибалы. Как клетки-каннибалы, так и поглощенные клетки могут заканчивать К-митоз и превращаться в клетки с микроядрами. В целом клетки-каннибалы чаще являются микроядерными, чем поглощенные клетки. Поглощенная клетка на начальных этапах КК образует адгезивные контакты с клеткой-каннибалом. Как правило, в поглощаемой клетке отсутствуют микротрубочки, в цитоплазме клетки-каннибала присутствуют отдельные короткие микротрубочки. Окрашивание лизосомного компартмента показало, что частичная разборка микротрубочек не препятствует процессам переваривания. В культуре встречаются полиплоидные клетки-каннибалы, содержащие несколько поглощенных клеток, находящихся на разных стадиях переваривания. Гибель клеток культуры MCF7 при воздействии винкристина опосредуется активацией белка p53 в клетках, имеющих нарушения ДНК (в том числе в клетках с микроядрами). Активация белка p53 в клетках-каннибалах равновероятна для одноядерных и микроядерных клеток, в то время как в популяции преобладают p53-положительные клетки с микроядрами. Активация белка p53 может приводить как к гибели клетки, так и к задержке продвижения по клеточному циклу. В поглощенной клетке активации p53 не наблюдается. Таким образом, частичная разборка микротрубочек стимулирует процессы КК. И клетка-каннибал, и поглощенная клетка способны вступать в К-митоз. Клетки с микроядрами и полиплоидные клетки более активно поглощают внедряющиеся клетки. Блокирование продвижения по клеточному циклу клеток-каннибалов (и их возможная гибель) при воздействии винкристина связано с активацией белка p53, гибель поглощенных клеток происходит с помощью лизосомоопосредованной деградации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01518-а).

КЛЕТКИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ПОСТНАТАЛЬНОМ НЕЙРОГЕНЕЗЕ, И ПРОБЛЕМА СНИЖЕНИЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ СТАРЕНИИ. © Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик. Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, iemtoprhol@yandex.ru

Проблема постнатального нейрогенеза — ключевая проблема фундаментальной нейробиологии и восстановительной неврологии. В настоящее время наиболее интенсивно изучается постнатальный нейрогенез в субвентрикулярной пролиферативной зоне (СВЗ), которая располагается в области латеральных стенок боковых

желудочков конечного мозга. Структурная организация СВЗ уникальна для головного мозга, поскольку она сохраняет отдельные черты эмбриональных пролиферативных зон — вентрикулярной и субвентрикулярной. Она является нейрогенной нишей с особым микроокружением, которое способствует длительной персистенции стволовых клеток, их пролиферации и направленной миграции дифференцирующихся нервных и глиальных клеток. Клеточный состав СВЗ за последние годы неоднократно уточнялся в связи с использованием новых дифференцировочных маркеров и новых методов флуоресцентной визуализации объектов, а также с получением результатов культивирования выделенных из СВЗ прогениторных клеток. Из применяемых для селективного выявления клеток СВЗ дифференцировочных маркеров наиболее информативными оказались белки, ассоциированные с цитоскелетом. Эти белки хорошо сохраняются при использовании различных способов фиксации материала и позволяют четко выявлять клетки, имеющие сложную форму. Одним из таких белков является нестин — маркер нейральных стволовых клеток СВЗ. Другой маркер стволовых клеток — Musashi-1 (Msi-1) — не относится к белкам цитоскелета и экспрессируется в большем числе типов клеток, чем нестин. После ишемического воздействия, особенно в случае развития инфаркта мозга, экспрессия Msi-1 в различных клетках мозга изменяется. Виментин является хорошим маркером эндимы интактного мозга. Он также участвует в построении гетеродимеров с нестином при формировании промежуточных филаментов нейральных стволовых клеток и активированных астроцитов. Даблкортин — маркер нейробластов и дифференцирующихся нейронов. Он принимает непосредственное участие в реорганизации цитоскелета и процессе транслокации ядра (одного из ключевых процессов, происходящих при миграции нейробласта). Iba-1/AIF1 — белок, обнаруживаемый преимущественно в микроглиоцитах, — хотя и не является маркером нейрогенных клеток, позволяет с высокой селективностью определять микроглиальные клетки в составе СВЗ. Микроглиоциты в СВЗ способны пролиферировать, однако остается неясным, какова дальнейшая судьба образовавшихся дочерних клеток. Многочисленные исследования показывают, что при старении нейрогенез в СВЗ замедляется, но при этом не происходит подавления пролиферативной активности клеток. Регистрация погибающих клеток показывает, что апоптотные тельца у старых животных чаще всего ассоциируются с группами мигрирующих нейробластов. При этом реакция на астроцитарный белок промежуточных филаментов (GFAP) в СВЗ усилена. Таким образом, в снижении восстановительного потенциала нейрогенных зон головного мозга при старении определенную роль играют усиление апоптоза клеток-предшественников и дифференцирующихся нейронов, а также локальный глиоз, нарушающий структурную организацию нейрогенной ниши.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04—1693а).

ВОВЛЕЧЕНИЕ Ras/Raf/MEK/ERK-КИНАЗНОГО КАСКАДА В РЕГУЛЯЦИЮ HDAC-ИНДУЦИРОВАННОГО СТАРЕНИЯ. © Е. Ю. Кочеткова, С. Г. Зубова, Т. В. Быкова, Т. В. Поспелова. Институт цитологии РАН,

Санкт-Петербург, и С.-Петербургский государственный университет, lena.linnaea@gmail.com

В работе исследовали роль Ras/Raf/MEK/ERK-киназного каскада в регуляции старения, индуцированного ингибитором гистоновых деацетилаз (HDAC1) бутиратом натрия (NaBut). Работа выполнена на эмбриональных фибробластах крысы, трансформированных онкогенами *E1A+cHa-Ras*. Вовлечение ERK-каскада в активацию NaBut-индуцированного старения изучали с помощью ингибитора этого каскада PD0325901 (PD). Реализацию программы старения оценивали по блоку клеточного цикла, гипертрофии, морфологическим изменениям и появлению ассоциированной со старением β -галактозидазной активности (SA- β -Gal). Ингибитор PD, подавляя активность киназы MEK, приводит к снижению количества фосфо-форм ERK1,2 в течение первых 30 мин действия, однако к 5-м сут действия PD фосфорилирование ERK1,2 частично восстанавливается. Методом цитофлуориметрии показано, что ингибирование MEK-ERK-каскада PD в течение 5 сут вызывает подавление пролиферации за счет блока G_1/S клеточного цикла и снижения доли клеток в S-фазе. Действие PD приводит к снижению пролиферативной активности клеток по сравнению с контролем, тогда как совместное действие PD+NaBut полностью подавляет пролиферацию. У клеток, культивированных с PD и с NaBut+PD, уже в 1-е сут наблюдаются характерные для старения морфологические изменения, которые усиливаются к 5-м сут действия агентов, и в это же время выявляется SA- β -Gal-активность. ERK-каскад участвует в регуляции комплекса mTORC1 — основного регулятора программы старения — за счет ингибирующего фосфорилирования негативного регулятора mTORC1 комплекса TSC1,2. Для выяснения роли ERK-каскада в регуляции комплекса mTORC1 в процессе HDAC-индуцированного старения использовали ингибитор PD. Активность mTORC1 оценивали методами иммунофлуоресценции и Вестерн-блоттинга по степени фосфорилирования основных мишеней mTORC1 — рибосомного белка S6 и ингибитора инициации элонгации 4E-BP1. Обнаружено, что при действии PD и при совместном действии NaBut+PD в течение 5 сут наблюдается активация mTORC1-каскада, согласно данным по накоплению фосфоформ белков S6 и 4E-BP1. Следовательно, отмена фосфорилирования комплекса TSC1,2 киназами ERK1,2 не приводит к подавлению активности mTORC1, а скорее к его дополнительной активации, что позволяет предполагать возможность существования иного способа регуляции mTORC1, не связанного с фосфорилированием TSC1,2. Одной из характеристик клеточного старения является необратимость блока клеточного цикла. Показано, что старение, индуцированное NaBut, обратимо при отмывке через 3 сут его действия, но через 5 сут становится необратимым. Для проверки обратимости действия PD клетки отмывались от ингибитора через 3 и 5 сут его действия. Обнаружено, что действие PD обратимо как через 3, так и через 5 сут, так как после удаления ингибитора исчезает гипертрофия и восстанавливается пролиферация, при этом многие пролиферирующие клетки остаются SA- β -Gal-позитивными. Возможно, SA- β -Gal-активность в данном случае может быть показателем высокой лизосомной активности, связанной с аутофагическими процессами. При совместном действии PD+NaBut восстановления пролиферации не происходит уже через 3 сут действия агентов, причем клетки сохраняют фенотипиче-

ские черты старения, включая SA- β -Gal-активность. Таким образом, программа старения, вызванная действием NaBut, более эффективно реализуется в присутствии ингибитора MEK/ERK-каскада PD. Это может быть связано с аддитивным эффектом ингибиторов на комплекс mTORC1, приводящим к более быстрому и необратимому подавлению клеточного цикла и активации процесса старения в исследованных трансформантах.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОРБЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ БИОМАТЕРИАЛОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ. © Е. А. Кувшинова, В. А. Кирсанова, И. К. Свиридова, С. А. Ахмедова, Я. Д. Шанский, Н. С. Сергеева. Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена Министерства здравоохранения РФ.

Остеопластические свойства биоматериалов, используемых для замещения костных дефектов, в первую очередь зависят от их способности консолидироваться с окружающими тканями. Консолидация обеспечивается возможностью заселения их живыми клетками, способностью поддерживать пролиферацию и(или) дифференцировку клеток, т. е. их поведением, адекватным микроокружению. Известно, что «хороший» материал должен обладать развитым микрорельефом поверхности и сквозной пористостью, обеспечивающей прорастание сосудов, нервных окончаний и проникновение питательных веществ и газов. Кроме того, поверхность имплантата должна обладать способностью адсорбировать из тканевой жидкости биологически активные молекулы, что определяет ее матриксные (для клеток) свойства. В последнее время разрабатываются различные методы модификации поверхности остеопластических материалов, одним из которых является сорбция на ней различных белков и пептидов, имитирующих межклеточный матрикс нормальной ткани. В частности, сорбция на биоматериалах факторов роста (ФР) должна оказывать стимулирующее влияние на последующую адгезию клеток и формирование тканевых структур на поверхности и в поровых пространствах имплантата, способствуя его биорезорбции.

Цель исследования — разработка методов сорбции белка на поверхности остеопластических биоматериалов натурального и синтетического происхождения.

Исследовали сорбционную способность гранулированной пористой керамики — гидроксиапатита (ГА), карбонатгидроксиапатита (КГА), октокальцийфосфата (ОКФ) — и скелета натуральных кораллов (НК) сем. Асгорога. Адгезионную способность материалов исследовали в отношении растворов бычьего сывороточного альбумина (БСА) и лизата тромбоцитов (ЛТ) человека. ЛТ получали по оригинальной методике из тромбоцитарной массы 12 доноров. Количество адсорбированного белка оценивали по разнице его концентраций в растворах, до и после выдерживания в нем материала (24 ч, 22 °С). Цитосовместимость и матриксные (для клеток) свойства поверхности материалов исследовали на культуре иммортализованных фибробластов человека (ФЧ) с помощью МТТ-теста.

Установлено, что все использованные в работе материалы обладают цитосовместимостью, выраженными матриксными для клеток свойствами поверхности и под-

держивают их активную пролиферацию. Оработана методика сорбции БСА и белков ЛТ человека на поверхность биоматериалов. Установлена зависимость количества адсорбированного на поверхности материала белка от его исходной концентрации, что позволяет оценить «сорбционную емкость» каждого материала. Показано, что наибольшей сорбционной способностью обладает ОКФ (53.7—97.1%), а наименьшей — ГА и НК (17.7—30.5 и 13.2—25.5 % соответственно). Мы полагаем, что высокая сорбционная способность ОКФ объясняется принципиально отличным строением этого материала от других видов пористой керамики и НК на наноровне.

Высокая сорбционная способность ОКФ открывает новые возможности для использования его в качестве средства доставки факторов роста, а также лекарственных препаратов, востребованных при замещении костных дефектов биоматериалами.

АПОПТОЗ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ В ОВАРИАЛЬНЫХ Фолликулах как индикатор функционального статуса ооцита коров. © Т. И. Кузьмина,¹ Х. Торнер,² Х. Альм.² ¹Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, prof. kouzmina@mail.ru и ²Институт биологии сельскохозяйственных животных, Думмерсторф, Германия.

Созревание ооцита *in vivo* — результат сложных межклеточных взаимодействий гаметы и соматических клеток овариального фолликула, в первую очередь клеток гранулезы и кумулюса. Популяция донорских ооцитов, выделяемых из яичников коров с целью их созревания *in vitro* для использования в клеточных репродуктивных технологиях, гетерогенна. Разработка методов раннего прогнозирования функционального статуса ооцитов позволит интенсифицировать один из важнейших этапов технологии экстракорпорального созревания ооцитов — отбор ооцитов, компетентных к дальнейшему развитию *in vitro*. Мы проанализировали статус хроматина (уровень апоптозов) соматических клеток фолликулов (гранулеза и кумулюс) разного диаметра, содержащих растущие и завершившие фазу роста ооциты. В экспериментах использовали яичники коров черно-пестрой породы. Отбор фолликулов проводили с учетом следующих параметров — диаметр (D), тургор и степень васкуляризации. Для анализа использовали фолликулы трех групп (D менее 3, 3—5, 6—8 мм) с высоким тургором и обширной сетью капилляров. Функциональный статус ооцитов оценивали с помощью витального красителя бриллиантового кристаллического голубого (BCB, Sigma) (Alm et al. *Theriogenology*, 2005. 63 : 2194—2205). После 90-минутной экспозиции с красителем ооплазма завершивших стадию роста ооцитов оставалась окрашенной, в растущих ооцитах окраска отсутствовала. BCB детерминирует внутриклеточную активность фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Фермент активен в растущих ооцитах, в клетках, завершивших фазу роста, его активность падает. Исследованию подвергались клетки гранулезы и кумулюса предварительно BCB-тестированных ооцитов из 169 фолликулов. В том числе: по 3200 клеток гранулезы и кумулюса 32 завершивших фазу роста ооцитов и по 2600 клеток кумулюса и гранулезы 26 растущих ооцитов

из фолликулов D < 3 мм; по 4900 клеток кумулюса и гранулезы 49 завершивших фазу роста ооцитов и по 1400 клеток гранулезы и кумулюса 14 растущих ооцитов из фолликулов D 3—5 мм; по 3800 клеток гранулезы и кумулюса 38 завершивших фазу роста ооцитов и по 1000 клеток гранулезы и кумулюса 10 растущих ооцитов из фолликулов D 6—8 мм. Уровень апоптозов в соматических клетках определяли методом TUNEL (Alm et al. *Theriogenology*, 2000. 53 (1) : 447). Анализ апоптозов в клетках гранулезы коров выявил достоверные различия между уровнем апоптозов в гранулезных клетках фолликулов всех размеров, содержащих завершившие фазу роста или растущие ооциты (D фолликулов < 3 мм — 15 против 9%; D фолликулов 3—5 мм — 18 против 11%; D фолликулов 6—8 мм — 17 против 12%, $P < 0.05$). Наименьший уровень апоптозов в гранулеза фолликулов, где содержались завершившие фазу роста ооциты, наблюдали в фолликулах D < 3 мм, аналогичная картина отмечена в фолликулах, содержащих растущие ооциты. Особо следует отметить отсутствие достоверных различий между долями (процентами) кумулюсных клеток с ядрами в состоянии апоптоза ооцитов коров, завершивших фазу роста и растущих, в то время как клетки гранулезы из фолликулов разного диаметра характеризуются различными показателями уровня апоптоза в зависимости от статуса ооцитов (завершившие рост и растущие), выделенных из этих фолликулов. Последнее позволяет расценивать уровень апоптозов в клетках гранулезы овариального фолликула как индикатор функционального статуса развивающегося в нем ооцита.

ИНГИБИТОР 12-ЛИПОКСИГЕНАЗ МОДУЛИРУЕТ ВЛИЯНИЕ МОЛИКСАНА НА ВНУТРИКЛЕТочную КОНЦЕНТРАЦИЮ Ca²⁺ В МАКРОФАГАХ. © Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, А. А. Наумова, Н. И. Крутецкая, В. Г. Антонов. Кафедра биофизики биолого-почвенного факультета С.-Петербургского государственного университета, cozzy@mail.ru

В настоящее время разработано и введено в клиническую практику значительное число дисульфидсодержащих препаратов, изменяющих редокс-состояние и оказывающих физиологически значимое действие на клетки. Так, препарат моликсан (ФАРМА-ВАМ, Москва), комплекс динатриевой соли окисленного глутатиона с Pt в наноконцентрации и нуклеозида инозина, имеет противовирусный, иммуномодулирующий и гепатопротекторный эффекты; применяется в терапии острого и вирусного гепатитов В и С, микст-гепатита и цирроза печени. Однако механизмы клеточного и молекулярного действия этого препарата далеки от полного понимания. Ранее нами было впервые обнаружено, что моликсан увеличивает внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ [Ca²⁺]_i, вызывая мобилизацию Ca²⁺ из тапсигаргин-чувствительных Ca²⁺-депо и последующий вход Ca²⁺ в перитонеальные макрофаги крысы. Полиненасыщенная арахидоновая кислота (АК) и продукты ее окисления являются одной из важнейших сигнальных систем в клетках. Ферменты и продукты метаболизма АК имеют высокую редокс-чувствительность и являются мишенью для окисляющих и восстанавливающих агентов. В перитонеальных макрофагах АК, освобождаемая из мембранных фосфолипидов под действием фосфолипазы A₂, легко окисляется по циклооксигеназному и липоксигеназному путям. Ранее нами

было показано, что ингибиторы циклооксигеназ предотвращают увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое моликсаном в макрофагах. Известно, что активность липоксигеназ зависит от баланса глутатиона в клетке. Так, 12-липоксигеназы содержат множественные остатки цистеина и легко подвергаются S-глутатионилированию. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать возможную роль 12-липоксигеназного пути окисления АК во влиянии моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы. Для этого был использован специфический ингибитор 12-липоксигеназ флавоноид байкалейн. Применением флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM показано, что предварительная инкубация клеток с 10 мкМ байкалейна в течение 5 мин до введения 100 мкг/мл моликсана приводит к практически полному подавлению Ca^{2+} -ответов, индуцированных моликсаном. Это свидетельствует об участии 12-липоксигеназного пути окисления АК в регуляторном влиянии моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах. Показано также, что добавление 10 мкМ байкалейна на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного моликсаном, вызывает подавление депозависимого входа Ca^{2+} и возвращение $[Ca^{2+}]_i$ к базальному уровню. Это подтверждает наши данные об ингибировании байкалейном депозависимого входа Ca^{2+} , индуцированного пуринергическими агонистами АТФ и УТФ и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязониковой кислотой в макрофагах крысы. На основании результатов, полученных в настоящей работе и ранее, можно предположить, что моликсан трансактивирует рецепторы с собственной тирозинкиназной активностью и запускает сигнальный каскад, в котором участвуют тирозинкиназы, элементы цитоскелета, а также ферменты и(или) продукты циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления арахидоновой кислоты, что приводит к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

НА РАННЕЙ И ПОЗДНЕЙ СТАДИИ МАКРОФАГАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ АКТИВИРУЮТСЯ РАЗНЫЕ ПУТИ РЕЦЕПТОРОПОСРЕДОВАННОГО ФАГОЦИТОЗА. © А. В. Курьшина,¹ М. В. Ерохина,^{1,2} Г. Е. Онищенко.¹ ¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, frasska@gmail.com и ²Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, Москва.

Фагоцитоз является фундаментальным свойством макрофагов как клеток врожденного иммунитета, и изучение его механизмов является важной научной и медицинской задачей. Различают специфический (через Fc-рецептор, FcR) и неспецифический фагоцитоз (другие варианты). В данной работе для изучения эффективности реализации механизмов фагоцитоза в культуре клеток ТНР-1 (моноцитарная лейкемия человека) было проведено исследование активации специфического и неспецифического путей фагоцитоза на 3-и и 7-е сут макрофагальной дифференцировки. Для этого клеткам в среду добавляли латексные шарики размером 1 мкм с разными поверхностными маркерами — желатином (Gl), маннозой (Mn) и Fc-фрагментом IgG — на 60 мин (анализ фагоцитарной активности клеток проводили каждые 15 мин). На раннем сроке дифференцировки наиболее эффективно реализуется фагоцитоз Fc-латексных частиц: через 30 мин после добавления частиц в среду культивирования вся популяция клеток характеризуется фагоцитарной

активностью через FcR. При добавлении Mn-частиц 15—20 % клеток не являются фагоцитирующими. На поздней стадии дифференцировки наблюдается более активное связывание Mn-частиц, что свидетельствует об усилении экспрессии маннозного рецептора (MnR) и его корецепторов на мембране клеток. При этом полной активации фагоцитоза через FcR не наблюдается: в популяции сохраняется 10—12 % нефагоцитирующих клеток. Существуют и различия в локализации латексных частиц внутри клеток. При Fc-опосредованном фагоцитозе наблюдаются преимущественное движение частиц в область клеточного центра и их распределение по небольшим группам в эндосомном компартменте, что свидетельствует об участии микротрубочек в данном процессе. При активации неспецифического фагоцитоза преобладает равномерное распределение Mn- и Gl-частиц по цитоплазме, что свидетельствует об отсутствии направленного движения фагосом в эндосомном компартменте. Методом СЭМ была исследована поверхность плазматической мембраны клеток при активации разных путей фагоцитоза. Если при Fc-опосредованном фагоцитозе на плазматической мембране клеток наблюдаются многочисленные выросты, раффы и псевдоподии, что свидетельствует об активном захвате латексных частиц, то при инкубации клеток в среде с Mn-частицами меняется состояние плазматической мембраны. Происходит сглаживание поверхности, края клеток становятся четкими, ровными, отсутствуют дополнительные выросты и инвагинации. Полученные результаты показывают, что на ранней стадии макрофагальной дифференцировки в популяции преобладает фагоцитарная активность клеток через FcR, тогда как на более поздней — через MnR. Каждый из изученных путей фагоцитоза характеризуется особенностями реакции клеточной поверхности на присутствие определенных латексных частиц и их внутриклеточной локализации. Для клеток ТНР-1 известно, что они характеризуются секрецией провоспалительных цитокинов при запуске макрофагальной дифференцировки, и выброс цитокинов падает с увеличением сроков дифференцировки. Таким образом, можно предположить, что при активации провоспалительного фенотипа макрофагов преобладает специфический путь фагоцитоза через FcR, тогда как снижение секреции провоспалительных цитокинов сопровождается активацией неспецифического фагоцитоза (через MnR).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01518-а).

ВЛИЯНИЕ ПРОЛАКТИНА НА СОСТОЯНИЕ МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ ПРИ ПРОЛОНГИРОВАННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЯЙЦЕКЛЕТОК КОРОВ. © И. Ю. Лебедева, Г. Н. Сингина, А. В. Лопухов. Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства РАСХН, Подольск-Дубровицы, irledv@mail.ru

Качество ооцита, достигшего стадии метафазы II мейоза, является основным фактором, определяющим его способность к дальнейшему эмбриональному развитию (Wang, Sun, 2007). Поздняя активация созревшей яйцеклетки во время процедуры оплодотворения или переноса ядер соматических клеток сопровождается комплексом внутриклеточных процессов, связанных со снижении

ем ее качества и называемых «старением ооцита». К настоящему времени выявлен ряд функциональных изменений, ассоциированных с процессом старения ооцитов млекопитающих, в том числе возрастание частоты хромосомных нарушений и дефектов веретена деления, повышение предрасположенности к партеногенезу и апоптозу и др. (Miao et al., 2009). Эти изменения очень сходны с функциональными модификациями, происходящими в яйцеклетках при постовуляторном старении *in vivo*. Таким образом, пролонгированное культивирование ооцитов является удобной моделью для изучения физиологических, в том числе эндокринных, факторов, участвующих в регуляции старения яйцеклеток млекопитающих. Ранее нами было показано влияние гипофизарного гормона пролактин (ПРЛ) на преобразования хромосом в созревающих ооцитах коров (Лебедева и др., 2008, 2011). В настоящей работе был исследован характер влияния ПРЛ на состояние метафазных хромосом второго деления мейоза при пролонгированном культивировании яйцеклеток. Морфологически нормальные ооцит-кумulusные комплексы (ОКК) коров созревали в течение 20 ч в среде ТС-199, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки, 10 мкг/мл ФСГ (Sigma) и 5 мкг/мл ЛГ (Sigma), в отсутствие (контроль-1) и в присутствии (опыт-1) 50 нг/мл бычьего ПРЛ (20 МЕ/мг; Эндокринологический научный центр РАМН, Москва). После созревания ОКК обеих групп переносили в среду старения ТС-199 с 10 % сыворотки (контроль-2) или в эту же среду, содержащую 50 нг/мл ПРЛ (опыт-2), и культивировали в течение 12, 24 и 36 ч. Ооциты фиксировали по методу Тарковского для последующего проведения цитогенетического анализа. Все эксперименты были выполнены в 4 независимых повторностях. Исследование морфологии хромосом показало нарастание деструктивных изменений в процессе пролонгированного культивирования яйцеклеток. Через 20 ч созревания в контрольной среде доля ооцитов с дегенеративными изменениями метафазных хромосом составляла $16.4 \pm 1.7\%$ от общего числа клеток, достигших стадии метафазы II. Частота хромосомных нарушений возрастала ($P < 0.001$) до 32.1 ± 3.1 , 56.3 ± 1.8 и $70.9 \pm 1.6\%$ при дальнейшем культивировании яйцеклеток в группе контроль-2 в течение 12, 24 и 36 ч соответственно. Кроме того, к 36 ч культивирования у $22.9 \pm 3.3\%$ этих клеток наблюдалось спонтанное снятие блокады второго деления мейоза ($P < 0.01$). Сходная динамика дегенеративных изменений и партеногенетической активации была выявлена при пролонгированном культивировании в контрольной среде ооцитов, созревших в присутствии ПРЛ. В то же время внесение ПРЛ в среду старения приводило к торможению деструктивных процессов в яйцеклетках независимо от присутствия гормона в среде созревания ($P < 0.001$). При этом доля ооцитов с дегенеративными изменениями метафазных хромосом в группе контроль-1/опыт-2 составляла 14.3 ± 1.8 (12 ч), 37.6 ± 2.2 (24 ч) и $51.5 \pm 2.5\%$ (36 ч). В этой группе ПРЛ также уменьшал на 36 ч относительное число клеток с признаками партеногенетической активации (до $6.8 \pm 2.8\%$, $P \leq 0.01$). Таким образом, ПРЛ оказывает ингибирующее влияние на деструктивные изменения хромосом и поддерживает блокаду мейоза II при пролонгированном культивировании яйцеклеток коров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-01888).

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КОЖИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЛИЗАТОВ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАЗОМ. © М. В. Левченко, Л. П. Тутов. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Белоруссия, M.liauchenia@gmail.com

Псориаз характеризуется нарушением пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, сосудистой гиперплазией и инфильтрацией мононуклеаров в места поражения. В иммунном ответе организма человека на антигены микроорганизмов участвует множество генов, большинство из которых еще не идентифицировано, а их патогенетический, диагностический и терапевтический потенциал неизвестен. Эпидермальные кератиноциты представляют собой гетерогенную популяцию кератиноцитов, клеток Меркля и Лангерганса, несущих на своей поверхности ряд рецепторов и экспрессирующих уникальный набор генов. Цель настоящей работы — исследование уровня и спектра экспрессии генов в первичной культуре кератиноцитов человека под воздействием лизатов *Streptococcus pyogenes*, выделенных из бляшек пациентов, страдающих псориазом. Для решения поставленной задачи использовали методы выделения РНК из первичной культуры клеток кожи с последующей постановкой реакции обратной транскрипции и мечением полученной кДНК. Далее кДНК гибридизовали на биочипе, содержащем 652 гена, с последующим сканированием и оценкой экспрессии генов. Исследована экспрессия 652 генов МПК с помощью биочипа, выявлены гены, достоверно меняющие экспрессию ($P < 0.05$) в 2 раза и более в сравнении с контролем (у 57 генов повышена экспрессия — \uparrow , у 36 снижена — \downarrow). Выявлена существенная активация генов Toll-like рецепторов TLR6 \uparrow , TLR2 \uparrow , TLR7 \uparrow , молекул межклеточной адгезии — integrin alpha 6 \uparrow , E-cadherin (epithelial) \downarrow , synaptotagmin 5 \downarrow , кластеров дифференцировки CD79A \uparrow , CD69 \uparrow , CD3G \uparrow , CD3Z \uparrow , C8A \uparrow , CD4 \uparrow , CD2AP \uparrow . Изменения экспрессии генов коснулись транскрипционных факторов NFKBIE \uparrow , TCF7 \uparrow , NKFB1 \uparrow , NFATC3 \uparrow , DP-1 \uparrow , TCF7L1 \uparrow , TA-NFKBH \downarrow , NFATC4 \downarrow . Совместно с факторами транскрипции установлено изменение экспрессии некоторых белков клеточного цикла — циклинзависимой киназы 4 \uparrow , митогенактивированных протеинкиназ 4 \uparrow и 6 \uparrow , белка инсулинзависимого фактора связывания инсулина \uparrow . В системе JAK—STAT-белков выявлено изменение экспрессии STAT2 \uparrow , STAT3 \uparrow , STAT4 \uparrow , STAT5A \uparrow , JAK2 \uparrow белков. Как правило, данные гены активируются под действием ростовых факторов и цитокинов. Под действием лизатов *S. pyogenes*, происходит изменение поверхностных структур субпопуляций клеток кожи, клетки начинают экспрессировать антигенные структуры, несвойственные кератиноцитам, такие как элементы комплемента CR1 \uparrow , ITGAM \uparrow , C8A \uparrow , C1QA \uparrow , C1QB \uparrow , C4BPB \uparrow , C8G \uparrow , C9 \uparrow , C1QA \uparrow , CCR7 \uparrow , C1RL \downarrow , C1q.1 \downarrow , FHR-3.1 \downarrow . Изменению экспрессии подверглись некоторые хемокины, цитокины и их рецепторы — IRF6 \uparrow , IL29 \uparrow , IFNGR2 \uparrow , CL25 \uparrow , CCR7 \uparrow , IFNA7 \uparrow , FCER1G \uparrow , интерферон каппа \uparrow , IL28A \uparrow , interleukin 15 \uparrow , interleukin 4 \uparrow , IFI16 \uparrow , CCL18 \downarrow , CCL8 \downarrow , interleukin 10 \downarrow , interleukin 8 \downarrow , XCL2 \downarrow , IL28B \downarrow . Следует отметить снижение экспрессии молекул, таких как HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DPA1, HLA-F, HLA-B, HLA-DMA, участвующих в презентации антигена клетками. С одной стороны, нам удалось выявить нарушения экспрессии в целом, с

другой — определить функциональные группы (кластеры) генов, сходным образом реагирующие на воздействие бактериальных антигенов. Некоторые гены, обнаруженные в настоящем исследовании, в частности рецепторы интерферонов, цитокины и их рецепторы, JAK-STAT-белки, являются маркерами активности псориаза, что косвенно подтверждает триггерную роль *S. pyogenes* в патогенезе данного заболевания.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ОБРАЗОВАНИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВНУТРИ- И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПУЛОВ КЛЮЧЕВЫХ NAD-МЕТАБОЛИТОВ. © В. А. Ливинская,¹ М. А. Ходорковский,¹ М. Циглер,² А. А. Никифоров.^{1,3} ¹ Научно-исследовательский комплекс «Нанобиотехнологии», С.-Петербургский государственный политехнический университет, Россия, ² Университет г. Берген, Норвегия, и ³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, nikiforovan@hotmail.com

Никотинамид аденин динуклеотид (NAD) — основной кофактор многих жизненно необходимых окислительно-восстановительных реакций, в которых он выступает в роли переносчика электронов. В последние годы было установлено, что NAD также является субстратом для нескольких семейств регуляторных белков — АДФ-рибозил трансфераз, поли-АДФ-рибозил полимераз, деацетилаз белков (сиртуинов) и АДФ-рибозил циклаз. Эти NAD-зависимые ферменты контролируют такие ключевые механизмы жизнедеятельности клеток, как экспрессия генов, правильное прохождение по клеточному циклу, репарация ДНК, апоптоз, старение и др. Для эффективного осуществления этих важнейших процессов клетке необходимо постоянно синтезировать NAD, чтобы пополнять его внутриклеточные запасы. Предшественниками синтеза NAD являются поступающие с пищей витамины — никотинамид (Nam), никотиновая кислота (NA), рибозид никотинамида (NR) и рибозид никотиновой кислоты (NAR). Недавно было показано, что в клетках дрожжей рибозиды NR и NAR помимо поступления с пищей могут образовываться путем дефосфорилирования мононуклеотида никотинамида (NMN) и мононуклеотида никотиновой кислоты (NAMN) соответственно. Механизм образования рибозидов NR и NAR в клетках человека на данный момент неизвестен. Так же мало известно о взаимодействии внутри- и внеклеточных пулов NAD и его ключевых метаболитов у человека. В данном исследовании нами была разработана экспериментальная модель на основе клеток печени человека HepG2, при помощи которой мы установили, что одни клетки способны обеспечивать эффективный синтез NAD в других клетках. Так, нами было показано, что метаболиты синтеза NAD, отличные от Nam и NA (наиболее вероятно, рибозиды NR и NAR), выходят из клеток человека и выступают в роли предшественников для синтеза NAD в других клетках. Также в данной работе мы установили возможный молекулярный механизм биосинтеза рибозидов NR и NAR у человека. Нами было показано, что цитозольные 5'-нуклеотидазы человека CN-II и CN-III способны дефосфорилировать мононуклеотиды NMN и NAMN с образованием соответствующих рибозидов NR и NAR in vitro.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ

(ГК № 16.552.11.7066), а также Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-31194 мол_а).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, АКТИВИРУЕМЫХ ФАКТОРАМИ ACTIVINA и BMP4, В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТЕРАТОКАРЦИНОМНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА. © Н. В. Лифанцева, О. Ф. Гордеева. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, lifanceva@yandex.ru

Поддержание баланса пролиферации и дифференцировки в плюрипотентных клетках осуществляется при взаимодействии нескольких сигнальных путей. Клетки эмбриональной тератокарциномы, обладающие ограниченным потенциалом к дифференцировке из-за генетических и эпигенетических нарушений, являются подходящей моделью для изучения механизмов, лежащих в основе регуляции этого баланса. Мы анализировали функциональную активность двух ветвей сигнальных путей TGFbeta (ACTIVINA/SMAD2/3 и BMP4/SMAD1/5/8) и роль факторов ACTIVINA и BMP4 в регуляции пролиферации и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток человека линии ESM01 (ЭСК) и клеток эмбриональной тератокарциномы человека линии PA-1 (ЭТК), которая не способна спонтанно дифференцироваться в эмбриональных телах. Сравнительный анализ экспрессии факторов семейства TGFbeta показал, что экспрессия эндогенных лигандов в нормальных и трансформированных клетках существенно различается. Уровень экспрессии генов *ACTIVINA*, *NODAL*, *LEFTY1*, *GDF3* и *BMP4* в ЭТК был значительно ниже, чем в ЭСК. Низкий уровень экспрессии эндогенных лигандов в трансформированных клетках мог свидетельствовать о том, что сигнальные пути *ACTIVINA/SMAD2/3* и *BMP4/SMAD1/5/8* неактивны в ЭТК, поэтому для анализа функциональной активности данных сигнальных путей мы стимулировали ЭСК и ЭТК экзогенными факторами *ACTIVINA* и *BMP4*. Стимуляция экзогенным *ACTIVINA* способствовала поддержанию ЭСК в недифференцированном состоянии, в то время как в ЭТК приводила к существенному ингибированию роста, но не дифференцировке. При этом в ЭТК существенно увеличивалась экспрессия эндогенных лигандов *ACTIVINA* и *NODAL* в ответ на воздействие экзогенного фактора. Стимуляция экзогенным *BMP4* индуцировала дифференцировку ЭСК, при этом значительно снижался уровень экспрессии транскрипционных факторов *OCT4*, *SOX2* и *NANOG* и повышался уровень экспрессии маркера внезародышевой энтодермы *GATA4*. Также в ЭСК возрастал уровень экспрессии генов *ID1* и *ID2*, являющихся мишенями сигнальных путей *BMP/SMAD1/5/8*. Фактор *BMP4* в ЭСК индуцировал снижение уровней экспрессии генов *NODAL*, *LEFTY1* и *GDF3*, при этом уровень экспрессии генов *ACTIVINA* и *TGFbeta1* не изменялся и усиливалась экспрессия эндогенного *BMP4*. С другой стороны, стимуляция сигнального пути *BMP4* не приводила к изменению роста и дифференцировке в ЭТК, при этом уровень экспрессии транскрипционных факторов и эндогенных лигандов семейства *TGFbeta* оставался без изменений. Мы также не наблюдали изменений в уровне экспрессии генов *ID1* и *ID2*. На основании полученных данных мы предполагаем, что нарушение процессов дифференцировки ЭТК может быть обусловлено из-

менениями в активности сигнальных путей ACTIVEINA/SMAD2/3 и BMP4/SMAD1/5/8 по сравнению с ЭСК. С одной стороны, в ЭТК снижена активность сигнального пути, активируемого фактором ACTIVEINA, из-за низкого уровня экспрессии эндогенного лиганда. С другой стороны, сигнальный путь, активируемый фактором BMP4, индуцирующий дифференцировку в ЭСК, в ЭТК подобной активностью не обладает.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-00379).

ИЗМЕНЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ МИГРАЦИИ КЛЕТОК В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ. © М. Е. Ломакина, А. С. Чикина, А. Ю. Александрова. Научно-исследовательский институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва.

Одними из признаков опухолевой прогрессии являются инвазия опухолевых клеток в близлежащие ткани и формирование отдаленных метастазов. При этом клетки меняют характер движения и претерпевают так называемые переходы — эпителиально-мезенхимный переход (ЭМП) и мезенхимно-амебoidalный переход (МАП). Способность опухолевых клеток изменять характер движения называется пластичностью. ЭМП связан прежде всего с нарушением межклеточных адгезионных контактов у эпителиальных клеток, в результате клетки приобретают способность передвигаться индивидуально, аналогично фибробластам (мезенхимный механизм). Молекулярные механизмы ЭМП изучены довольно хорошо. МАП связан с дальнейшей прогрессией опухоли. При этом клетки приобретают способность двигаться по амебoidalному механизму за счет блеббинга, и их движение становится менее зависимым от контактов с субстратом и от активности металлопротеаз. Молекулярные механизмы МАП изучены очень слабо, поскольку при этом происходит существенное ослабление фокальных контактов с субстратом, клетки прикреплены очень плохо и исследование их обычными микроскопическими методами существенно затруднено. Задача нашей работы — разработка экспериментальной системы, в которой можно изучать МАП, и исследование механизмов, определяющих возможность этого перехода. Для этого мы использовали разные подходы — изменение адгезивности субстрата, действие различных ингибиторов, меняющих динамику и архитектуру цитоскелета. В частности, мы использовали ингибиторы малых ГТФаз Rho и Rac, ингибиторы различных механизмов полимеризации актина — Atp2/3-зависимой полимеризации актина, ответственной за мезенхимный механизм движения клеток, и ингибиторы форминзависимой полимеризации актина. Для изменения адгезивности субстрата мы использовали растворы Poly-HEMA разной концентрации. Были исследованы подвижность клеток и строение их актинового цитоскелета в разных экспериментальных условиях. Исследования МАП проводили на линии клеток фибросаркомы человека HT1080. Мы показали, что ухудшение адгезивности субстрата приводит к тому, что клетки фибросаркомы перестают образовывать раффлы и ламеллоподии, характерные для мезенхимного движения. Сначала у клеток, распластывающихся на малoadгезивном субстрате, резко возрастает количество фи-

лоподий, а при дальнейшем ухудшении адгезивности начинают образовываться блеббы — структура, типичная для амебoidalного движения. Аналогичные изменения морфологии получались при обработке клеток ингибиторами Atp2/3-зависимой полимеризации актина — СК666. Показано, что в случае нормальных фибробластов подобные обработки не приводили ни к блеббингу, ни к повышенному образованию филоподий. Другие использованные ингибиторы не вызывали подобного эффекта. Таким образом, при воздействиях, затрудняющих мезенхимное движение, опухолевые клетки демонстрируют пластичность и переходят к амебoidalному движению, тогда как нормальные клетки такого перехода не показывают. В работе сравнивали миграцию клеток, передвигающихся по мезенхимному и амебoidalному механизмам на двумерном и трехмерном субстратах, исследовали изменения распределения актина и фокальных адгезий в клетках при МАП, а также рассматривали промежуточную стадию МАП — клетки с увеличенным количеством филоподий.

РОЛЬ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В ОПРЕДЕЛЕНИИ ХАРАКТЕРА МИГРАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ В НОРМЕ И ПРИ ОПУХОЛЕВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ. © М. Е. Ломакина,¹ Ю. М. Васильев,¹ А. Ю. Александрова.¹ ¹ Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, maria.lomakina@mail.ru

Изменение клеточной подвижности лежит в основе таких губительных для пациента процессов, как инвазия и метастазирование, поэтому изучение механизмов подвижности клетки является одной из важнейших задач современной клеточной биологии. Актиновый цитоскелет является основой клеточного движения. Поэтому цель нашей работы — исследование изменений актинового цитоскелета и ассоциированных с ними изменений в характере псевдоподиальной активности, возникающих при опухолевой трансформации, и анализ связи этих изменений с приобретением клеткой способности к инвазии. Мы использовали три клеточные системы, послужившие моделями опухолевой трансформации на разных стадиях прогрессии: моноонкогенная трансформация (Ras-трансформация), вирусная SV40-трансформация и третья система, включающая в себя подкожные фибробласты человека в качестве контроля и клетки опухолевого происхождения HT-1080 (фибросаркома). На всех трех моделях были получены сходные результаты. При трансформации происходит существенное изменение строения актинового цитоскелета. Нами было показано, что наряду с исчезновением актиновых стресс-фибрилл и крупных фокальных контактов существенно увеличивается формирование обогащенных актином «раффлов» на дорсальной поверхности клетки. Кроме того, исследование ультраструктуры актинового цитоскелета показало, что у трансформированных клеток актиновая сеть в ламеллоподии становится менее регулярной, наблюдается большое количество «дырок» в подмембранном слое микрофиламентов. Краевой актиновый пучок в боковых и хвостовой частях клетки существенно редуцирован по сравнению с контролем. Вероятно, именно это приводит к существенному перераспределению краевой активности и изменению морфологии трансформированной клетки по сравнению с контролем. У нетрансформированных клеток активный край сосредоточен на переднем конце клетки и есть хорошо выраженные стабильные участки

края, ограниченные плотными краевыми актиновыми пучками, отсутствующими у трансформированных клеток. При трансформации относительная длина активного края сильно возрастает, и у клеток практически нет стабильных краев. Кроме того, при трансформации существенным образом изменяется и характер псевдоподиальной активности: протрузии на переднем крае становятся более мелкими, а частота их образования и частота образования раффлов значительно возрастают. Все описанные выше изменения актинового цитоскелета и характера псевдоподиальной активности, произошедшие в результате трансформации, приводят к изменению характера клеточной миграции. Нами отмечено, что движение одиночных трансформированных клеток носит менее направленный характер, а скорость их миграции падает, в основном в результате отсутствия поляризации активности на ведущем крае; одновременно усиливается способность к трехмерной миграции через поры камеры Бойдена. Кроме того, трансформированные клетки приобретают способность инвазировать матригель. При этом мутации одного гена *ras* недостаточно для приобретения клеткой инвазивных свойств. Способность к инвазии среди изученных клеточных линий увеличивается параллельно с нарастанием указанных изменений актинового цитоскелета. Таким образом, изменение структуры актинового цитоскелета вызывает перераспределение псевдоподиальной активности на клеточном крае, в результате которого трансформированные клетки легко меняют направление движения и демонстрируют поисковое поведение инвазирующих опухолевых клеток.

РОЛЬ НЕКОТОРЫХ КЛАССОВ ИНТЕГРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ И СВЯЗАННЫХ С НИМИ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ЛИЧИНОК МОЛЛЮСКОВ В КУЛЬТУРЕ. © М. А. Майорова,^{1,2} Н. А. Одицова.^{1,2} ¹ Дальневосточный федеральный университет, maiorovamariya@gmail.com и ² Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток.

Специализация клеток контролируется внешними сигнальными молекулами, такими как факторы роста и белки внеклеточного матрикса. Рецепторы адгезии клеток, интегрин, обнаружены у представителей всего царства многоклеточных, от простых и примитивных животных, таких как губки и кораллы, до высших позвоночных. Прежде билатеральных животных уже имели по крайней мере два интегративных гетеродимера ($\alpha\beta$). В центре нашего внимания — участие интегрин $\alpha V\beta 3$ и $\beta 1$ -интегриновой субъединицы, роль которых в реализации миогенной и нейрональной дифференцировки установлена у млекопитающих и в процессах мио- и нейrogenеза у двусторчатых моллюсков. Ключ к молекулярным взаимодействиям между интегринами рецепторами и их лигандами — последовательность Arg-Gly-Asp (RGD). Белки межклеточного матрикса, такие как фибронектин, витронектин, ламинин, коллаген и др., содержат RGD-мотив. Наши результаты с использованием ингибитора интегрина рецепторов RGDS-пептида и контрольного RGEs-пептида подтверждают, что в адгезии и миогенной дифференцировке клеток личинок мидии задействован интегринальный механизм. Однако отсутствие солокализации тестированных типов интегрина и основ-

ных мышечных белков (миозина, парамиозина, твистина и актина) указывает на то, что в культуре именно эти интегрин не участвуют в миогенной дифференцировке клеток личинок мидии. Обнаружена солокализация $\alpha V\beta 3$ -подобного интегрин и маркеров нейрональной дифференцировки, нейромедиаторов серотонина или нейропептида FMRFамида, в некоторых культивируемых клетках. $\beta 1$ -подобная интегрина субъединица не участвует в процессе нейrogenеза. На это указывают отсутствие солокализации с нейромедиаторами на всех субстратах в течение длительного культивирования, появление $\beta 1$ -интегрин-иммуноположительных клеток в присутствии агентов, блокирующих развитие нейрональной дифференцировки (5 мМ ЭГТА и ЭДТА), и значительно более раннее появление таких клеток по сравнению с нервными клетками. Максимальная пролиферативная активность клеток личинок мидии (около 11 %) зарегистрирована на коллагене, при этом ее уровень не снижался в течение 1 мес, тогда как на фибронектине количество делящихся клеток достигало своего максимума через 12 ч, а затем, через 5 сут, снижалось до 1 %. Мышечные (парамиозин-иммуноположительные) клетки сохраняли способность к пролиферации на фибронектине до 3 сут. Снижение пролиферации сопровождалось усилением дифференцировки в миогенном и нейрональном направлениях, а также увеличением количества $\beta 1$ -иммуноположительных клеток. В редких случаях обнаружена солокализация $\beta 1$ -подобной интегрина субъединицы с фосфорилированным гистором H3, маркером пролиферирующих клеток. Наши данные указывают на то, что $\alpha V\beta 3$ -подобный интегрин может быть связующим агентом между внеклеточным матриксом и нейрон-подобными клетками. Это доказывает единство сигнальных путей, регулирующих развитие нервной системы у разных типов животных. Роль $\beta 1$ -подобного интегрин в развитии личинок моллюсков предстоит выяснить.

РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА. © Ю. С. Макушева,¹ Е. В. Кашина,¹ А. С. Гайтан,² Н. В. Рубцова.¹ ¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, makusheva@bionet.nsc.ru и ² Научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск.

Глиомы, или глиальные опухоли, — наиболее часто встречающиеся опухоли головного мозга, происходящие из глиальных клеток и их предшественников. Они представляют собой гетерогенную группу новообразований, различающихся по молекулярно-биологическим и гистологическим характеристикам. Культуры клеток широко применяются в качестве модели при изучении биологии глиом человека. Исторически сложившаяся практика использования ограниченного набора длительно перевиваемых культур в качестве модели канцерогенеза в последнее время подвергается ревизии. Достоточно большое количество данных свидетельствует о том, что клетки длительно перевиваемых культур по многим своим характеристикам весьма существенно отличаются от клеток исходной опухоли и поэтому в большинстве случаев не являются адекватной моделью. Актуальным остается вопрос отработки условий поддержания первичных монослойных культур низкодифференцированных опухоле-

вых клеток, способных к активной пролиферации *in vitro* и сохраняющих характеристики, идентичные или по крайней мере очень близкие к клеткам исходной глиомы. Нами была проведена работа по анализу влияния разных условий культивирования на ростовые характеристики нескольких первичных культур клеток, полученных ранее из злокачественных глиальных опухолей человека: олигоастроцитомы (градация III) и глиобластомы (градация IV). Показано, что культивирование в условиях пониженного содержания эмбриональной сыворотки с использованием определенных стимулирующих рост добавок позволяет около 10 пассажей поддерживать клетки этих опухолей в монослойной культуре в низкодифференцированном состоянии с достаточно высоким индексом пролиферации. Также был проведен сравнительный анализ уровня относительной экспрессии шести генов (*EGFR*, *PTEN*, *MGMT*, *TFAP2A*, *DNMT3A* и *CEBPB*), играющих важную роль в патогенезе глиом. В исследование были вовлечены образцы исходной опухолевой ткани, клетки первичных культур, полученные из соответствующих опухолей, и образцы немалигнизированного мозга человека. Уровень относительной экспрессии генов был измерен методом количественной ПЦР в реальном времени и нормализован к уровню экспрессии гена *HPRT1*. Исходные опухоли существенно отличались друг от друга и от образцов нормального мозга профилем относительной экспрессии исследованных генов. В клетках первичных культур были выявлены различия по уровню экспрессии исследованных генов относительно показателей, обнаруженных в образцах исходных опухолей, как в сторону увеличения, так и в сторону снижения. При этом степень изменения уровня экспрессии различалась для разных генов в разных культурах. Часть генов сохранила уровень экспрессии, характерный для исходной опухоли.

ИНГИБИТОР ГЕТЕРОТРИМЕРНЫХ G-БЕЛКОВ СУРАМИН МОДУЛИРУЕТ ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ. © А. В. Мельницкая, З. И. Крутецкая, С. Н. Бутов, Н. И. Крутецкая, В. Г. Антонов. Кафедра биофизики биолого-почвенного факультета С.-Петербургского государственного университета, avm242@hotmail.ru

Кожа амфибий и другие эпителиальные системы — классические модельные объекты для исследования механизмов трансэпителиального транспорта ионов. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевой пузырь амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки. Ранее нами было показано, что транспорт Na^+ в коже лягушки модулируется различными окисляющими агентами. Впервые обнаружено, что окисленный глутатион (GSSG) и препарат глутоксима® (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой платины; «ФАРМА — ВАМ», Москва), приложенные к базолатеральной поверхности кожи, имитируют действие инсулина и стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+ . В дальнейшем было показано, что в регуляции глутоксимом транспорта Na^+ в коже лягушки принимают участие тирозинкиназы и фосфатидилинозитолкиназы, протеинкиназа С, серин/треониновые протеинфосфатазы PP1/PP2, а также микротрубочки и микрофиламенты. Однако молеку-

лярные механизмы, лежащие в основе регуляторного влияния глутоксима на транспорт Na^+ , во многом неясны.

Известно, что гетеротримерные G-белки являются универсальными посредниками, участвующими в передаче сигналов от мембранных рецепторов к эффекторным белкам. В базолатеральных мембранах клеток эпителия кожи лягушки идентифицированы ассоциированные с гетеротримерными G-белками пуринорецепторы P2Y-типа, участвующие в регуляции трансэпителиального транспорта Na^+ . В связи с этим для выявления участия гетеротримерных G-белков во влиянии глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки *Rana temporaria* использовали сурамин — селективный ингибитор гетеротримерных G-белков и неселективный ингибитор пуринорецепторов P2Y- и P2X-типов.

Для регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ) кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала. В интервалах между измерениями ВАХ трансэпителиальный потенциал (V_T) кожи поддерживали при потенциале открытой цепи V_{OC} ($V_{OC} = V_T$ при трансэпителиальном токе $I_T = 0$). Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{SC} = I_T$ при $V_T = 0$), V_{OC} и трансэпителиальную проводимость g_T . Транспорт Na^+ оценивали как амилорид-чувствительный I_{SC} . Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $\bar{x} \pm s_x$. В среднем (по результатам 10 экспериментов) после приложения глутоксима к интактной коже I_{SC} возрастает на $31.24 \pm 8.32\%$, а V_{OC} возрастает на $38.04 \pm 5.15\%$. Показано, что предварительная обработка базолатеральной поверхности кожи сурамином (200 мкМ) в течение 30 мин перед добавлением к той же поверхности кожи 100 мкг/мл глутоксима существенно ослабляет стимулирующее влияние глутоксима на транспорт Na^+ . Так, I_{SC} в этом случае возрастает на $16.04 \pm 4.12\%$, а V_{OC} — на $18.58 \pm 5.02\%$. Во всех экспериментах величина g_T не меняется. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии рецепторопосредованного этапа, связанного с активацией гетеротримерных G-белков, в реализации регуляторного влияния глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки.

МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ КОНТРОЛИРУЕТСЯ ВИМЕНТИНОВЫМИ ПРОМЕЖУТОЧНЫМИ ФИЛАМЕНТАМИ. © А. А. Минин, И. С. Чернованенко, Е. А. Матвеева. Группа клеточной биологии Института белка РАН, Москва.

Понимать механизмы регуляции мембранного потенциала митохондрий очень важно, так как от функций этих органелл зависят многие процессы и нарушения приводят к различным патологиям. Мы обнаружили, что свойства и поведение митохондрий зависят от их взаимодействия с виментиновыми промежуточными филаментами, одним из трех основных компонентов цитоскелета. Используя видеомикроскопию живых клеток и потенциалзависимые митохондриальные красители, мы обнаружили, что экспрессия виментина в безвиментиновых клетках приводит к увеличению мембранного потенциала митохондрий. С другой стороны, подавление экспрессии виментина в фибробластах вызывает снижение потенциала митохондрий. Мы выяснили, что в N-концевой части молекулы виментина имеется участок, ответственный за наблюдаемый эффект, и даже небольшой фрагмент, содержащий

этот участок, при взаимодействии с митохондриями увеличивает их потенциал. Внутри найденного нами участка расположены сайты фосфорилирования виментина некоторыми известными протеинкиназами. Так, фосфорилирование Ser55 одной из них, протеинкиназой РАК1, приводит к нарушению взаимодействия митохондрий с виментином и как результат — к снижению их мембранного потенциала. Эффект виментина на митохондрии наблюдается только в клетках с нормально функционирующей дыхательной цепью. Используя р0-клетки, лишённые мтДНК и дефектные по способности к окислительному фосфорилированию, мы показали, что митохондриальный потенциал в них нечувствителен к взаимодействию с виментином. И наконец, наши данные свидетельствуют о том, что связь митохондрий с виментином увеличивает долю энергии потенциала, которая расходуется в митохондриях на синтез АТФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-00414_a, 13-04-00931_a и 12-04-32280мол_a).

МЕМБРАННЫЙ ХОЛЕСТЕРИН И ЛИПИДНЫЕ РАФТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ СИГНАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКЕ. © *Е. А. Морачевская*. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, elenmo@mail.cytspb.rssi.ru

В экспериментальных исследованиях процессов клеточной регуляции и передачи сигнала основным и незаменимым объектом остаются клеточные культуры. Закономерности, установленные при изучении биологии клетки в культуре, составляют фундамент современных знаний об основах жизнедеятельности живой клетки как в норме, так и при различных патологиях. Большинство регуляторных процессов в клетке ассоциировано с мембранными структурами, некоторые мембранные липиды являются признанными участниками внутриклеточных сигнальных каскадов. В настоящее время формируется новый взгляд на структурно-функциональную организацию клеточных мембран эукариот, происходит переосмысление роли липидов, в первую очередь стеролов. Многочисленные исследования в рамках липидной тематики были посвящены различным аспектам метаболизма изопреноидов, фосфоинозитидов, арахидоновой кислоты, их участия в клеточных процессах. Сигнальная и регуляторная роль мембранного холестерина оставалась недооцененной и в итоге значительно менее изученной. Очевидна актуализация этого направления в связи с концепцией липидных рафтов и современными данными об участии мембранного холестерина в реализации различных клеточных функций. Результаты исследований различного профиля указывают на приоритетную роль рафт-ассоциированных сигнальных путей в опухолевой трансформации и развитие патологических изменений клеточного фенотипа. Как известно, присутствие стерина является характерной особенностью мембран клеток эукариот; эволюционный аспект данной проблематики представляет несомненный интерес. Холестерин (холестерол) — один из основных липидных компонентов плазматической мембраны клеток млекопитающих. Достаточно давно показано, что холестерин влияет на физические свойства и динамику мембран; в модельных системах он регулирует текучесть и повышает жесткость

бислоя. Значительно менее очевидны изменения мембранных функций в зависимости от уровня холестерина в нативных клетках. Предполагается, что в клеточных мембранах присутствуют липидные микродомены (рафты, кавеолы) — участки, характеризующиеся более плотной упаковкой и повышенным содержанием холестерина и сфинголипидов. Визуализация рафтов остается трудно разрешимой задачей и становится самостоятельным направлением мембранологии. Одним из основных путей для выявления роли рафтов в различных аспектах жизнедеятельности клетки являются функциональные подходы, в первую очередь эксперименты в условиях частичной экстракции холестерина. Результаты, полученные нами на различных клеточных линиях (Российская коллекция клеточных культур Института цитологии РАН), свидетельствуют о вероятном участии мембранного холестерина и рафтов в различных сигнальных процессах, в том числе регуляции ионных каналов, механотрансдукции и перестройках актинового цитоскелета.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00622) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ФОРМИРОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ ТУБУЛЯРНЫХ СТРУКТУР ИЗ КЛЕТОК ЛИНИИ HepG2 ПРИ ПОМОЩИ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ. © *Н. Е. Морозова, А. Д. Ведяйкин, Г. Е. Побегалов, С. В. Мурашов, А. С. Мельников, М. А. Ходорковский, А. В. Сабанцев*. Научно-исследовательский институт нанобиотехнологий, С.-Петербургский государственный политехнический университет.

Метод формирования мембранных тубулярных структур (МТС) при помощи оптической ловушки способен предоставить большой объем информации о свойствах плазматической мембраны и цитоскелета. Эти свойства играют большую роль в таких процессах, как клеточная подвижность, эндо- и экзоцитоз, деление и дифференцировка, а также злокачественная трансформа-

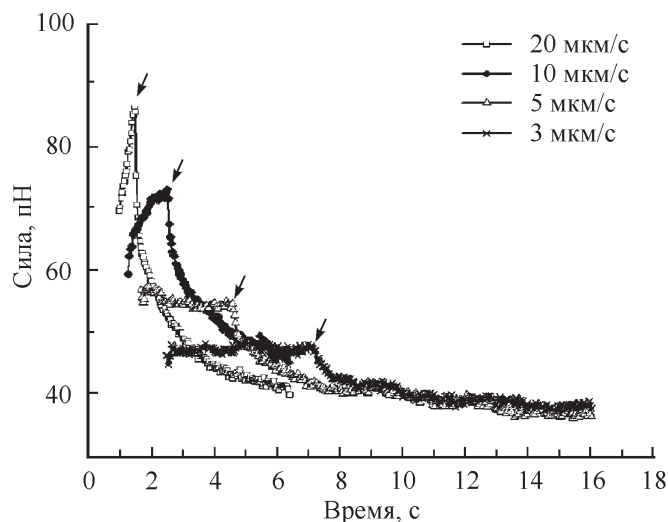


Рис. 1. Зависимость силы, действующей на микроферу со стороны МТС, от времени при различных скоростях удлинения МТС.

Стрелкой обозначен момент прекращения удлинения.

ция и малигнизация клеток (Guck et al., 2005; Cross et al., 2007; Zhang, Liu, 2008). Нами была реализована методика исследования механических свойств клеточной мембраны за счет формирования МТС при помощи оптической ловушки. Анализ сил, действующих на микросферу в зависимости от скорости удлинения МТС, позволяет определить стационарную силу натяжения МТС, а также охарактеризовать вязкие свойства мембраны. Эта методика была успешно опробована на клеточной линии НерG2 и позволила охарактеризовать механические свойства мембран данной клеточной линии. На рисунке представлен характерный пример зависимости силы натяжения МТС от времени при различных скоростях ее удлинения. Вопреки устоявшемуся в литературе мнению, при больших скоростях удлинения МТС (10 и 20 мкм/с) в процессе удлинения сила натяжения МТС не оставалась постоянной, но росла с течением времени. Это, по всей видимости, свидетельствует о нарушении квазистационарности процесса удлинения МТС при высоких скоростях. Измеренное значение стационарной силы натяжения МТС для клеток НерG2 составило 40 ± 2 пН, а вязкость МТС — 0.27 ± 0.07 пН · с/мкм.

Список литературы

Cross S. E., Jin Y. S., J. Rao., Gimzewski J. K. 2007. Nano-mechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat. Nanotechnol.* 2 (12): 780—783.

Guck J., Schinkinger S., Lincoln B., Wottawah F., Ebert S., Romeyke M., Lenz D., Erickson H. M., Ananthakrishnan R., Mitchell D., Kas J., Ulvick S., Bilby C. 2005. Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophys. J.* 88 (5): 3689—3698.

Zhang H., Liu K. K. 2008. Optical tweezers for single cells. *J. R. Soc. Interface.* 5 (24): 671—690.

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ДОЗ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ НА КЛЕТОЧНОЕ СТАРЕНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ IN VITRO. © А. А. Москалев,^{1–3} И. О. Вележанинов,¹ Е. Н. Плюснина,^{1,2} М. Moustaqil,⁴ М. Blimkie,⁴ Д. Ю. Клоков.⁴ ¹ Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, amoskalev@ib.komisc.ru, ² Сыктывкарский государственный университет, ³ Московский физико-технический институт и ⁴ Chalk River Laboratories, Atomic Energy Canada Limited.

Клеточное старение — необратимая остановка деления клетки в фазе G₁ (выход в фазу G₀), первоначально открытая как лимит Хейфлика, присущая культивируемым in vitro фибробластам. В настоящее время различают три вида клеточного старения по причине его индукции — репликативное (связанное с укорочением теломерных последовательностей хромосом и утрате защитных теломерсвязывающих белков), стрессиндуцированное (в ответ на повреждение молекулы ядерной ДНК) и онкогениндуцированное (при сверхактивации протоонкогенных белков). Воздействие ионизирующих излучений в средних и больших дозах (>1 Гр) активно используется для индукции и исследования стрессиндуцированного клеточного старения. Актуальным остается вопрос: способно ли воздействие редкоионизирующих излучений в малых дозах вызывать ускоренное клеточное старение? Какие механизмы клеточной защиты индуцируются при воздействии излучений в малых дозах и как происходит их изменение с возрастом клеток в культуре? Изучены

эффект однократного облучения в малой дозе на скорость клеточного старения культуры фибробластов человека, их способность отвечать на повторное облучение в малой или большой дозе, а также возрастные изменения экспрессии нескольких десятков генов стресс-ответа. Показано, что облучение молодых нормальных фибробластов человека HFL1 в дозах 12.5 и 100 мГр приводит к замедлению скорости клеточного старения по показателю активности β-галактозилазы и уровню экспрессии генов p21 и p19. Также было показано, что в стареющей предоблученной культуре снижена экспрессия гена марганцевой супероксиддисмутазы (Sod2), проапоптозных генов PUMA и TNFSF10, а также изменяется соотношение мРНК факторов роста фибробластов (FGF1 и FGF2). Выполнен анализ изменения экспрессии генов стресс-ответа в ответ на облучение в дозах 0.1 и 1 Гр культур клеток, подвергшихся предварительному облучению в дозах 12.5 и 100 мГр. Полученные данные свидетельствуют о том, что облучение в малых дозах может приводить к изменению реакции клеток на последующее облучение в большой дозе. Таким образом, представленные данные показывают возможность индукции замедления клеточного старения культивируемых фибробластов при воздействии ионизирующего излучения в малой дозе и указывают на потенциальные механизмы облученного эффекта.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта N12-П-4-1005 по программе президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СИГНАЛОВ ЯДРЫШКОВОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ С КОМПОНЕНТАМИ ЯДРЫШКА. © Я. Р. Мусинова, Д. М. Свистунова, Е. Ю. Кананыхина, О. М. Лисицына, Е. В. Шеваль. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова.

Ядро содержит большое число субструктур, характерной особенностью которых является отсутствие ограничивающих мембран. Большая часть белков ядерных субструктур свободно обменивается с окружающей нуклеоплазмой. В настоящее время не до конца понятно, каким образом в таких условиях белки могут накапливаться, иногда в достаточно высокой концентрации, внутри ядерных структур. Один из способов накопления белков в ядрышке связан с наличием в белках специфических сигнальных последовательностей — сигналов ядрышковой локализации (NoLS). Механизм действия данных сигнальных последовательностей неизвестен. Структура описанных в литературе NoLS крайне гетерогенна, не удастся выявить каких-то консенсусных мотивов, общих даже для сигналов родственных белков. Единственное общее свойство NoLS состоит в том, что все они обогащены положительно заряженными аминокислотами (~50 % от общего содержания аминокислот). Это позволяет предполагать, что NoLS взаимодействуют с компонентами ядрышка электростатически. Для проверки этой гипотезы мы использовали несколько разных подходов. В частности, мы картировали NoLS и в двух белках — MAP3K14 и HIV Tat. В первом белке рядом с сигналами располагается несколько положительно заряженных аминокислот, во втором — нет. Выявлено, что в случае MAP3K14 ближайшие к сигналу участки белка вносят за-

метный вклад в накопление в ядрышке, в случае HIV Tat такого эффекта не обнаруживается. В случае как MAP3K14, так и HIV Tat замена положительно заряженных аминокислот внутри сигнала приводит к снижению эффективности накопления (пропорционально числу замененных заряженных аминокислот). Также мы использовали для работы химерные белки, содержащие EGFP, слитый с короткими последовательностями, содержащими разное количество лизинов или аргининов (искусственными NoLS). Мы показали, что уровень накопления EGFP в ядрышке хорошо коррелирует с зарядом слитой с EGFP последовательности. Также показано, что уровень накопления выше в том случае, если положительно заряженные аминокислоты расположены подряд, а не разделены незаряженными аминокислотами. Данные проведенного исследования подтверждают высказанную гипотезу об электростатической природе взаимодействия NoLS с компонентами ядрышка. С использованием нескольких независимых подходов показано, что в ядрышке NoLS, вероятнее всего, взаимодействуют с РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-31463 и 12-04-01237) и Министерства образования и науки РФ (2012-1.2.2-12-000-1013-078).

ПОЛУЧЕНИЕ ИПСК ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В НЕЙРОНАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ. © И. А. Мучкаева, А. С. Артюхов, Э. Б. Дашинимаев, А. В. Васильев. Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва.

Обладая способностью к дифференцировке в направлении трех зародышевых листков, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) являются важным объектом клеточной биологии и медицины. Они могут быть использованы при моделировании многих нейродегенеративных заболеваний. Посредством лентивирусной доставки четырех транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc нам удалось репрограммировать фибробласты кожи взрослого человека линии 1608hT. Полученные иПСК в отличие от материнских фибробластов экспрессировали щелочную фосфатазу, что указывало на репрограммирование. С помощью иммуноцитохимического окрашивания было выявлено, что полученные иПСК экспрессировали транскрипционные факторы плюрипотентности OCT4, SOX2 и NANOG, а также поверхностные антигены плюрипотентных клеток SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 и Tra-1-81. По данным проточной цитофлуориметрии, на 18-м пассаже в популяции иПСК-1608hT было около 14 % клеток SSEA-3+, 86 % клеток Tra-1-81+, 84 % клеток Tra-1-60+ и 81 % клеток SSEA-4+. С помощью ОТ-ПЦР-анализа полученных иПСК мы детектировали транскрипты генов ЭСК. Методом ПЦР в реальном времени мы определили уровни экспрессии практически всех исследуемых генов (Oct4, Sox2, Nanog, Klf4, Lin28, Dppa4 и Dnmt3) в иПСК. Они были сопоставимы с таковыми в ЭСК и отличались от профиля экспрессии исследуемых генов от материнских клеток. Полученные нами иПСК способны были образовывать эмбрионидные тельца, в которых детектировались белки эктодермы (нестин), мезодермы (десмин) и энтодермы (АФП). Таким образом, мы подтвердили недифференцированный статус полученных из фибробластов

иПСК. Полученная нами культура иПСК обладала способностью к дифференцировке в нейрональном направлении. После индукции дифференцировки мы наблюдали изменение морфологии исследуемых клеток. В колониях постепенно обособлялись клетки, что, скорее всего, связано с утратой плотных контактов. Большая часть клеток приобретала нейрональную морфологию (небольшое тело и длинные отростки), однако встречались клетки с морфологией глиии (паукообразные с ветвящимися отростками). Подлинность дифференцировки подтверждали с помощью иммуноцитохимического окрашивания против специфических белков маркеров глиии (GFAP) и клеток нейронального ряда (Prox1, нестин, даблкортин, β -III-тубулин, NSE и TH).

КЛОНАЛЬНЫЙ РОСТ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА. © О. В. Паюшина, О. Н. Шевелева, Н. Н. Буторина, Э. И. Буеверова, А. А. Минин, Е. И. Домарацкая. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, payushina@mail.ru

Белки внеклеточного матрикса — одни из основных компонентов микроокружения мезенхимных стромальных клеток (МСК). Исследование роли матрикса в регуляции функционирования МСК важно для понимания фундаментальных аспектов биологии этого типа клеток и совершенствования методов тканевой инженерии. Однако имеющиеся в литературе данные о влиянии различных матриксных белков на пролиферацию и дифференцировку МСК неоднозначны. Проведенная нами оценка эффективности клонирования МСК из костного мозга крысы при культивировании на ряде белков внеклеточного матрикса — фибронектине, коллагене I типа и ламинине — не выявила усиленного прикрепления колониобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) к этим субстратам по сравнению с культуральным пластиком в первые 7 сут инкубации. Однако анализ популяции клоногенных клеток, прикрепляющихся в более поздний срок, выявил различия в динамике адгезии МСК к изучаемым субстратам. После 7 сут инкубации на пластике значительная часть КОЕ-Ф оставалась неприкрепленной, сохраняя способность к образованию колоний при последующем переносе в новый флакон. При культивировании на белках матрикса (прежде всего фибронектине и коллагене) в суспензии к этому сроку оставалось меньшее число КОЕ-Ф, что может свидетельствовать о более быстром и(или) более прочном прикреплении клоногенных МСК к данным белкам. Сходные результаты были получены и при анализе культуры КОЕ-Ф зародышевой печени. Колонии, образуемые МСК костного мозга на фибронектине, характеризовались сниженной по сравнению с остальными субстратами активностью щелочной фосфатазы — маркера остеогенных клеток, а при культивировании МСК в присутствии индукторов остеогенеза (дексаметазона, 2-фосфо-L-аскорбата и β -глицерофосфата натрия) на этом белке была отмечена значительно более слабая минерализация очагов дифференцировки. Эксперименты по культивированию МСК на протеолитических фрагментах фибронектина не выявили преимущественной адгезии КОЕ-Ф к какому-либо из его структурно-функциональных доменов, однако показали, что основной вклад в подавление остеогенеза вносит домен, связывающийся с

клеткой. Вероятно, в этом процессе задействованы интегрин, однако выяснение конкретных механизмов передачи сигнала требует дополнительных экспериментов. В присутствии индукторов адипогенеза (инсулина, индометацина, дексаметазона и 3-изобутил-1-метилксантина) МСК костного мозга, культивируемые на коллагене I типа, образовывали меньше адипоцитов, чем культивируемые на пластике. Менее выраженное ингибирование адипогенеза наблюдалось на фибронектине; ламинин не оказывал существенного влияния на число образующихся жировых клеток. Результаты проведенных экспериментов могут свидетельствовать о стимулирующем влиянии изученных белков внеклеточного матрикса на адгезию клоногенных МСК, а также о подавлении остеогенной дифференцировки МСК фибронектином и адипогенной — коллагеном I типа и в меньшей степени фибронектином. Анализ молекулярных механизмов, лежащих в основе наблюдаемых эффектов, представляется перспективной темой для дальнейших исследований.

СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКСА P130/β-КАТЕНИН В ПОКОЯЩИХСЯ И ДЕЛЯЩИХСЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ. © Н. С. Петров, О. В. Жидкова, Б. В. Понов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, borisvp478@gmail.com

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) обладают пластичностью, т. е. способностью при определенных условиях принимать необычный, например эпителиальный, фенотип, что, вероятно, основано на консервативной эпигенетической программе мезенхимно-эпителиального перехода, который широко используется в процессе развития и индивидуальной жизни. В нормальных условиях *in vitro* МСК активно делятся, а их дифференцировка происходит после остановки деления в точке R1 клеточного цикла, прохождение которой контролируется в дифференцирующихся соматических клетках белком p130 — членом семейства продукта гена ретинобластомы (pRb). В R1 p130 формирует комплекс с транскрипционным фактором E2f4, тормозящим транскрипцию генов, продукты которых необходимы для прогрессии клеточного цикла. Ранее мы установили, что в МСК комплекс p130/E2f4 включает в свой состав β-катенин, передающий сигналы в каноническом сигнальном пути Wnt. Антитела к p130 преципитируют из тотальных экстрактов асинхронно делящихся МСК преимущественно форму p2, но не p1 p130. Напротив, антитела к E2f4 преципитируют из экстрактов асинхронных или синхронизированных в фазе G₀/G₁ или S МСК преимущественно форму p1, но не p2 p130, а в соматических дифференцирующихся клетках линии T98G они преципитируют p130 только из экстрактов покоящихся, но не S-фазных клеток. Найденные различия в составе комплекса p130/E2f4/β-катенин, выявляемые с помощью антител к его отдельным компонентам, особенности формирования комплекса в клеточном цикле в дифференцирующихся и полипотентных клетках позволяют предполагать различия и в его функциональном назначении. Роль комплекса как «охранника» состояния покоя в дифференцирующихся клетках может быть модифицирована в МСК за счет включения в его состав β-катенина. Такая модификация может повышать регуляторный потенциал комплекса путем придания ему дополнительной возможности взаимной регуля-

ции транскрипции генов-мишеней, содержащих сайты связывания факторов семейства E2F или LEF/TCF. Антитела к Gsk3β, которая фосфорилирует в фазе G₀/G₁ как β-катенин, так и p130, копреципитируют оба белка. Комплекс, копреципитирующийся с Gsk3β из ядерной фракции МСК, включает в себя транскрипционные факторы Tcf3,4, что позволяет предполагать его функциональную роль в регуляции транскрипции. Однако антитела к сигнальной форме β-катенина, взаимодействующие с дефосфорилированными аминокислотными остатками Ser37/Thr41, не определяют эту форму белка в указанном комплексе, хотя и связывают ее в репликах иммуноблота, приготовленных из того же материала. Возможно, комплекс p130/β-катенин, преципитируемый антителами к Gsk3β, является неактивным производным родственного ему активного комплекса, в состав которого входит E2f4. Активация репортерной конструкции TopFlash, содержащей сайты связывания белков семейства LEF/TCF, путем экспрессии экзогенного β-катенина лишь в незначительной степени отменяется дополнительной экспрессией экзогенного p130. Для изучения функциональной роли комплекса p130/β-катенин в регуляции пластичности МСК нужны последующие опыты, которые прояснят его вклад в регуляцию генов, содержащих сайты связывания белков семейства E2F или LEF/TCF.

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

РОЛЬ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В РЕГУЛЯЦИИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, МОДУЛИРУЮЩИХ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ. © О. А. Петухова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, petukhova@yandex.ru

Актиновые филаменты вместе с микротрубочками и промежуточными филаментами образуют динамическую сеть в цитоплазме клеток, называемую цитоскелет, которая определяет форму клетки и лежит в основе клеточной подвижности, участвует в межклеточной адгезии и взаимодействии клеток с внеклеточным матриксом. Актин в клетках существует в двух формах — мономерный глобулярный актин и фибриллярный актин. Актиновые филаменты формируются путем сборки мономерного актина. Актиновый цитоскелет обладает способностью быстро перестраиваться под влиянием внешних и внутренних стимулов за счет взаимопревращений глобулярной и фибриллярной форм актина. Динамика актина регулируется актинсвязывающими или актинассоциированными белками в ответ на разнообразные стимулы. Относительно новыми являются сообщения об участии актинового цитоскелета в регуляции сигнальных путей и взаимосвязи динамики актина и активности транскрипционных факторов. В значительной мере эти данные получены с использованием веществ, влияющих на экспрессию или активность эндогенных белков, регулирующих динамику актина. Такими белками-мишенями являются малые ГТФазы, которые регулируют ремоделирование цитоскелета под влиянием разнообразных внешних сигналов. Другим подходом является использование веществ, которые прямо взаимодействуют с актином и нарушают динамику актина, усиливая или полимеризацию, или деполимеризацию актина. С помощью последнего подхода показано участие актинового цитоскелета в регуляции

МАРК-каскада, транскрипционного фактора NF kappaB и ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT). Особенно значимым является открытие молекулярного механизма, с помощью которого актиновый цитоскелет регулирует гены, зависимые от SRF (serum response factor). Дополнительными фактами, указывающими на участие актинового цитоскелета в регуляции экспрессии генов, является открытие внутриядерных функций актина и актинсвязывающих белков. В литературе представлены также данные, демонстрирующие роль актинового цитоскелета в распределении РНК в цитоплазме. Совокупность данных позволяет заключить, что существуют различные механизмы, с помощью которых актиновый цитоскелет может включаться в регуляцию активности генов.

ОЦЕНКА УРОВНЯ АМАСР В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ ВЫЯВЛЯЕТ ЗАВИСИМОСТЬ ЕГО ЭКСПРЕССИИ ОТ В-КАТЕНИНА.
© *Е. И. Пчицкая, П. С. Шило, Н. С. Петров, О. В. Жидкова, Б. В. Попов.* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, borisvp478@gmail.com

Альфа-метилацил-коэнзим А рацемаза (АМАСР) является ферментом, регулирующим β -окисление боковых цепей жирных кислот и синтез желчных кислот. Повышенная продукция АМАСР обеспечивает клетке уникальные энергетические преимущества для пролиферации, что может быть причиной его гиперпродукции в опухолях. АМАСР был идентифицирован в 2000 г. при скрининге белков, сверхэкспрессирующихся в ткани карциномы простаты, после чего он начал широко использоваться в качестве наиболее информативного маркера этого заболевания. Текущие публикации свидетельствуют о повышенной продукции АМАСР в опухолях, происходящих из соматических клеток различных тканей и эмбриональных клеток. Опубликованы данные о том, что при карциномах печени повышенная продукция АМАСР связана с мутацией гена β -катенина, необходимого для самоподдержания нормальных и опухолевых стволовых клеток. Возможно, АМАСР является мишенью β -катенина и гиперпродуцируется в случае его активирующих мутаций. Целью настоящей работы было получение моноклональных антител к АМАСР для оценки уровня его экспрессии в нормальных тканях мыши, стабильных клеточных линиях мыши и человека с индуцированным сигнальным путем Wnt/ β -катенин. Гибридома, продуцирующая моноклональные антитела к АМАСР, была получена путем слияния миеломы SP2/0 со спленоцитами мыши линии Balb/c, иммунизированной полноразмерным очищенным рекомбинантным белком. Полученные антитела распознают в иммуноблоте и иммунофлуоресценции в ткани почки мыши и экстрактах из биопсийного материала пациентов с карциномой простаты белок с мол. массой 42 кДа. Рисунок специфического связывания полученных антител к АМАСР из биоптатов опухолей подобен таковому при использовании коммерческих антител p504S против АМАСР (ZetaCorp., USA). Используя отпечатки срезов почки, печени, тимуса, семенников и сердца мышей, мы обнаружили с помощью иммунофлуоресценции продукцию АМАСР в единичных клетках этих органов. Экспрессия АМАСР была невысокой в клетках стабильных линий C3H10T1/2, Wehi164, Bwtg3, CloneM3, костномозговых мезенхимных стволовых клетках (МСК) ран-

них пассажей и первичных мышинных фибробластах, но существенно возрастала при продолжительном пассировании МСК или экспрессии в фибробластах экзогенного Wnt3A. Продукция АМАСР была низкой в клетках человека линий 293Т и Saos2 с неиндуцированным сигнальным путем Wnt/ β -катенин, но значительно более высокой в клетках линий A-549, Mcf7, HeLa, Caco2 и HepG2 со стабильной активацией этого пути, проявляющейся в ядерной локализации β -катенина и экспрессии транскрипционных факторов Tcf3,4. Полученные нами данные свидетельствуют в пользу идеи о том, что АМАСР является мишенью β -катенина и поэтому представляет интерес для изучения в качестве убиквитарного маркера карцином различных органов.

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

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА. © *Н. В. Рубцова,¹ Ю. С. Макушева,¹ Н. В. Губанова,¹ А. С. Гайтан,² А. Л. Кривошапкин,² В. А. Мордвинов.¹* ¹Институт цитологии и генетики СО РАН, runad@bionet.nsc.ru и ² Научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск.

Культуры клеток, первичные и постоянные перевиваемые, полученные из тканей различных опухолей, достаточно широко применяются в современной биологии и медицине при исследовании механизмов канцерогенеза, для отработки и усовершенствования методов диагностики, для первичной апробации новых подходов в терапии опухолей. Высокая гетерогенность глиом (глиальных опухолей) головного мозга человека, особенно глиобластом, обуславливает необходимость использования в практических и экспериментальных целях различных культур клеток, полученных из опухолей от разных пациентов. В борьбе с глиобластомами наиболее эффективным и перспективным для практического применения в идеале считается использование индивид-специфичной модели *in vitro*. В этой связи создание коллекции первичных культур клеток злокачественных глиальных опухолей головного мозга человека представляется нам весьма актуальной задачей. В течение 3 лет нами было собрано и обработано около 50 образцов различных типов злокачественных астроцитом (градация III) и глиобластом (градация IV). Образцы опухолей извлекали во время плановых нейрохирургических операций из головного мозга пациентов, подписавших информированное согласие. Наши усилия были направлены на получение первичных культур опухолевых клеток, сохраняющих в условиях *in vitro* способность к активной пролиферации достаточно длительное время (не менее 10 пассажей). Для получения культур клеток были подобраны условия дезагрегации опухолевой ткани до клеточной суспензии, обеспечивающие по возможности выход наибольшего количества жизнеспособных клеток. Для культивирования клеток использовали разные ростовые среды, которые различались содержанием эмбриональной сыворотки и специальных добавок, стимулирующих пролиферацию клеток. В зависимости от условий культивирования и свойств исходной опухоли клетки в первичной культуре могли расти в виде

плавающих сфер (нейросфер) или в виде монослоя прикрепленных к субстрату клеток. Отдельное внимание было уделено закладке образцов дезагрегированной ткани опухоли на длительное хранение в жидкий азот с возможностью последующего получения из них культур клеток *in vitro*. Хранение таких образцов дает возможность, с одной стороны, получать первичную культуру не сразу по извлечению опухоли, с другой — проводить повторное получение культур, если в этом возникает необходимость. В результате проведенной работы для большинства собранных образцов глиальных опухолей были заложены в жидкий азот на длительное хранение клетки первичных культур (нейросферы или монослои) и(или) образцы дезагрегированной ткани. В ходе наших экспериментов формирование плавающих нейросфер в большом количестве в первичных культурах было характерно только для некоторых типов глиобластом (градация IV) и для одного типа астроцитом (градация III) — анапластических олигоастроцитом. В то же время поддержание активной пролиферации клеток в первичных монослойных культурах оказалось возможным для широкого спектра глиом, относящихся к разным типам и градациям. По нашему мнению, параллельное использование двух вариантов культивирования — плавающие нейросферы и монослои клеток — в значительной степени расширяет возможности получения первичных перевиваемых культур от каждой индивидуальной опухоли.

РОЛЬ ФАКТОРОВ РОСТА И МИКРООКРУЖЕНИЯ В КУЛЬТИВИРОВАНИИ СПЕРМАТОГОНИЕВЫХ КЛЕТОК ХРЯКА. © И. П. Савченкова. Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко РАСХ, Москва, s-ip@mail.ru

Появились сообщения о длительном культивировании сперматогоний мыши, крысы и хомяка, которые были названы линиями половых стволовых (GS) клеток. Создание линий GS-клеток млекопитающих позволило бы решить проблему сохранения редких и исчезающих видов животных. Разработка и оптимизация условий поддержания сперматогоний хряка *in vitro* являются актуальными для сельскохозяйственной биотехнологии, и в первую очередь для создания трансгенных животных. Трансгенные свиньи представляют собой перспективный материал для решения многих медико-биологических проблем, в том числе могут рассматриваться как потенциальный источник тканей и органов для ксенотрансплантации человеку. Наличие стабильной культуры половых клеток хряка актуально для ветеринарной биотехнологии. Известно, что многие вирусы обладают тропизмом к половым клеткам. Однако GS-клетки хряка еще не созданы. Одной из причин этого является недостаточное знание условий культивирования сперматогоний типа А хряка и влияния различных факторов роста на половые клетки *in vitro*. На основании данных, полученных нами в результате выполнения экспериментов, можно сделать несколько обобщений, которые касаются роли факторов роста и микроокружения в поддержании в культуре сперматогоний типа А хряка. Использование клеток Сертоли (КС), продуцентов глиального нейротрофического фактора (GDNF) для совместного культивирования, способствует процессу одновременного размножения и получения сперматогониевых клонов хряка, а также и дифференцировке их в направлении сперматогенеза, о чем свидетель-

ствует обнаружение в них (ПЦР-РВ, ΔΔСt-метод) продуктов экспрессии генов *PLZF*, *Nanog* и *Vasa*. Экспрессия гена *Nanog* в экспериментальных клеточных клонах, полученных при краткосрочном культивировании сперматогоний в присутствии КС, превышала экспрессию этого гена в свежееизолированных половых клетках в 200 раз, а гена *Vasa* — в 350 раз. Использование фидерного слоя, представленного клетками STO, и добавление в культуру кондиционированной среды из клеток BRL, которая содержит фактор, ингибирующий дифференцировку (DIA), позволяют поддерживать сперматогонии хряка в культуре длительное время. Установлено, что фактор DIA является ключевым в изменении потенций сперматогониевых клеток хряка и способствует получению клонов, у которых происходит частичная активация гена *POU5F1*, наблюдается экспрессия SSEA-1 (иммуноцитохимия) и выявляется щелочная фосфатаза (ЩФ). Для оценки потенции полученных клеточных колоний с фенотипом, подобным ЭСК, к направленной дифференцировке *in vitro* использовали методы как прямой (химической) индукции, так и непрямой, посредством создания эмбриональных телец (ЭТ). При химической индукции в осте-, адипо- и хондрогенном направлениях (коммерческие наборы фирмы Gibco) формирования клеток костной, жировой и хрящевой тканей на 20-е сут в экспериментальных клонах не было обнаружено. Однако эти клетки были способны при переводе в суспензию формировать *in vitro* трехмерные структуры, схожие с ЭТ, в которых после прикрепления выявлялись клетки с различной морфологией. Можно предположить, что использование КС на начальных этапах культивирования сперматогоний типа А хряка может облегчить получение свинных половых клеточных культур, тогда как добавление DIA в культуру может способствовать длительному культивированию сперматогониевых клеток хряка и, возможно, созданию полипотентных клеточных линий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01471-а).

КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ МЫШЕЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА В МИОБЛАСТАХ И МИОТУБУЛАХ. © А. В. Салова, Е. А. Леонтьева, Т. П. Моженок, Е. С. Корнилова, С. А. Кроленко, Т. Н. Беляева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, avsalova@gmail.com

Дифференцировка скелетных мышц, или миогенез, является сложным процессом, в котором при определенных условиях пролиферирующие одноядерные миобласты выходят из клеточного цикла, удлинняются и сливаются в многоядерные миотубулы. В ходе дальнейшего созревания миотубулы превращаются в мышечные волокна, способные к мышечному сокращению. На молекулярном уровне каждое из этих событий регулируется взаимодействием внутриклеточных сигнальных белков и ядерных транскрипционных факторов. К настоящему времени известно большое количество белков, которые синтезируются в процессе дифференцировки. Однако ряд вопросов остается малоизученным. В первую очередь это относится к изменению пространственной организации вакуолярного аппарата, отражающей изменения свойств мембран, цитоскелета и эндоцитоза в ходе дифференци-

ровки. Настоящая работа посвящена исследованию возможности применения клеточной модели дифференцировки для изучения процессов везикулярного транспорта в миобластах и миотубулах. Была выбрана линия мышечных клеток бедра мыши C2C12, дифференцировка которых происходит при смене сыворотки с бычьей на лошадиную с понижением ее процентного содержания в среде. С помощью конфокальной микроскопии и прижизненной окраски акридиновым оранжевым наблюдали изменения в структуре и топографии ряда клеточных органоидов, свидетельствующих о дифференцировке (слияния миобластов, формирование единичных миотубул с 3—5 ядрами на 4-е сут культивирования, постепенное увеличение размера миотубул и их числа, увеличение многоядерности до 18—20 ядер к 11-м сут). С помощью окраски FITC-фаллоидином была выявлена реорганизация фибриллярного актина в миотубулах по сравнению с миобластами. Миобласты имеют типичную для прикрепленных клеток окраску с большим количеством стресс-фибрилл; в миотубулах интенсивно окрашивается примембранная область и диффузно окрашивается цитоплазма. Опыты с использованием антител к α -актину выявили регулярную поперечную исчерченность миотубул, свидетельствующую о формировании Z-дисков, что также является признаком дифференцированной мышечной клетки. Эти данные свидетельствуют о возможности проведения сравнительного анализа везикулярного транспорта в дифференцированных и недифференцированных клетках. Проанализировано распределение кислых органоидов (лизосом, поздних эндосом, цистерн аппарата Гольджи), аккумулирующих акридиновый оранжевый, в миобластах и миотубулах. Показано, что перинуклеарная локализация кислых клеточных органоидов в миобластах заменяется диффузным распределением этих органоидов по всему объему цитоплазмы миотубул. Получены данные по эндоцитозу квантовых точек, функционализированных ТАТ-пептидом, в миобластах и миотубулах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00838), программы фундаментальных исследований президиума РАН № 24 по нанотехнологиям и Междисциплинарного проекта СПбНЦ.

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ЦИТОКИН ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ α СНИЖАЕТ СПОСОБНОСТЬ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА К ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ В АДИПОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ. © А. В. Селенина,¹ С. А. Александрова,² Г. П. Пинаев.² ¹С.-Петербургский государственный университет, Nessa-5@yandex.ru и ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Мультipotентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) костного мозга, нарабатанные в культуре *in vitro*, оказывают терапевтическое воздействие при лечении ряда заболеваний. Показаны их способность к миграции к месту повреждения, интеграция в ткани, паракринные эффекты. Местное введение МСК приводит к более быстрому разрешению воспаления, улучшению функции органа путем препятствования формированию рубцовой ткани. Тем не менее влияние факторов, вырабатывающихся в зоне повреждения, на свойства и функции МСК изучено

недостаточно. Фактор некроза опухолей α (ФНО α) является одним из основных медиаторов воспаления, обычно сопровождающего раневой процесс. Было показано, что под влиянием ФНО α усиливается способность МСК адгезировать к эндотелиальным клеткам, увеличивается выработка ими ряда ростовых и противовоспалительных факторов, однако практически неизвестно, как влияет этот фактор на дифференцировочные способности МСК. Целью настоящей работы являлось изучение влияния ФНО α на способность МСК костного мозга к дифференцировке в адипогенном направлении. Для исследования использовали МСК, выделенные из костного мозга нижних конечностей беспородных белых лабораторных крыс. МСК 4-го пассажа в концентрации $1.5 \cdot 10^4$ клеток на 1 лунку высевали на 96-луночные планшеты в питательную среду α MEM с 10 % сыворотки эмбрионов коров, культивировали в течение 1 сут, после чего проводили индукцию адипогенной дифференцировки по стандартному протоколу. Одновременно добавляли ФНО α (24 нг/мл). На 6-е сут окрашивали нейтральные липиды красителем Oil Red и общий белок — кристаллическим фиолетовым (в разных лунках). Затем проводили экстракцию красителей и оценивали их оптическую плотность (ОП) с помощью спектрофотометра Fluorofot «Charity». Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2003 и Statistika 8.0. Через 6 сут после инкубации МСК в адипогенной среде можно было наблюдать изменение формы клеток на более округлую и появление большого количества групп клеток, содержащих липидные капли. Однако среди МСК, инкубированных в адипогенной среде в присутствии ФНО α , наблюдались только единичные клетки с липидными включениями. Проведенный количественный анализ содержания нейтральных липидов показал, что величина ОП в лунках, в которых клетки подвергались индукции дифференцировки, была в 1.2 раза выше по сравнению с ОП в лунках со стандартными условиями культивирования, а также с ОП в лунках, где клетки были индуцированы в адипогенез в присутствии ФНО α . При этом средняя величина ОП в лунках, в которых проводилась индукция дифференцировки, после окрашивания на общий белок не была повышена по сравнению с другими условиями культивирования. Очевидно, что увеличение количества липидов никак не связано с количеством клеток. Можно заключить, что под воздействием ФНО α способность МСК костного мозга к дифференцировке в адипогенном направлении снижается. Интересно было бы выяснить, обратим или нет процесс ингибирования дифференцировки под влиянием ФНО α , а также других факторов, секретируемых в участке воспаления.

ИНДУКЦИЯ НЕЙРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТЕВЛОВЫХ НЕЙРОКЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА. © В. М. Семенова,¹ Н. И. Лисянский,¹ Л. Д. Любич,¹ А. Ю. Петренко,² Л. П. Стайно.¹ ¹Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, liubichld@mail.ru и ²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков.

Успехи экспериментальных исследований биологии нейральных стволовых клеток (НСК) обеспечили возможность их использования для восстановления нормальной микроархитектоники нервной ткани при ряде дегенеративных заболеваний ЦНС. Одними из условий эф-

фективности клеточной терапии являются достаточный объем и адекватный клеточный состав трансплантируемого материала. Поэтому особое значение приобретает разработка методов получения в условиях культивирования клеточных популяций избирательно нейронального или глиального типа. Изучен дифференцировочный потенциал эмбриональных нейроцитов (ЭНК) мозга человека при воздействии индукторов нейрогенной дифференцировки. Кривоконсервированные ЭНК человека (7—9-я нед гестации), полученные из низкотемпературного банка клеток Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, культивировали в суспензии в среде ДМЕМ. Для цитологического исследования на 7, 14 и 30-е сут кластеры ЭНК переносили в пробирки, центрифугировали (3 мин, 1000 об/мин), осадок ресуспендировали в среде ДМЕМ и наносили на адгезивные стекла. Культуры содержали в CO₂-инкубаторе при 37 °С, наблюдали в инвертированном микроскопе (БИОЛАМ П-3, Санкт-Петербург). Пролиферативные и дифференцировочные свойства культивируемых ЭНК оценивали при добавлении препаратов: ИТС (производство Pan Eko Ltd., Россия), содержащего 0.05 мг/мл инсулина, 0.0275 мг/мл трансферрина и 0.0335 мг/мл селенита; 0.2 мг/мл ретинола ацетата и 1 % ФТС (Завод витаминных препаратов, Киев); 2 · 10⁻⁶ моль/л ретиноевой кислоты (Sigma, Германия). По окончании опытов культуры фиксировали в 10%-ном растворе формалина и окрашивали тионином. Иммуногистохимически в нейроцитах выявляли виментин (маркер прогениторных нейроцитов) и глиальный кислый фибриллярный белок (GFAP, маркер глиобластов и астроцитов) с помощью наборов Sigma (Германия). В контрольные культуры факторы дифференцировки не добавляли. Цитологические препараты изучали на цитоанализаторе изображения IBAS-2000 (Германия). Установлено, что в бессывороточной среде ДМЕМ на 7—9-е сут определялось снижение, а на 10—12-е сут — нарастание и стабилизация содержания ЭНК, что отражает наличие среди них долгоживущих НСК. При этом наблюдалось массовое прикрепление к субстрату округленных нейроцитов с минимальным фенотипом, расположенных изолированно или в виде микроагрегатов. ЭНК длительно сохраняли округлую форму без признаков цитодифференцировки и выявляли экспрессию виментина, подтверждающего их принадлежность к пулу прогениторных нейроцитов. В ходе культивирования доля виментин-положительных клеток увеличилась с 28.6 ± 3.6 % на 2-е сут до 77.0 ± 13.9 % на 16-е сут, что отражает их способность к пролиферации. В культурах ЭНК в присутствии индукторов дифференцировки установлено, что наличие в питательной среде ретинола ацетата индуцировало формирование нейросфер с морфологической и иммунофенотипической гетерогенностью и тенденцией к образованию примитивных отростков в небольшой части клеток. При наличии в культурах ретиноевой кислоты в 20—30 % ЭНК выявлены признаки цитотипической нейробластной и нейрональной дифференцировки, реже выявлялись нейроциты астроцитарного фенотипа с экспрессией GFAP. Таким образом, в культурах кривоконсервированных ЭНК мозга человека наблюдалась пролиферация прогениторных виментин-положительных нейроцитов, а в присутствии ретиноевой кислоты установлена индукция их направленной дифференцировки по нейрональному и глиальному типу.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА АМФИЭФИЙДОЛОК НА РОСТОВЫЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ ECV304. © А. Ю. Столбовая, М. П. Самойлович, К. Н. Маковецкая, А. А. Пиневич, А. М. Гранов. Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург.

Разработанный в РНЦРХТ препарат амфиэфидолок содержит иодированные производные эфиров линолевой и олеиновой кислот. Он предназначен для использования в качестве рентгеноконтраста и средства эмболизации сосудов в противоопухолевой терапии. При введении в организм он контактирует прежде всего с внутренней поверхностью кровеносных сосудов, поэтому задача исследования состояла в изучении влияния препарата амфиэфидолок на ростовые и фенотипические характеристики клеток эндотелия в культуре. Клетки эндотелия линии ECV304 культивировали в ростовой среде αMEM с 5 % эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки рассевали в 4-луночные планшеты по 10 000 кл./см² и инкубировали при 37 °С, газовая фаза содержала 5 % CO₂. Эмульсии амфиэфидолока на ростовой среде готовили из расчета 0.25—2 объемных % методом 20-кратного пропускания через инъекционную иглу. В культурах эндотелия, достигших 70—80 % конfluence, ростовую среду заменяли на содержащую препарат эмульсию, в которой клетки культивировали в течение 24 ч. Затем клеточный монослой отмывали от эмульсии путем повторной замены ростовой среды. Полноту удаления эмульсии контролировали с помощью инвертированного микроскопа. Присутствие жирового препарата в цитоплазме клеток выявляли с помощью красителя Oil Red O. Контролем служили клетки, культивируемые в ростовой среде. Для подсчета клеток использовали кондуктометрический счетчик Z1 Coulter Counter. Фенотипирование поверхностных клеточных маркеров проводили по стандартной методике на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™. Инкубация эндотелиальных клеток с амфиэфидолоком приводила к появлению в цитоплазме многочисленных липидсодержащих включений, которые сохранялись еще в течение 2 сут после отмывания от препарата. Амфиэфидолок оказывал дозозависимое влияние на численность популяции клеток эндотелия. В культурах, инкубированных в среде, содержащей 0.25 % препарата, количество клеток было на 30 % меньше, чем в контроле. Повышение содержания препарата в среде культивирования до 1—2 % приводило к усилению различий между опытом и контролем. Фенотипирование клеток ECV304 показало, что эндотелиоциты экспрессируют антигены CD29 (99.3 % клеток), CD44 (98 %), CD105 (89.5 %), CD166 (80.5 %), CD62E (52.8 %) и CD73 (49 % клеток). Культивирование в присутствии 0.25 % амфиэфидолока приводило к снижению уровня экспрессии молекул клеточной адгезии — рецептора к гиалуроновой кислоте (CD44) и E-селектина (CD62E), но не изменяло состава популяции по экспрессии остальных перечисленных маркеров. При этом отмечалось, что клетки, инкубированные с препаратом, при обработке химопсин-версеном быстрее открепляются от поверхности пластика, чем контрольные клетки. Таким образом, клетки эндотелия линии ECV304 при инкубации с амфиэфидолоком поглощают препарат, что приводит к изменению адгезивных свойств клеток и ростовых характеристик культуры.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ — РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА И РАЗВИТИЯ ПОЗВОНОЧНИКА В НАТИВНЫХ И КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ХОНДРОБЛАСТАХ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ПОЗВОНОЧНИКА. © Е. Л. Строчкова,¹ А. М. Зайдман,¹ Е. И. Щелкунова.¹ ¹Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии, EZavyalova@niito.ru

Культивируемые клетки могут служить адекватными моделями для исследования процессов дифференцировки клеток в норме и патологии и дают возможность проводить параллели между процессами *in vitro* и *in vivo*. Однако не всегда полученные *in vitro* знания возможно ассимилировать на природных объекты, поскольку в процессе культивирования клетки реализуют ранние стадии морфогенеза. Следовательно, исследуя экспрессию генов при различных патологиях в культуре клеток, не всегда удастся получить достоверные данные. Нами предпринято исследование с целью: произвести сравнительный анализ уровней экспрессии генов — регуляторов роста и развития позвоночника в нативных и культивированных хондробластах позвоночника эмбриона человека 10—12 нед развития.

Из хрящевой ткани эмбрионального позвоночника (фетусы человека 10—12 нед развития, 20 образцов) получали клетки. Половину выделенных клеток подвергали культивированию в течение 15 дней в среде DMEM F2 с добавлением 20 % FBS. Из культивированных и не подвергавшихся культивированию клеток (10 образцов) тризольным методом выделяли РНК. Полученную РНК обрабатывали RNase-free DNase и синтезировали кДНК в реакции обратной транскрипции. Уровень экспрессии генов определяли методом количественной ПЦР в режиме реального времени (Real-Time SYBR Green). Для вычисления относительного количества каждого целевого гена все гены нормировали по гену Gapdh.

Исследование экспрессии генов, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща выявило, что уровень мРНК генов, кодирующих синтез основных протеогликанов хрящевой ткани — агрекана, люмикана, версикана, генов коллагенов 1- и 2-типов, гена линк-белка и генов, участвующих в сульфатировании протеогликанов (сульфотрансферазы 1 и 3) в нативных хондробластах позвоночника эмбриона, был выше, чем в культивированных ($P < 0.05$). Ген DTDST, обеспечивающий транспорт сульфатов в хондроциты в нативных и культивированных клетках, был экспрессирован на одинаковом уровне. Анализ уровней мРНК генов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки (транскрипционные факторы Pax1, Pax9, Sox9, ген INH, играющий ключевую роль в дифференциации хондроцитов), показал высокий уровень экспрессии в эмбриональных хондробластах по сравнению с культивированными клетками ($P < 0.05$). Исследование экспрессии генов, участвующих в процессе регуляции роста позвоночника, выявило сходный уровень экспрессии гена рецептора инсулин-зависимого фактора роста (IGFR), гена рецептора гормона роста (GHR), гена рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и гена рецептора трансформирующего фактора роста (TGFR) в культивированных и нативных хондробластах.

Таким образом, в культивированных клетках фактически сохраняется генная регуляция дифференцировки хондробластов, но в то же время снижена экспрессия ге-

нов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки и кодирующих синтез основных компонентов матрикса хряща и сульфатирования протеогликанов. Из этого следует, что исследовать экспрессию генов при различных патологиях в культивированных клетках не рекомендуется.

ЭНДОГЕННЫЙ УРОВЕНЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА. © Н. В. Тихомирова, О. Г. Люблинская, Н. А. Пуговкина, Н. Н. Никольский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, nata_t91@yahoo.com

В последнее время интерес к изучению внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) постепенно меняет свою направленность: информация о патологическом воздействии на клетки высоких, стрессовых уровней АФК дополняется сведениями о влиянии эндогенных уровней АФК на регуляцию клеточной жизнедеятельности. Опубликованы данные об участии эндогенных АФК в модуляции клеточной сигнализации, о роли АФК в клеточной пролиферации и дифференцировке (Ehab et al., 2009). Несомненный интерес вызывают работы, демонстрирующие влияние АФК на регуляцию клеточного цикла и пролиферативный статус нормальных и опухолевых клеток мыши и человека (Гамалей и др., 2001; Menon et al., 2003; Courtney et al., 2006). Авторами этих работ было показано, что переход клеток из фазы G₀/G₁ в S-фазу клеточного цикла сопровождается временным увеличением эндогенного уровня АФК, и высказаны предположения о взаимосвязи этого эффекта с накоплением циклинов, регулирующих прохождение клеток по циклу. Вместе с тем в стволовых клетках закономерности изменения базального уровня АФК пока мало изучены. Цель данной работы заключалась в изучении взаимосвязи изменения эндогенных уровней АФК и распределения по фазам клеточного цикла мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека. В качестве объекта для настоящего исследования использовали культуры МСК эндометрия человека (Земелько и др., 2011). В эксперименте исследовали как асинхронные, так и синхронизированные культуры. Синхронизация в фазе G₀/G₁ клеточного цикла достигалась путем культивирования клеток в среде со следовыми количествами фетальной бычьей сыворотки (0.2 %) в течение 24 ч. Уровень АФК и распределение по фазам клеточного цикла измерялись с помощью проточной цитометрии. В экспериментах с асинхронными культурами было показано, что уровень АФК зависит от пролиферативной активности культуры и повышается с увеличением доли клеток, находящихся в S-фазе. Предположение о том, что изменение эндогенного уровня АФК связано с процессом перехода клетки из фазы G₀/G₁ в S-фазу, было подтверждено в экспериментах на синхронизированных культурах. Было показано, что через 12 ч после активации голодающей культуры средой с 10%-ным содержанием сыворотки происходит временное 2-кратное увеличение уровня АФК, предшествующее на несколько часов переходу клеток в S-фазу. Из полученных нами данных следует, что для МСК существуют те же закономерности изменения эндогенного уровня АФК в зависимости от распределения по фазам клеточного цикла, что и для дифференцированных клеток. Природа наблюдаемого эффекта требует дальнейших исследований.

Список литературы

- Гамалей И. А., Полозов Ю., Аксенов Н. Д., Дариева З. А., Кирпичникова К., Поспелова Т. В. 2001. Цитология. 43 : 595.
- Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнина А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Курсанов А. А., Бичева Н. К., Корсаков В. С., Никольский Н. Н. 2011. Цитология. 53 : 919—929.
- Courtney G. Havens, Alan Ho, Naohisa Yoshioka, and Steven F. Dowdy. 2006. Mol. Cell. Biol. 26 : 4701—4711.
- Ehab H. Sarsour, Maneesh G. Kumar, Leena Chaudhuri, Amanda L. Kalen, Prabhat C. Goswami. 2009. Antioxid. Redox Signal. 11 : 2985—3011.
- Menon S. G., Sarsour E. H., Spitz D. R., Higashikubo R., Sturm M., Zhang H., Goswami P. C. 2003. Cancer Res 63 : 2109—2117.

ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ПРЕВРАЩЕНИЯ АТФ-G-AКТИНА В F-AКТИН В Mg^{2+} -СОДЕРЖАЩИХ РАСТВОРАХ. © В. Н. Умецкая. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Известно, что АТФ-G-актин может трансформироваться в F-актин. Это превращение наиболее эффективно в присутствии солей магния. По предположению, АТФ-G-актин в присутствии Mg^{2+} претерпевает конформационные изменения с образованием АТФ-F-актина с последующим гидролизом до АДФ-F-актина и выходом свободного фосфата Pi в раствор (схема 1) или при взаимодействии АТФ-G-актина с Mg^{2+} происходит гидролиз фосфатной связи с образованием АДФ-G-актина+Pi, переходящий в АДФ-F-актин, и выходом свободного фосфата в раствор (схема 2). Из двух предполагаемых схем полимеризации G-актина, схема 2 была подтверждена нами по данным изменения УФ-спектров поглощения АТФ-G-актина в растворе и АДФ-G-актина в растворе, содержащем соли Mg, во времени, а также в зависимости от концентрации Mg^{2+} . Дальнейшее изучение роли Mg^{2+} в полимеризации актина было предпринято с помощью спектров ЯМР. Получены спектры ЯМР при силе магнитного поля 300.130 MHz растворов в D_2O АТФ-G-актина, а также АТФ-G-актина в присутствии дикаатиона Mg. Обнаружено различие в спектрах резонанса протонов исследуемых образцов. В частности, наблюдается расщепление полосы резонанса от протона H_8 гистидинового кольца аденина на два резонанса. Дополнительная полоса отнесена к резонансу от протона H_8 АДФ-G-актина. Во времени наблюдаются увеличение интенсивности (I) полосы резонанса протона H_8 АДФ-G-актина и уменьшение интенсивности полосы резонанса протона H_8 АТФ-G-актина. Изменение отношения I (АДФ)/I (АТФ) во времени носит кооперативный характер. Полученные результаты подтверждают выводы, сделанные нами ранее на основании изучения УФ-спектров поглощения о механизме превращения АТФ-G-актина в F-актин под действием Mg^{2+} по схеме 2: АТФ-G-актин + $MgCl_2 \rightarrow$ АДФ-G-актин+Pi \rightarrow АДФ-F-актин+Pi.

НАПРАВЛЕННАЯ МИГРАЦИЯ КЛЕТОК РЕЦИПИЕНТА В МАТРИКС ТРАНСПЛАНТАТОВ СОСУДОВ И КЛАПАНОВ СЕРДЦА ПОД ДЕЙСТВИЕМ РЕКОМБИНАНТНЫХ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ. © И. С. Фадеева,^{1,2} Р. С. Фадеев,^{1,2} А. С. Сачков,³ Д. В. Бритиков,³ В. С. Акатов.^{1,2} ¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, ²Пущинский государ-

ственный естественно-научный институт и ³Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева РАМН, Москва.

На сегодняшний день трансплантаты сосудов и клапанов сердца (ТСКС) являются самыми перспективными материалами для хирургического лечения необратимых сосудистых и клапанных патологий и активно используются в РФ и за рубежом. Однако, несмотря на ряд преимуществ, широкое внедрение ТСКС в клиническую практику ограничено развитием в них после имплантации патологического кальциноза, а также тем, что не происходит заселения трансплантатов клетками реципиента, а значит, не происходит ремоделирования структуры матрикса, что в конечном счете приводит к дегенерации ТСКС. Описанные патологические явления приводят к ограничению срока функционирования ТСКС и, следовательно, к необходимости сложных реопераций, что особенно драматично проявляется у молодых пациентов. Для снижения иммуногенности и предотвращения кальциноза ТСКС активно разрабатываются способы их предимплантационной децеллуларизации или девитализации. Предполагается, что в результате разрушения или гибели клеток донора до имплантации будет подавлена иммуногенность и элиминированы центры нуклеации кальциноза ТСКС. Однако предложенные до настоящего времени методы децеллуларизации матрикса трансплантатов не могут одновременно предотвращать дегенерацию, кальциноз и иммуногенность трансплантатов клапанов сердца и сосудов, так как не могут обеспечить удаление клеток донора без повреждения структуры и архитектоники внеклеточного матрикса. Таким образом, разработкой новых высокоэффективных методов предварительной модификации ТСКС с целью подавления их иммуногенности и кальцификации по-прежнему является актуальной задачей. Для обеспечения ремоделирования ТСКС предлагается два основных подхода: 1) предварительная репопуляция ТСКС ауто- или аллогенными клетками реципиента; 2) применение цитокинов — хемоаттрактантов мезенхимных клеток, обеспечивающее направленную репопуляцию матрикса графтов уже в организме реципиента. Однако до настоящего времени не создано приемлемых для практического применения способов реализации указанных подходов. Таким образом, задача по повышению эффективности репопуляции ТСКС остается актуальной. В нашей лаборатории разработан способ подавления иммуногенности и кальцификации ТСКС. В проведенных нами исследованиях показано, что модификация ТСКС рекомбинантным тромбоцитарным ростовым фактором PDGF BB стимулирует миграцию мезенхимных клеток в глубь матрикса децеллуларизированных и девитализированных ТСКС в условиях *in vitro* и *in vivo*. Нами также показано, что обработка ТСКС до имплантации ростовым фактором PDGF BB в комбинации с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) *in vivo* может способствовать развитию атерогенного эффекта. На модели подкожной имплантации крысам нами установлено, что в зависимости от способа девитализации с последующей модификацией указанной комбинацией ростовых факторов можно добиться репопуляции матрикса ТСКС в организме реципиента уже через 6 нед имплантации без развития атерогенного эффекта и патологического кальциноза.

Работа проведена при финансовой поддержке программы «У.М.Н.И.К.» (Госконтракт № 9870р/14299) и

стипендиального гранта президента РФ (№ СП-6867.2013.4).

РОЛЬ АППАРАТА ГОЛЬДЖИ В ОРГАНИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК. I. РЕГУЛЯЦИЯ ОРГАНИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК ПРОТЕИНКИНАЗАМИ. © А. И. Фокин,¹ А. В. Бураков,² Е. С. Надеждина.^{2,3} ¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, fktimofei@yandex.ru, ² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ³ Институт белка РАН, Москва.

В культивируемых животных клетках микротрубочки в большинстве случаев образуют радиальную систему с единым центром их организации (ЦОМТ), представленным центросомой. В некоторых случаях в качестве дополнительного ЦОМТа могут выступать мембраны аппарата Гольджи (АГ). При исследовании двух клеточных линий эпителия почки зеленой мартышки, Vero и BS-C-1, оказалось, что для клеток BS-C-1 АГ является более значимым ЦОМТом, чем центросома, а для клеток Vero — менее значимым. Это было показано как на интактных клетках, так и при различных воздействиях, нарушающих функции центросомы или АГ: разрушение АГ приводило к более выраженным нарушениям микротрубочек в клетках BS-C-1, чем Vero. Разрушение центросомной системы микротрубочек, достигаемое путем экспрессии доминантно-негативной формы киназы LOSK/SLK (LOSK-K63RΔT), которая в норме участвует в поддержании радиальной системы микротрубочек на центросоме, приводило к хаотизации системы микротрубочек в клетках Vero, хотя слабо влияло на клетки BS-C-1. Сравнительный анализ экспрессии белков, участвующих в организации микротрубочек на АГ, показал, что различие может быть опосредовано повышенной экспрессией белка CLASP2 в клетках BS-C-1. Однако гиперэкспрессия CLASP2 в клетках Vero не способствовала повышению активности АГ как организатора микротрубочек. Экзогенный белок локализовался преимущественно на микротрубочках, нарушая их радиальную систему, что могло означать недостаточное его фосфорилирование протеинкиназами, одной из которых, по литературным данным, является GSK-3β. Действительно, оказалось, что клетки BS-C-1 имели повышенный уровень активности киназы GSK-3β по сравнению с Vero. Ингибирование данной киназы в клетках BS-C-1 привело к утрате способности АГ служить основным ЦОМТом. Далее мы сравнили везикулярный транспорт в клетках Vero с радиальными и хаотизированными микротрубочками. Для этого мы прослеживали движение везикул ERGIC, маркированных при помощи конструкции ERGIC53-GFP, в контрольных клетках и в клетках, экспрессирующих LOSK-K63RΔT. Оказалось, что мгновенная скорость везикул, измеряемая как их среднее смещение за 1 с, оставалась неизменной. Таким же, как и в контрольных клетках, сохранялся характер распределения движения везикул по их скоростям. Однако везикулярный транспорт на длинные дистанции был нарушен: скорость сборки компартмента ERGIC после его диспергирования Brefелдином А была заметно снижена по сравнению с контролем. Такой эффект является, по-видимому, результатом нарушения радиальной системы микротрубочек, что не позволяет клетке также

эффективно осуществлять транспорт и поддерживать поляризованность. Таким образом, не имея прямого влияния на внутриклеточную подвижность, протеинкиназа LOSK/SLK тем не менее оказывает влияние на внутриклеточный транспорт за счет обеспечения радиального расположения микротрубочек.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-01022-а и 12-04-33178-мол-а-вед).

СПОСОБНОСТЬ К КЛЕТОЧНОМУ КАННИБАЛИЗМУ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ A431 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА. © Л. А. Хаиба, И. Мамичев, О. П. Кисурин-Евгеньева, Г. Е. Онищенко. Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Явление клеточного каннибализма (КК) описано в литературе, однако пристальный интерес исследователей привлекло только в последнее время. Одним из вариантов КК является энтоз. В случае энтоза одна трансформированная эпителиальная клетка ошаривается и активно внедряется в распластанную клетку. В дальнейшем такая клетка, как правило, подвергается лизосомопосредованной деградации. Однако в некоторых случаях поглощенная клетка может вступать в митотическое деление и даже покидать поглотившую ее клетку. В основе механизма внедрения лежит работа актомиозиновой системы, регуляция осуществляется сигнальным каскадом Rho-ROCK. Однако основные механизмы внедрения и дальнейшая судьба клеток во многом неясны. Целью данного исследования является определение способности клеток-каннибалов и внедрившихся клеток к продвижению по клеточному циклу.

В клетках культуры A431 (эпидермоидная карцинома человека) каннибалический индекс составляет $0.9 \pm 0.6\%$. Анализ препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, показал, что встречаются все возможные фенотипы клеток-каннибалов — как гетерофазные (каннибал в интерфазе, поглощенная клетка в митозе, и наоборот), так и гомофазные (интерфазные и митотические). Импульсное включение предшественника синтеза ДНК BrdU также позволило выявить в культуре клеток A431 гомо- и гетерофазные энтозы (гомофазные меченые и меченые энтозы, гетерофазные энтозы — меченая клетка-каннибал, меченая поглощенная клетка). Таким образом, и клетки-каннибалы, и поглощенные клетки способны вступать в митоз и синтезировать ДНК в процессе клеточного каннибализма. При этом митотические клетки чаще встречаются среди поглощенных клеток, а индекс мечения клеток-каннибалов несколько превышает индекс мечения в популяции. Оба этих факта могут свидетельствовать о замедлении прохождения этих фаз клеточного цикла. Остановка клеточного цикла на границе G₁ и S-фазы воздействием гидроксимочевины (4 мМ) не влияет на КК.

Так как в процессе деградации поглощенной клетки происходит постепенное закисление каннибалической вакуоли, было проведено окрашивание лизосомного компартмента. Слабое закисление каннибалической вакуоли на начальных этапах КК не препятствует прохождению S- и M-фазы клеточного цикла. На этой стадии клетка-каннибал и поглощенная клетка соединены адгезивны-

ми контактами. Нарушение межклеточных контактов совпадает с активацией лизосом поглощенной клетки и клетки-каннибала. На последних этапах деградации каннибалическая вакуоль не окрашивается рН-зависимыми лизосомными красителями.

В целом полученные нами данные свидетельствуют о том, что как клетка-каннибал, так и поглощенная клетка способны продвигаться по клеточному циклу (S-фаза и митоз) в процессе энтоза. Вероятно, при энтозе время прохождения этих фаз увеличивается. Поглощенная клетка способна к продвижению по клеточному циклу ограниченное время. Можно предположить, что нарушение поступления питательных веществ в поглощенную клетку активирует в ней лизосомный компартмент, что в свою очередь ведет к нарушению межклеточных контактов. Клетка-каннибал также участвует в закислении каннибалической вакуоли, что и приводит к лизосомной деградации поглощенной клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01518-а).

ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ АКТИНА И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ. © С. Ю. Хайтлина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, skhspb@gmail.com

Внутриклеточный транспорт связывают прежде всего с перемещением частиц (груза) по микротрубочкам. Вместе с тем в клетках существует две актинзависимые транспортные системы. В первой из них, актомиозиновой, транспортером является миозин, который перемещается по актиновым микрофиламентам. Вторая актинзависимая транспортная система основана на перемещении частиц с помощью «кометоподобного хвоста», образующегося на поверхности частицы в результате полимеризации актина, подобно тому как перемещаются внутри клетки патогенные бактерии.

Принципиальную роль в нуклеации полимеризации актина на поверхности перемещаемой частицы играет комплекс белков Arp2/3, который способствует олигомеризации мономеров актина, а затем — поляризованному удлинению нитей актина на быстром, обращенном к поверхности частицы конце нитей. Активность комплекса Arp2/3 регулируется белками семейства WASP, которые ассоциированы с мембраной и в свою очередь активируются белками сигнальных каскадов. Расширение этого процесса приводит к образованию «дендритоподобной» сети актиновых филаментов, сходной с ультраструктурой примембранного цитоскелета на переднем крае движущихся клеток, что послужило основой для предположения о ведущей роли полимеризации актина в перемещении цитоплазматической мембраны (Borisi, Svitkina, 2000).

Оказалось, что актинзависимой может быть также подвижность внутриклеточных везикул. Показано, что с помощью «кометоподобного хвоста» перемещаются макропиноцитозные вакуоли (пиносомы) (Merrifield et al., 1999; Garrett et al., 2000), клатриновые окаймленные пузырьки (Merrifield et al., 2002; Merrifield, 2004; Collins et al., 2011), эндосомы и лизосомы в ооцитах шпорцевой лягушки и в бесклеточной системе, содержащей экстракт ооцитов лягушки (Tauton et al., 2000). Такой же механизм обеспечивает движение везикул, содержащих мембранные рафты, обогащенные сфинголипидами и холестери-

ном (Rozelle et al., 2000). В образовании актиновых «кометоподобных хвостов» участвуют активаторы комплекса WASP-Arp2/3: малые ГТФазы Cdc 42 (Tauton et al., 2001) и ARF6 (Schafer et al., 2000), тирозинкиназа, фосфолипаза D, D3-фосфоинозитиды (Schafer et al., 2000) или фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (PIP2) (Rozelle et al., 2000) и другие компоненты сигнальных систем клетки.

Как показали данные высокоразрешающей электронной микроскопии и электронной томографии, формирование актинового «кометоподобного хвоста» является ключевой стадией сборки актина на окаймленных (клатриновых) пузырьках. Полимеризация актина, индуцированная белками семейства WASP и комплексом Arp2/3, приводит к образованию сети филаментов сначала в виде небольших латеральных островков на периферии пузырьков. Затем филаменты окружают частично инвагинировавшие пузырьки и превращаются в поляризованный «хвост», когда везикулы готовы к отделению или отделены от плазматической мембраны. При этом «быстрые» концы актиновых нитей отталкивают эндоцитозные везикулы от плазматической мембраны (Collins et al., 2011). По-видимому, такой же механизм регулирует образование «кометоподобных хвостов» и транспорт других внутриклеточных везикул.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЖИВЫХ КЛЕТОК IN VITRO ПРИ ИЗМЕНЕНИИ НАПРАВЛЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ РАВНОДЕЙСТВУЮЩЕЙ СИЛЫ. © М. О. Хотянович,¹ Ю. П. Стукач,¹ Т. А. Гуринович,¹ М. А. Несович.² ¹Институт физиологии Национальной академии наук Белоруссии, Pochta_margo@mail.ru и ²Республиканский научно-практический центр гигиены, Минск, Белоруссия.

В настоящее время не существует единой точки зрения о том, как реально отражается изменение направления равнодействующей силы на функциональном состоянии отдельных клеток живого организма. Изменения на уровне клеток, тканей, органов, систем и всего организма в целом, происходящие в условиях изменения направления действия равнодействующей силы, настолько разнятся, что это не позволяет выявить унифицированные закономерности, типичные для этого воздействия. Исходя из вышесказанного целью работы явился анализ проблемы только на клеточном уровне, а именно жизнеспособности клеток фибробластов человека и крысиной глиомы С6 после изменения направления равнодействующей силы. В экспериментах на культуре клеток крысиной глиомы С6 и фибробластов человека изменяли на угол 60° положение 96-луночных планшетов относительно горизонтальной плоскости. Поворот осуществляли через 40—48 ч после достижения конfluence в 70%. Сопоставляли на основании анализа результатов МТТ-теста особенности пролиферативной активности клеток в планшетах, один из которых на протяжении всего эксперимента находился в горизонтальном положении (серия 1), другой располагался под углом 60° (серия 2). МТТ-метод определения жизнеспособности клеточных культур использует способность живых клеток превращать растворимый желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формазана (МТТ-ф). Нежизнеспособные мертвые клетки такой способностью не обладают. Установлено, что функциональ-

ное состояние фибробластов, находящихся в течение всего эксперимента в горизонтальном положении, не отличалось от такового у клеток, культивируемых под углом 60°. Поворот планшетов с культурой клеток крысиной глиомы С6 сопровождался снижением жизнеспособности опухолевых клеток в отличие от тех, которые в течение всего эксперимента располагались в горизонтальном положении. Полученные данные свидетельствуют о том, что при изменении направления действия равнодействующей силы наблюдается тканеспецифическая трансформация жизнеспособности клеток. В культуре опухолевых клеток жизнеспособность снижается в отличие от нормальных немалигнизированных клеток. Эти факты, свидетельствующие о разнонаправленных сдвигах функциональной активности патологически измененных клеток (глиома С6) и фибробластов, дополняют отмеченные ранее закономерности изменения пролиферативной активности опухолевых и нормальных клеток.

НОВАЯ ГЕЛЕВАЯ ФОРМА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ.
© А. С. Хрупина,^{1,2} И. Л. Трофимова,² Ю. В. Юркевич,^{1,2} И. Д. Козулин,³ А. Б. Смолянинов.^{1,2} ¹Северо-западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, ²ООО «Покровский банк стволовых клеток» и ³Научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Alexandra.khrupina@gmail.com

Фибробласты представляют собой гетерогенную популяцию клеток мезенхимного ряда и играют ключевую роль в процессах регуляции клеточных взаимодействий и поддержании гомеостаза кожи. Способность фибробластов формировать межклеточный матрикс, вызывать миграцию и пролиферацию разных типов клеток при повреждениях кожи делает их привлекательным инструментом для лечения последствий ожоговой травмы, которые по-прежнему представляют серьезную проблему здравоохранения. Разработка новых препаратов для ускоренного восстановления кожного покрова является перспективным направлением регенеративной медицины. В настоящем исследовании предложен препарат на основе аллогенных фибробластов, заключенных в гель, в качестве основы для клеточного препарата аллогенных фибробластов предложен гелеобразующий полимер гидроксиэтилцеллюлозы. Культуры фибробластов были получены из материала крайней плоти молодых доноров в возрасте 2—7 лет с помощью механической и ферментативной обработки (коллагеназа I-го типа, 0.1 %) и поддерживались в среде MEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки и пенициллина и стрептомицина. После осуществления процедур контроля качества (ПЦР на отсутствие в фибробластах ВИЧ, ВГВ, ВГС и *Mycoplasma* spp., кариотипирования и бактериологического исследования питательной среды) культуры подвергали криоконсервации с использованием программного замораживателя (Planer, Великобритания) и помещали на длительное хранение в жидкий азот. Перед проведением исследований *in vitro* проводили стандартную процедуру размораживания клеточных культур с использованием водяной бани. Полимер гидроксиэтилцеллюлозы в концентрации 1 % *in vitro* не является токсичным для культур фибробластов, не препятствует адгезии клеток к поверхности культурального пластика и их делению, а так-

же не изменяет способности фибробластов к синтезу коллагена I-го типа по сравнению с контролем. В ограниченных исследованиях эффективности и безопасности клинического применения гелевой композиции с фибробластами принимали участие 13 пациентов ожогового отделения НИИ скорой помощи в возрасте от 24 до 78 лет, получивших термические ожоги II и IIIa степени. После получения информированного согласия от пациентов и санитарной обработки раны гель с клетками в концентрации 250 000 кл./мл из расчета 1 мл на 5 см² площади тела наносили на ожоговую поверхность. За показатель эффективности принимали срок эпителизации раневой поверхности. Во всех случаях у пациентов не отмечали неблагоприятных реакций на компоненты препарата. Эпителизация обширных ожоговых ран II степени происходила на 4—10 сут быстрее по сравнению с контролем, а ожоговые раны IIIa степени затягивались на 4—15 сут быстрее по сравнению с контролем. Результаты исследования позволяют предположить возможность использования полученного препарата в клеточной терапии ожоговых ран.

МОДИФИКАЦИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ЭФФЕКТОРАМИ. © О. А. Цангуна. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, olga566@mail.ru

Бактерии могут проникать в клетки эукариот, регулируя собственный фагоцитоз клеткой-хозяином. Захват бактерии осуществляется за счет перестройки цитоскелета клетки-хозяина, которые происходят в результате активации сигнальных путей бактериальными эффекторами. Управлять этим процессом бактерии могут с помощью внеклеточных токсинов, лигандов на поверхности бактериальной клетки и факторов вирулентности, введенных в клетку-хозяина. Механизмы инвазии делят на две группы — механизм «застежки-молнии» и триггерный механизм (Cossart, Sansonetti, 2004). Во время инвазии по механизму «застежки-молнии» взаимодействие бактериального лиганда с клеточным рецептором активирует сигнальную систему клетки-хозяина, обеспечивая перестройку цитоскелета, необходимые для образования фagosомы. Наиболее хорошо изучены использующие этот механизм инвазии бактерии *Yersinia* и *Listeria* (Galán, Cossart, 2005; Bonazzi et al., 2009). Другой механизм инвазии патогенных бактерий — триггерный, который используют бактерии *Salmonella* и *Shigella* (Cain et al., 2008; Schroeder, Hilbi, 2008). Для проникновения в клетку-мишень по этому механизму патогенные бактерии инициируют свое поглощение клеткой-хозяином, вводя в клетку сигнальные молекулы, регулирующие или имитирующие множество белков клетки-хозяина. Попав в клетку-хозяина, бактериальные белки становятся факторами вирулентности, участвуя в различных сигнальных каскадах, и в конечном итоге приводят к фагоцитозу бактерии. Первым этапом инвазии является адгезия, поверхностные белки патогенных бактерий прямо или опосредованно взаимодействуют с белками клетки-хозяина, участвующими в клеточной адгезии. Для многих бактерий мишенью становятся интегрин (Hauck et al., 2012) и E-кадгерин (Trojanovsky, 2005). Взаимодействия между бактериальным белком и рецепторами клетки-хозяина вызывают каскад сигналов, включая фосфорилирование белков и (или) привлечение белков-адаптеров и эффекторов, и ак-

тивацию компонентов цитоскелета. Эти процессы приводят к первоначальным перестройкам актинового цитоскелета, необходимым для интернализации (Cossart, Sansonetti, 2004). Если инвазия происходит по триггерному механизму, то для полного захвата бактерии через систему секреции III типа бактерии впрыскивают в цитоплазму клеток эукариот набор белков-эффекторов (Schroeder, Hilbi, 2008). Их мишенью в клетке-хозяине чаще всего становятся сигнальные пути, которые не являются специфическими для фагоцитоза, и непосредственно цитоскелет. Основной мишенью эффекторов патогенных бактерий являются малые ГТФазы Rho и тирозинкиназы, отвечающие за реорганизацию цитоскелета клеток эукариот (Schroeder, Hilbi, 2008; Spiering, Hodgson, 2011). Бактериальные эффекторы, катализируя обмен ГДФ на ГТФ, активируют малые ГТФазы. Активированные ГТФазы взаимодействуют с белками семейства WASP, которые в свою очередь связывают и активируют комплекс Arp2/3 (белковый комплекс, инициирующий нуклеацию актина), что вызывает нуклеацию полимеризации актина. Бактериальные эффекторы могут контролировать динамику актина и без участия Rho-ГТФаз, непосредственно стабилизируя филаменты актина, подавляя обмен субъединиц в полимере (McGhie et al., 2001; Cain et al., 2008) или дестабилизируют сеть актиновых филаментов. Таким образом, интенсивность инвазии определяют бактериальные факторы вирулентности, которые в месте контакта бактерии с клеткой-хозяином регулируют полимеризацию актина, а полимеры актина служат каркасом для мембранных выростов, захватывающих бактерию.

МОНЕНСИНДУЦИРОВАННАЯ АКТИВАЦИЯ ВЫХОДА ПРОТЕАСОМ ИЗ КЛЕТОК ВО ВНЕКЛЕТОЧНОЕ ПРОСТРАНСТВО. © А. С. Цимоха,¹ Ю. Я. Зайкова,¹ В. А. Куличкова,¹ Ю. Я. Ермолаева,¹ Н. А. Барлев.^{1–3} ¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, atsimokha@mail.cytspb.rssi.ru, ² Университет г. Лестер, Великобритания, и ³ С.-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет).

Убиквитин-протеасомная система (УПС) является основной системой деградации белка в клетке эукариот. Белки, помеченные полиубиквитиновой цепочкой с помощью каскада убиквитирующих ферментов, расщепляются затем до пептидов и отдельных мономеров убиквитина 26S протеасомой. УПС является не только «утилизирующей машиной» для контроля за временем жизни белка, но также за счет деградации специфических регуляторных белков играет центральную роль в регуляции таких основных клеточных процессов, как клеточная дифференцировка и развитие, транскрипция и репарация ДНК, продвижение клетки по клеточному циклу и пролиферация, иммунный и воспалительный ответы, апоптоз. Кроме того, УПС также участвует во многих патологических событиях, таких как опухолеобразование и метастазирование, воспалительные процессы, нейродегенеративные заболевания (болезни Паркинсона и Альцгеймера), вследствие чего компоненты УПС рассматриваются в качестве фармацевтических мишеней. Согласно современным представлениям, протеасомы в клетке всюдесущи: они находятся и в ядре, и в цитоплазме клеток. Показано также, что протеасомы связаны с цитоскелетом и с мембраной. В последние годы в литературе появились данные о том, что протеасомы обнаружены в различных

внеклеточных жидкостях — альвеолярной и спинномозговой жидкостях, в плазме крови, а также в среде культивирования клеток. Важно подчеркнуть, что протеасомы являются физиологическим компонентом плазмы крови и в норме присутствуют у всех здоровых людей. Однако при патологических состояниях организма наблюдается повышение количества протеасом в плазме крови, что позволяет рассматривать внеклеточные протеасомы в качестве маркеров при диагностике заболеваний. Исследуя выход протеасом из трансформированных и нетрансформированных клеток линий человека K562 и ДМЕ/F12 (мезенхимные клетки человека), мы показали, что данный процесс, по всей видимости, постоянный и характерен как для трансформированных клеток, так и для нормальных. Однако мы отметили, что рассматриваемый процесс является регулируемым, поскольку, воздействие индуктора апоптоза диэтилмалеата на клетки K562 в течение 1 ч ингибировало выход протеасом из клеток в культуральную среду, в то время как доксорубин не оказывал никакого влияния. Воздействие дайносорна на клетки НЕК293 также не привело к изменению количества внеклеточных протеасом, несмотря на ожидаемое подавление данного процесса за счет ингибирования динаминсвязанного эндоцитоза. Воздействие ионофора моненсина на клетки приводило к увеличению концентрации внеклеточных протеасом, несмотря на тот факт, что это вещество является ингибитором внутриклеточного транспорта белков. Однако, согласно литературным данным, моненсин вызывает повышенную секрецию экзосом клетками. Кроме того, в протеоме экзосом были обнаружены белки 20S протеасом, что позволяет предполагать экзосома-опосредованный транспорт протеасом из клетки во внеклеточное пространство.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01397), правительства Санкт-Петербурга и в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (№ 8787).

СОХРАНЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТУРЫ ЛИМФОЦИТОВ ДЛЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. © О. Г. Черодниченко, А. Л. Пилюгина. Научно-исследовательский институт общей генетики и цитологии МОН РК, Алма-Ата, Казахстан, cherogen70@mail.ru

Подавляющее большинство цитогенетических исследований выполняется на культурах соматических клеток, главным образом на культурах лимфоцитов периферической крови. Для анализа необходим образец венозной крови с последующей техникой приготовления препаратов — культивирование на питательных средах со стимуляцией митотической активности. Забор образцов крови, предназначенных для проведения цитогенетического анализа, проводится в гепаринизированные пробирки. При этом образцы крови следует как можно быстрее доставить в лабораторию для проведения цитогенетического исследования. Накопленный опыт по хранению ядерных клеток крови свидетельствует о том, что продлить жизнеспособность лимфоцитов в условиях положительных температур, т. е. при 4 °С, возможно до 24 ч (Заривчатский, 1995). Замораживать образцы нельзя. В связи с

проблемой ограниченного срока жизнеспособности лимфоцитов до постановки их на культивирование возникает много ограничений и технических трудностей. Это особенно проблематично при проведении мониторинговых цитогенетических работ, когда необходимо брать кровь у населения, проживающего в отдаленных регионах, путь из которых зачастую занимает более 24 ч, а также в связи с неблагоприятным временем прибытия транспорта. Еще большие трудности возникают при необходимости обработки этих образцов крови определенными веществами, различными типами излучений и т. д., что крайне ограничивает возможности исследователя. На основании вышеизложенного была поставлена задача — разработать эффективный, доступный и экономичный способ сохранения лимфоцитов для дальнейшего цитогенетического анализа. Предлагаемый способ заключается в том, что гепаринизированную периферическую кровь разводят культуральной средой без митогенной стимуляции фитогемагглютинином (ФГА) и помещают в термостат (можно переносной) при 36—37 °С, при этом лимфоциты находятся в G₀-стадии клеточного цикла. Далее в любой удобный промежуток времени в течение 48 ч клетки крови могут быть подвергнуты необходимому воздействию. После этого их помещают в полноценную культуральную среду с ФГА-стимуляцией для получения метафазных клеток и культивируют по общепринятой методике в течение 48—72 ч. Проанализировав цитогенетические препараты, полученные после различных сроков преинкубации (24—48 ч) и дальнейшего культивирования (48—72 ч) выявлено, что митотический индекс во всех вариантах был не менее 15 %, а уровень цитогенетических нарушений статистически не отличался от варианта, при котором культивирование ФГА-стимулированных лимфоцитов проводили без предварительной инкубации. При необходимости сохранения образцов крови с жизнеспособными лимфоцитами изначально либо в случае ее доставки в лабораторию в критические сроки (22—24 ч) и невозможности проведения немедленного ФГА-стимулированного культивирования или для их дополнительной обработки имеет смысл воспользоваться предложенным способом. Таким образом, нами предложен эффективный, доступный и экономичный способ сохранения лимфоцитов в функционально полноценном состоянии в течение 72 ч от забора венозной крови для дальнейшего цитогенетического анализа. Данный способ может быть рекомендован к использованию в научных учреждениях медицинского и биологического профиля.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ КИНАЗЫ m-TOR НА ЭКСПРЕССИЮ МАРКЕРОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ. © М. Ю. Черепкова,¹ Г. С. Синева, В. А. Поселов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ¹ maria.cherepkova@gmail.com

Киназа mTOR (mammalian target of rapamycin) играет важную роль в регуляции роста и размера клеток, трансляции, аутофагии и клеточного цикла. В клетке mTOR находится в составе двух комплексов — mTORC1 и mTORC2. Известно, что модуляция активности mTOR-содержащих комплексов влияет на дифференцировку эмбриональных стволовых клеток человека и эффективность репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные. Мы показали, что обработка эмбрио-

нальных стволовых клеток мыши (мЭСК) рапамицином (аллостерическим ингибитором mTORC1) и PP242 (каталитическим ингибитором mTOR в составе двух комплексов) приводит к снижению фосфорилирования мишени mTORC1 — рибосомального белка S6. Снижение фосфорилирования другой мишени mTORC1 — ингибитора инициации трансляции фактора 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1) — также наблюдалось при инактивации mTOR, однако эффект был более выражен при обработке PP242. Результаты ОТ-ПЦР показали, что длительная обработка недифференцированных мЭСК рапамицином и PP242 приводит к снижению экспрессии генов — маркеров плюрипотентности — *oct3/4*, *nanog*, *klf4* и *rex1*. При этом обработка PP242 приводит к более эффективному подавлению экспрессии маркеров плюрипотентного состояния мЭСК, чем обработка рапамицином. В то же время воздействие ингибиторов индуцирует экспрессию гена *sox1* — раннего маркера нейральной дифференцировки. При удалении из среды для культивирования фактора LIF (leukemia inhibitory factor), который необходим для поддержания мЭСК в недифференцированном состоянии, наблюдалось повышение фосфорилирования мишеней mTORC1 (рибосомного белка S6) и mTORC2 (киназы PKB/Akt, Ser473). Это свидетельствует о повышении активности mTOR при удалении LIF. Рапамицин и PP242 влияют на экспрессию маркеров различных ростков дифференцировки, наблюдаемую при культивировании мЭСК в суспензии с образованием эмбрионидных тел, а также в монослое в отсутствие LIF. В частности, обработка эмбрионидных тел рапамицином и PP242 усиливала экспрессию гена *fgf5* — маркера эпибласта. При дифференцировке в монослое обработка рапамицином приводила к увеличению экспрессии генов *brachyury(T)*, *fgf5* и *sox1*. Таким образом, для самообновления мЭСК необходима базальная активность комплексов mTOR, и ее подавление приводит к снижению плюрипотентных свойств клеток. При дифференцировке активность mTOR-сигнального пути повышается, поэтому обработка ингибиторами рапамицином и PP242 оказывает влияние на экспрессию маркеров дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-31898).

МИКОПЛАЗМЫ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КЛЕТКАМИ ЭУКАРИОТ, СЕКРЕЦИЯ ВЕЗИКУЛ, ДИАГНОСТИКА И ПОДАВЛЕНИЕ. © В. М. Чернов, А. А. Музыкантов, Е. С. Медведева, Т. Ю. Григорьева, Н. Б. Баранова, Г. Ф. Шаймарданова, М. В. Трушин, О. А. Чернова. Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, chernov@mail.knc.ru

Микоплазмы (класс Mollicutes) — мельчайшие лишённые клеточной стенки прокариоты, способные к самостоятельному воспроизведению. Значительный интерес к этим бактериям связан, с одной стороны, с уникальностью организации минимальной клетки, а с другой — диктуется практической необходимостью. Большинство микоплазм является паразитами высших организмов, некоторые — возбудителями заболеваний человека, животных и растений, контаминантами клеточных культур, используемых в том числе в биотехнологии для производства вирусных вакцин. Способность микоплазм влиять на

практически любой параметр клетки *in vitro* определяет необходимость тщательного анализа клеточных культур на контаминацию этими микроорганизмами. Решение проблемы контроля микоплазменных инфекций и контаминаций связывают с исследованиями молекулярной и клеточной биологии микоплазм, выяснением молекулярных механизмов адаптации их к разным условиям среды, взаимодействия с клетками высших организмов и реализации вирулентности (Rivera et al., 2009; Windsor et al., 2010). Определение полных нуклеотидных последовательностей геномов ряда представителей класса Mollicutes определило возможность использования постгеномных технологий для идентификации белков и генов, участвующих в адаптации соответствующих бактерий к условиям среды. В результате проведения транскриптомно-протеомного анализа были идентифицированы стресс-реактивные белки и гены некоторых микоплазм, а также эукариот, участвующие в ответных реакциях высших организмов на инфицирование микоплазмами. Наибольшее количество информации было получено в отношении *Acholeplasma laidlawii* — широко распространенной в природе микоплазмы, являющейся возбудителем фитомикоплазмозов и контаминантом клеточных культур (Чернов и др., 2010, 2013; Демина и др., 2011; Chernov et al., 2011a, 2011b, 2012; Lazarev et al., 2011). При этом было обнаружено, что клетки микоплазмы в различных условиях роста продуцируют во внешнюю среду мембранные везикулы — сферические окруженные мембраной наноструктуры диаметром 20—120 нм (Chernov et al., 2011a, 2011b). Аналогичные данные были получены также в отношении *Mycoplasma gallisepticum* и *M. hominis* (Чернов и др., 2011; Chernov et al., 2011a). Экстраклеточные мембранные везикулы (ЭМВ) обнаружены у грамположительных и грамотрицательных бактерий, архей и эукариот (Deatherage, Cookson, 2012). Предполагается, что они опосредуют универсальный способ секреции у всех организмов. Эти внеклеточные органеллы вовлечены в сигналинг, межклеточные взаимодействия, патогенез и участвуют в адаптации организмов к условиям среды. ЭМВ микоплазм содержат помимо мембранных компонентов цитоплазматические белки (в том числе ассоциированные с факторами вирулентности), а также нуклеотидные последовательности некоторых генов; опосредуют эффлюкс антибактериальных препаратов и экспорт детерминант резистентности к антибиотикам, участвуют в формировании системы паразит—хозяин и проявляют мутагенность в отношении клеток *in vitro* (Chernov et al., 2011a, 2012; Чернов и др., 2013). ЭМВ патогенных бактерий представляют собой новый тип инфектов (Deatherage, Cookson, 2012). Это определяет необходимость коррекции существующих подходов для контроля микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 8048), Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-01406, 12-04-01052 и 12-04-31396) и гранта президента РФ для молодых кандидатов МК-3823.2013.4.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ: СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ, РАЗНООБРАЗИЕ БЕЛКОВ И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ ЭКСПРЕССИИ. © И. С. Черноиваненко,¹ А. А. Ми-

нин.² ¹Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН и ²Институт белка РАН, Москва, ichernoivanenko@gmail.com

Промежуточные филаменты (ПФ) — один из трех основных компонентов цитоскелета в эукариотических клетках. Их функции изучены значительно слабее, чем функции актиновых микрофиламентов и микротрубочек. Достаточно долгое время было принято считать, что ПФ нужны в основном для поддержания формы клетки и обеспечения механической прочности. Однако в течение последних двух десятков лет было открыто огромное множество новых функций и процессов, в которых ПФ играют важную роль. Они участвуют в формировании клеточных контактов и передаче механических сигналов от внеклеточного матрикса, регулируют распределение и транспорт органелл в клетке, могут выступать в качестве сигнальных платформ и каркасов для различных сигнальных молекул и сами участвовать в регуляции различных клеточных процессов, включая пролиферацию и миграцию клеток. Разнообразие функций, выполняемых ПФ, обеспечивается их уникальной структурой и свойствами. ПФ — это полимеры, которые обладают способностью к самосборке без участия дополнительных белков и в отличие от микротрубочек и актиновых микрофиламентов без дополнительной энергии в виде молекул АТФ или ГТФ. Эта способность также позволяет им быть очень динамичными структурами — обмен субъединиц может происходить в любом месте филамента. Белки, из которых построены ПФ, чрезвычайно разнообразны. Гомология аминокислотных последовательностей белков ПФ иногда составляет не более 20 %. Всего в геноме человека обнаружено около 70 генов, кодирующих различные белки ПФ, которые образуют одно из самых многочисленных белковых семейств. Белковый состав ПФ может меняться в зависимости от типа клетки, стадии дифференцировки и стадии эмбрионального развития. Он может меняться даже в дифференцированных клетках взрослого организма в определенных условиях. Правильная экспрессия такого количества разных белков в различных условиях подразумевает наличие сложной регуляции, исследование которой является отдельной очень интересной областью изучения свойств ПФ. Необходимость более глубокого изучения принципов и механизмов функционирования ПФ в различных типах клеток диктуется прежде всего тем, что нарушения, связанные с этими структурами цитоскелета, являются причиной многих патологических состояний. К настоящему времени установлены мутации генов белков ПФ, лежащих в основе тяжелых наследственных заболеваний, таких как наследственный буллезный эпидермолиз, связанный с мутациями кератин-5 и 14; миопатия и кардиомиопатия, вызванные нарушениями в структуре десмина; такие тяжелые неврологические заболевания, как амиотрофический латеральный склероз и болезнь Александра, связанные с мутациями периферина и GFAP соответственно; болезнь Паркинсона и некоторые другие тяжелые нервные патологии, причиной которых являются нарушения нейрофиламентов. Кроме того, нарушение регуляции экспрессии определенных типов ПФ, например при хроническом воспалении, может приводить к развитию таких состояний, как фиброзы различных органов и тканей. Другой областью, в которой достигнут большой прогресс в изучении свойств и функций ПФ, является исследование раковых опухолей. Известно, что при злокачественной трансформации кле-

ток в них часто меняется экспрессия генов ПФ. Например, экспрессия виментина, типичного для клеток соединительной ткани, в эпителиальных клетках является одним из показателей агрессивности раковой опухоли. Показана достоверная корреляция между экспрессией виментина и вероятностью метастазирования опухоли. В этом докладе мы рассмотрим структуру и свойства ПФ, обращая особое внимание на то, как с ней связаны различные функции ПФ. Мы рассмотрим разнообразие и классификацию белков ПФ, а также их экспрессию в различных типах клеток на различных стадиях дифференцировки и при различных патологических состояниях. Отдельное внимание будет уделено виментину как белку, наиболее активно изучаемому в последнее время в связи с исследованиями клеточной подвижности и развития раковых опухолей.

ИНГИБИРОВАНИЕ ARP2/3-ЗАВИСИМОЙ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ АКТИНА ВЫЗЫВАЕТ МЕЗЕНХИМНО-АМЕБОИДНЫЙ ПЕРЕХОД У ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК. © А. С. Чикина, А. Ю. Александрова. Научно-исследовательский институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, aleksandrachikina@yandex.ru

Движение клеток осуществляется главным образом за счет полимеризации и реорганизации сети актиновых филаментов. Характер движения может существенно различаться в зависимости от типа клеток, внеклеточного окружения и многих других факторов. Описаны два основных способа движения индивидуальных клеток — мезенхимное и амебоидное, которые регулируются различными механизмами. Мезенхимное движение осуществляется благодаря формированию плоских ламеллиподий и раффлов на ведущем крае клетки по Arp2/3-зависимому механизму. Для амебоидного типа движения характерно образование другого типа динамических выростов — бляшек, регуляция осуществляется с помощью форминов. При развитии онкологического заболевания опухолевые клетки приобретают способность к изменению типа движения в зависимости от условий среды, в которых находится клетка, что является высокоадаптивным. Одним из таких примеров является мезенхимно-амебоидный переход (МАП): смена мезенхимного типа движения на амебоидное, что ведет к усилению метастазирования и ухудшению клинического прогноза. Цель данной работы — изучение роли различных механизмов полимеризации актина в движении нормальных и опухолевых клеток, попытка моделирования МАП в лабораторных условиях. Были использованы клетки: 1036-нетрансформированные подкожные фибробласты человека и HT1080-фибросаркома человека. С помощью флуоресцентной и фазово-контрастной микроскопии анализировали изменения морфологии клеток под действием ингибиторов (СК666 — ингибитор Arp2/3 и SMIFN2 — ингибитор форминов). Подвижность клеток анализировали с помощью экспериментальной модели «широкая рана». При действии СК666 опухолевые клетки претерпевали морфологические изменения, соответствующие МАП: без ингибитора наблюдалось образование ламеллиподий и раффлов, при увеличении концентрации ингибитора — бляшки. При этом подвижность клеток несколько снижалась, что мы связываем с особенностями эксперимента: движение клеток осуществлялось на дву-

мерном субстрате (стекло). Нормальные клетки не подвергались МАП: при увеличении концентрации ингибитора клетки утрачивали ламеллиподию, подвижность снижалась, но бляшек не было. Таким образом, ингибирование Arp 2/3-зависимой полимеризации актина приводило к МАП в случае опухолевых клеток, что можно рассматривать как компенсаторную реакцию на невозможность осуществления мезенхимного типа движения. При действии SMIFN2 опухолевые клетки приобретали морфологию малоподвижных клеток: утрачивались раффлы, клетки становились деполаризованными и расплывчатыми. Подвижность клеток снижалась. В это время нормальные клетки в присутствии SMIFN2 существенных изменений морфологии не продемонстрировали и их миграция не была подавлена. Следовательно, для движения нетрансформированных фибробластов Arp2/3-зависимый механизм полимеризации актина более важен, чем форминовзависимый. Для клеток фибросаркомы важны оба механизма. Таким образом, опухолевые клетки показали пластичность, т. е. способность в условиях ингибирования Arp 2/3 формировать морфологию, типичную для амебоидного движения, и таким образом использовать различные типы миграции. Нормальные фибробласты такой способности не продемонстрировали.

ЛИЗАТ ТРОМБОЦИТОВ ДОНОРОВ КАК АЛЬТЕРНАТИВА ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТЕЛЯЧЬЕЙ СЫВОРОТКЕ ДЛЯ БЕЗОПАСНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. © Я. Д. Шанский, Н. С. Сергеева, И. К. Свиридова, В. А. Кирсанова, С. А. Ахмедова. Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена Министерства здравоохранения РФ, prognoz.06@mail.ru

Развитие клеточных технологий и тканевой инженерии требует разработки безопасных методик культивирования клеток, предназначенных для введения в организм пациента. Использование с этой целью традиционной ксеногенной добавки к культуральным средам — эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) — запрещено. Это связано как с риском переноса с сывороткой инфекционных агентов, так и с возможностью развития нежелательных иммунологических реакций. В аспекте поиска нексеногенных ростовых добавок к культуральным средам внимание исследователей привлекли тромбоциты человека как возможный источник факторов роста для культивирования клеток, в частности лизат тромбоцитов (ЛТ) человека, который можно получать из коммерчески доступной тромбоцитарной массы. Ранее нами были исследованы различия между ЭТС и ЛТ по биохимическому составу и по содержанию в них ростовых факторов — PDGF (AA-, BB- и AB-изоформы), TGF β , VEGF и IGF-1. В частности, было показано, что содержание указанных ростовых факторов в ЛТ в 1.7—148.7 раза больше, чем в ЭТС (PDGF BB в ЭТС обнаружен не был).

Цель настоящей работы — изучение влияния ЭТС и ЛТ на рост нормальных и опухолевых клеток человека *in vitro* и оценка возможного влияния обеих ростовых добавок на дифференцировочные потенции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК).

Исследованы *in vitro* параметры роста культур иммортализованных фибробластов человека (ФЧ), ММСК человека, карциномы молочной железы человека MCF-7, рака гортани Her-2 и карциномы легкого A-549 в при-

сутствии ЭТС и ЛТ. Клетки культивировали в 96-луночных планшетах и в полной ростовой среде (ПРС; среда DMEM/F12, глутамин, 292 мкг/мл; гентамицин, 1.25 мкг/мл), добавляя в качестве источников факторов роста ЭТС (HyClone) или пулованный ЛТ (оригинальная методика) в объеме 10 % от общего объема ПРС. Способность ММСК к дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях оценивали путем культивирования их в ПРС со стандартным коктейлем индукторов дифференцировки с последующей окраской Oil-Red (выявление жиров) и проведением хромогенного теста на щелочную фосфатазу. Результаты оценивали микроскопически.

Численность популяции ФЧ и ММСК, культивируемых с ЛТ, на 14-е сут наблюдения превышала таковую при использовании ЭТС в 1.41 и 1.21 раза соответственно. Для культур опухолевых клеток получены принципиально иные данные: при культивировании в ПРС с ЭТС популяция опухолевых клеток была выше для MCF-7 в 17.6 раза, для A-549 — в 1.39 для Hep-2 — в 1.35 раза, чем при культивировании с ЛТ. Культивирование ММСК в присутствии коктейля адипогенных/остеогенных индукторов стимулировало дифференцировку клеток в соответствующем направлении, что подтверждалось специфическим окрашиванием внутриклеточных липидов и положительной реакцией на щелочную фосфатазу соответственно.

Результаты работы свидетельствуют о том, что ЛТ не стимулирует роста опухолевых клеток и сохраняет пролиферативные и дифференцировочные потенции ММСК, т. е. может стать полноценной нексеногенной добавкой к ростовой среде для культивирования клеток.

ПРОЛИФЕРИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS* L. В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ.
© Н. С. Шарлаимова, О. А. Петухова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, nashar@yandex.ru

Характеристика клеток, отвечающих за восстановление утраченных частей тела и органов у взрослых организмов, является одним из главных вопросов регенеративной биологии. В работе исследованы пролиферирующие клетки целомической жидкости (ЦЖ), целомического эпителия (ЦЭ) и субпопуляции клеток, слабо связанных с ЦЭ (ЦЭ-с) морской звезды *Asterias rubens* L. в условиях первичной культуры. Ранее описаны 2 типа клеток *A. rubens*, пролиферирующих *in vivo* и сохраняющие способность к пролиферации при длительном культивировании. Основной характеристикой клеток, способных к пролиферации являются малые размеры (4—6 мкм, малые эпителиоциты 1-го типа или 2—3 мкм, малые эпителиоциты 2-го типа) и высокое ядерно-цитоплазматическое отношение. Было выявлено обогащение популяции клеток ЦЭ и ЦЭ-с малыми эпителиоцитами после прикрепления к ламинину (Шарлаимова, Петухова, 2011). Анализ ДНК-синтетической и митотической активности клеток ЦЭ и ЦЭ-с в течение длительного (до 2 мес) культивирования на ламинине показал, что пролиферативную активность сохраняют малые эпителиоциты 1-го типа, причем в ходе культивирования они были выявлены в составе колониоподобных агрегатов. Поскольку суммарно к ламинину прикрепляется лишь незначительная часть популяций исследуемых суспензий клеток, целью настоящей работы является характеристика пролиферирующих клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-с, не обладающих из-

бирательной способностью прикрепления к ламинину. Суспензии клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-с наносили в 24-луночные платы на покровные стекла, покрытые ламинином, на 1 ч. Затем снимали неприкрепившиеся клетки и переносили на необработанную поверхность лунок в питательной среде с добавлением 2 % фетальной сыворотки. Анализ митотической активности проводили на разных сроках культивирования после фиксации сбитых пипетированием клеток и окраски суспензий антителами к H3-фосфогистону, маркеру митотических клеток. Среди клеток ЦЖ через 24 ч после посева не выявлено пролиферирующих клеток. Однако через 4 сут культивирования митотическая активность обнаружена в малых клетках с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением диаметром 4 мкм. Клетки этого типа не формировали колониоподобных агрегатов и сохраняли пролиферативную активность в течение по крайней мере 28 сут. Среди клеток ЦЭ и ЦЭ-с через 12 ч культивирования были выявлены прикрепленные распластанные клетки, удлиненные клетки, крупные округлые гранулоциты и подвижные агрегаты ресничных клеток. Окраска суспензий клеток антителами к тубулину выявила как жгутиковые эпителиоциты, так и ранее не обнаруженный при культивировании на ламинине тип клеток диаметром до 7.5 мкм, с выраженными тяжами тубулина и диаметром ядра 2.5—4 мкм. Через 12 ч после посева митотической активности не выявлено. Через 2—7 сут агрегаты ресничных клеток оседали на поверхность лунок, причем на протяжении всего периода поддержания культуры в составе агрегатов окраски антителами к H3-фосфогистону не обнаружено. Митотическая активность в первичных культурах была выявлена через 5 сут после посева в 3 типах клеток — в малых эпителиоцитах, выявленных ранее *in vivo* и при культивировании на ламинине, и в клетках большего размера с выраженными тяжами тубулина. Таким образом, выявлен новый тип пролиферирующих клеток *A. rubens*, не обладающих средством к ламинину, которые сохраняют способность к делению в первичной культуре.

Работа выполнена при финансовой поддержке правительства Санкт-Петербурга в сфере научной и научно-технической деятельности и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-10090-К).

ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОСКЕЛЕТА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО МОНОСЛОЯ *IN VITRO*. © А. С. Шахов,¹ А. Д. Верин,² И. Б. Алиева.^{1,2} ¹Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, irina.alieva@belozersky.msu.ru и ²Центр сосудистой биологии, Университет наук о здоровье Джорджии, США.

Монослой эндотелиальных клеток (ЕС), располагающийся на внутренней стенке кровеносного сосуда, является полупроницаемым барьером на пути проникновения в ткани молекул и клеток иммунной системы. Компоненты цитоскелета и его адгезивные структуры играют ключевую роль в поддержании целостности монослоя ЕС и соответственно барьерной функции. Для исследования барьерной функции эндотелия используют выделенные из сосудов ЕС, которые культивируют *in vitro*. ЕС *in vitro* способны к распластыванию и делению, формируют VE-кадгериновые контакты, а по достижении конfluence-

тности эндотелиальный монослой приобретает барьерные свойства, характерные для эндотелия в организме. Для того чтобы исследовать реорганизацию цитоскелета ЕС в процессе формирования эндотелиального монослоя, в работе использовали две линии ЕС человека — клетки легочной артерии (НРАЕС) и гибрид HUVES с клетками карциномы легкого A-549 (EA.hy926). Фибриллярные компоненты выявляли с помощью специфических антител к соответствующим белкам цитоскелета, центросому окрашивали антителами против γ -тубулина. Доминирующей составляющей системы промежуточных филаментов ЕС обеих линий являются виментиновые филаменты. Виментин гомогенно распределен по всей цитоплазме ЕС, исключая ламеллу. Площадь, занимаемая виментиновыми филаментами, незначительно увеличивается по мере формирования монослоя за счет исчезновения областей свободной ламеллы. В ЕС обеих линий актин формирует структуры двух типов — кортикальный актин и пучки стресс-фибрилл. Кортикальный актин характерен для одиночных ЕС и ЕС с небольшой (до 30 %) протяженностью межклеточных контактов, он расположен в зоне свободного края клетки. Стресс-фибриллы обнаруживаются в ЕС на всех стадиях формирования конфлюэнтного монослоя, их количество не зависит от протяженности контакта ЕС с соседями. Наибольшие изменения при формировании эндотелиального монослоя претерпевает система микротрубочек (МТ). В распластанной на подложке одиночной ЕС система МТ радиальная, но по мере формирования контактов с соседними ЕС она становится асимметричной: среднее количество МТ в районе контакта с соседней ЕС всегда больше, чем в области свободной ламеллы, и эта разница зависит от протяженности контакта. При протяженности контакта до 10 % от периметра в клетках НРАЕС среднее количество МТ в районе контакта (9.70 ± 0.16) в 1.5 раза выше, чем в районе свободной ламеллы (6.96 ± 0.15). По мере формирования монослоя среднее количество МТ на краю ЕС увеличивается, но разница в количестве МТ двух выделенных групп сохраняется — для ЕС с площадью контакта 70—90 %, среднее количество МТ в районе контакта составляет 12.93 ± 0.29 , а в области свободной ламеллы — 8.20 ± 0.22 . Симметричное расположение концов МТ достигается только в полностью сформированном монослое ЕС со зрелыми контактами. Асимметрия системы МТ в ходе формирования монослоя ЕС вызвана также изменением положения центросомы. В ЕС с протяженностью контактов 50—75 % центросома смещается в сторону образования нового контакта, а выше 75 % — равновероятно в сторону свободной ламеллы или контактирующих с соседними краев ЕС. Таким образом, центросома вовлечена в процесс формирования монослоя ЕС, ее положение определяет степень симметрии радиальных МТ и может влиять на количество динамичных концов МТ в зоне формирующихся межклеточных контактов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00488) и НИН (HL101902).

СПОНТАННАЯ МИОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ИЗ СЕЛЕЗЕНКИ ЗАРОДЫШЕЙ КРЫСЫ. © О. Н. Шевелева, О. В. Паюшина, Н. Н. Буторина. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, on_sheveleva@mail.ru

Изучение происхождения и развития скелетных мышц в эмбриогенезе и поиск различных источников клеток, способных к дифференцировке в миогенном направлении *in vivo* и *in vitro*, представляют собой актуальные направления биологии развития, клеточной и молекулярной биологии. Особый интерес представляют работы, посвященные локализации миогенных клеток в различных немышечных органах развивающегося и зрелого организмов. Такие клетки обнаружены в составе тимуса и поджелудочной железы половозрелых мышей (Grounds et al., 1992; Di Rocco et al., 2008) и во многих органах куриных эмбрионов (Gerhart et al., 2001). В нашей лаборатории ранее было обнаружено, что клетки, экспрессирующие мышечный маркер *myod*, присутствуют в нативной печени зародышей крысы. В культурах клеток из этого источника наблюдается интенсивная спонтанная миогенная дифференцировка (Шевелева и др., 2011). Целью настоящей работы было исследование миогенных потенциалов клеток, полученных из другого кроветворного органа зародышей — селезенки. Было показано, что в первичных культурах клеток из селезенки 17-суточных зародышей крысы породы Wistar, так же как и в культурах клеток из печени, спонтанно формируются миосимпласты скелетной мышечной ткани. Миотубы в первичных культурах клеток из селезенки начинали формироваться на 5—10-е сут культивирования. В отличие от первичных культур клеток из зародышевой печени, в которых миотубы на фибронектиновом покрытии формируются практически в 100 % случаев, в первичных культурах клеток из селезенки миотубы формировались примерно в 50 % опытов. Обработка меченым α -бунгаротоксином показала, что на некоторых миотубах в культурах клеток из селезенки, так же как и в контрольных культурах клеток из мышц, присутствуют участки клеточной поверхности, содержащие никотиновые холинорецепторы, что говорит о нормальных физиологических свойствах миотуб в культурах клеток из селезенки. Скелетно-мышечная природа этих миотуб была подтверждена с помощью иммуноцитохимического окрашивания на *myod*, десмин и миозин 2-го типа на 11-е сут культивирования. Экспрессия генов основных маркеров скелетных мышц была исследована с помощью ПЦР-анализа. В некультивированных суспензиях клеток из селезенки обнаружена экспрессия только *myf5* и очень слабая экспрессия *myod*, что, вероятно, связано с малым количеством миогенных предшественников в этих суспензиях. В первичной культуре клеток из селезенки наблюдается экспрессия *myod*, *myf5*, *myf6* и *м-кадгерина*. В целом уровень экспрессии этих генов ниже, чем в первичной культуре клеток из мышц и печени 17-суточных зародышей. Экспрессии маркеров ранних миогенных предшественников — *pax7* и *pax3* — в клетках из зародышевой селезенки не обнаружено. Исследование миогенных потенциалов клеток нативной зародышевой селезенки и других, некроветворных, органов зародышей является предметом будущих исследований.

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

АТТЕСТАЦИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ШТАММА ДИПЛОИДНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА — СУБСТРАТА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ.

© Г. С. Шитикова,¹ М. В. Филатов,² Н. П. Глинских,³ П. В. Устьянцев.³ ¹ФГУПСПБНИИВС ФМБА России, Санкт-Петербург, ²ФГБУПИЯФ им. Б. П. Константинова, Гатчина, и ³ФГУН ЕНИИВИ, Екатеринбург.

Задача настоящей работы — проведение аттестации отечественного штамма диплоидных клеток, полученных из легких эмбриона человека (ЛЭЧ-3), и демонстрация возможности их использования для производства противовирусных вакцин. Проведено изучение кариологических и морфологических характеристик, пролиферативной активности и жизнеспособности культуры клеток ЛЭЧ-3 после хранения в жидком азоте при -196°C и последующего культивирования в среде MEM и гидролизате лактальбумина (1 : 1) с добавлением 10 % сыворотки КРС или эмбриональной бычьей сыворотки. Показано, что клетки культуры ЛЭЧ-3, авторского штамма, полученного из лаборатории ЕНИИВИ в 2010 г. на 9-м пассаже, и заложенные в криобанке СПБНИИВС, сохраняли стабильную кариологию и морфологию при последующем длительном их культивировании. Индекс пролиферативной активности (ИП), равный 1 : 2—1 : 3, не снижался по сравнению с контролем. Кариотитрование культуры клеток ЛЭЧ-3 было проведено на 9-м 19-м пассажах по стандартной методике. Метафазные пластинки были подкрашены ДНК-тропным красителем DAPI. Изображения метафазных пластинок были получены на конфокальном микроскопе фирмы LEICA с помощью мультифотонного лазера. Проанализировано более 200 метафаз на предмет кариотипирования. Контроль метафазных пластинок проводили на микроскопе в проходящем свете при фазовом контрасте. Вызывающие сомнения области метафазных пластинок (близкое расположение или наложение хромосом друг на друга) сканировали во флуоресцентном режиме при большом увеличении, чтобы исключить возможность неверного подсчета хромосом. Установлено, что во всех метафазах кариотип стабилен, количество хромосом равно 46. Модальный класс содержит 87 % клеток с нормальным диплоидным набором хромосом, разброс составляет 44—49 хромосом. Структурных нарушений не выявлено. Клетки ЛЭЧ-3 криоконсервировали в среде роста 95 и 5 % ДМСО, по $1.5\text{—}2.0 \cdot 10^6$ кл./мл в ампуле. После криоконсервации восстанавливается 60—65 % клеток, монослой образуется на 4—5-е сут с момента посадки. Морфология клеток после восстановления и пассирования соответствует морфологии диплоидных фибробластов человека. Клетки прозрачны, расположены параллельными группами, ориентированными в различных направлениях. Цитоплазма с характерной мелкой зернистостью. Ядро содержит 1—4 ядрышка. Хроматин распределен в ядре в виде мелкой зернистости. Фаза активного роста клеточной линии ЛЭЧ-3 — с 5-го по 28-й пассаж. Контроль видовой идентичности, проведенный в изоферментном анализе, подтвердил, что подвижность изоферментов Г-6-ФДГ и ЛДГ соответствует типу подвижности ферментов человека и принадлежит кариотипу человека. При проведении контроля контаминации клеток ЛЭЧ-3 бактериями, грибов, микоплазм и вирусов не выявлено. При изучении чувствительности линии ЛЭЧ-3 к возможности размножения в ней различных вирусов установлено, что культура клеток ЛЭЧ-3 высокочувствительна к репродукции вирусов парагриппа, аденовирусам человека, вирусу полиомиелита 1-го типа, коксаки В, ЕСНО, РС-вирусам и вирусу краснухи. Нами подтверждено, что максимальной чувствительностью к размноже-

нию вируса краснухи обладают диплоидные линии клеток легких эмбриона человека, в том числе культура клеток ЛЭЧ-3, которую по этому критерию можно рассматривать как перспективный тканевый субстрат для производства вакцины против краснухи. Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что по своим цитогенетическим и культуральным свойствам штамм диплоидных клеток ЛЭЧ-3 может рассматриваться как линия клеток, пригодная для производства культуральной противовирусной вакцины.

ВЛИЯНИЕ ТОПОГРАФИИ КОЛЕННОГО СУСТАВА БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ НА ПОВЕДЕНИЕ ХОНДРОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ. © Е. И. Щелкунова, Т. В. Русова, А. А. Воропаева. Новосибирский научно-исследовательский институт ортопедии и травматологии им. Я. Л. Цивьяна.

Коленный сустав больных остеоартрозом (ОА) подвергается значительному деформированию в процессе развития болезни: возникают варусные деформации, из-за которых биомеханическая нагрузка в суставе распределяется неравномерно. В разных областях сустава структура гиалинового хряща существенно различается: она максимально сохраняется в зонах, удаленных от варусной деформации, а в зоне деформации ткань хряща полностью теряется. Мы исследовали функциональный потенциал хондроцитов из разных топографических зон хряща, испытывающих разные биомеханические влияния, в клеточной культуре. Образцы хряща отбирали из разных топографических зон коленного сустава больных идиопатическим ОА III степени с варусной деформацией (7 человек, возраст 65—75 лет) во время операции эндопротезирования коленного сустава: 1 — задний край внутреннего мыщелка бедра (максимально удален от места деформации); 2 — латеральный мыщелок большой берцовой кости (приближен к зоне деформации); 3 — медиальный мыщелок большой берцовой кости (максимально близкий участок к зоне деформации); 4 — поверхность остеофитов. Эти зоны при жизни испытывают разную биомеханическую нагрузку, и соответственно повреждение ткани хряща и активность процессов дегенерации в них разные. Клетки выделяли из ткани после обработки трипсином (0.5 %) и коллагеназой II типа (2 %). Их культивировали в среде DMEM F12 (Invitrogen) с добавлением 15 % FBS (Gibco) и антибиотиками стрептомицин—пенициллин (250×) в условиях CO_2 -инкубатора при 37°C в течение 21 дней. Клетки снимали с помощью раствора трипсина—версена (1 : 1) и подсчитывали. Клетки из разных зон коленного сустава обладают разной степенью адгезии к подложке, способностью к пролиферации и образованию колоний. Наиболее активны клетки из зоны 1 и остеофитов. В остеофитах клетки имеют фенотип фибробластов. Клетки из зоны 3 не образуют колоний и не обнаруживают пролиферативной активности. В клетках и культуральной среде исследовали содержание и состав углеводной части молекул протеогликанов (ПГ) — гликозаминогликанов (ГАГ) — одного из важных компонентов внеклеточного матрикса суставного хряща. Для этого определяли содержание белка и химических компонентов ГАГ — сульфатированных ГАГ (Сгаг), урсных кислот (УК) и нейтральных сахаров — галактозы — в среде культивирования и клетках. Результаты представлены в расчете на количество белка в 1000 сня-

тых клеток. Клетки всех зон (кроме клеток из 3-й зоны) активно продуцируют в среду инкубации ПГ — Сгаг и УК, содержание нейтральных гексоз в клетках и среде практически одинаково. Клетки из 1-й зоны хряща наиболее активно продуцируют в среду инкубации белок и химические компоненты ГАГ. Наименее активно — клетки из зоны 3. Относительное соотношение белка и ГАГ между средой и клетками очень близко во всех зонах, т. е. продуктивность клеток в отношении ПГ/ГАГ сохраняется

в клетках всех зон. Но соотношения разных химических компонентов ГАГ, характерных для разных их видов, различно. Так, в среде клеток остеоцитов и хряща 3-й зоны преобладают хондроитинсульфаты (ХС)-АС, тогда как в других зонах явно выражено присутствие ХС-В — более высокосульфатированного ГАГ. Таким образом, клетки всех зон хряща сохраняют синтетический потенциал, но демонстрируют дифференциальный синтез различных видов ГАГ.