

## **ПОДСЕКЦИЯ «ЦИТОЛОГИЯ»**

### **Влияние низких концентраций формальдегида на состояние культивируемых клеток**

*Айзенштадт А. (Санкт-Петербург, aizenDt@gmail.com)*

Формальдегид широко используется в биохимических, медицинских и фармакологических исследованиях, являясь одним из самых распространенных и известных фиксаторов клеток и тканей. В последнее время помимо применения его в качестве фиксатора было продемонстрировано, что низкие концентрации (до 250 мкМ), не убивая клетку, могут вызывать обратимое образование поперечных сшивок между близкорасположенными белками или белками и ДНК. Такой подход был применен для выделения лабильных сигнальных комплексов и изучения комплексов нуклеосом с ДНК и комплексов ДНК с транскрипционными факторами. С другой стороны, формальдегид в настоящее время рассматривается как вещество с широким спектром цитотоксического действия. В связи с этим необходимо выяснить, насколько данное воздействие изменяет физиологическое состояние клетки и как оно влияет на интерпретацию полученных данных. Целью данной работы было изучить характер влияния низких концентраций формальдегида на состояние культивируемых клеток и выяснить возможные механизмы этого влияния. Были получены следующие результаты. При воздействии формальдегида в концентрации до 60 мкМ на клетки линии A431 наблюдается быстрое обратимое (в течение менее чем 30 минут) изменение пространственной организации актинового цитоскелета. Обработка культивируемых клеток линии A431 формальдегидом в концентрации до 60 мкМ не только не снижало жизнеспособность, но и приводило к значительному увеличению их пролиферативной активности. Данный эффект наблюдался наиболее ярко в первые 24 часа (увеличение количества клеток на 62%) и при использовании 30 мкМ формальдегида. При обработке клеток концентрациями, превышающими 60 мкМ, наблюдалось снижение жизнеспособности и пролиферативной активности. Таким образом, следует говорить о дозозависимом эффекте. На основе свойств клеток линии A431 было высказано предположение, что полученное увеличение пролиферативной активности может быть опосредовано способностью формальдегида формировать сшивки между близкорасположенными молекулами, вызывая, таким образом, димеризацию рецептора к эпидермальному фактору роста (ЭФР). В подтверждение такому предположению методом конфокальной микроскопии было выявлено образование кластеров рецепторов на поверхности клеток, обработанных формальдегидом. Также наблюдалось увеличение содержания фосфорилированной формы рецептора к ЭФР на 42% в ответ на 10-минутную обработку формальдегидом в концентрации 30 мкМ, свидетельствующее об активации рецептора. Полученные результаты, таким образом, позволяют предположить, что формальдегид в концентрации до 60 мкМ является сигнальной молекулой и оказывает подобное ростовым факторам действие на клетку. Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Георгию Петровичу Пинаеву за помощь в подготовке тезисов.

### **Влияние окислительного стресса на локализацию и свойства ядрышковых белков фибрилларина и B23/нуклеофозмина**

*Барыкина Н.В. (Москва, oleeinar006@rambler.ru)*

Ядрышко – специализированный клеточный компартмент, служащий для образования рибосом; в состав ядрышек клеток человека HeLa входит около 700 белков. Отличительной особенностью ядрышка является его высокая чувствительность к внешним воздействиям, особенно тем, которые вызывают клеточную смерть. Под действием стрессовых факторов ядрышко изменяет общую структурную организацию и

функциональную активность, о чем свидетельствуют, в частности, изменения локализации ключевых ядрышковых белков. Окислительный стресс относится к одному из наиболее эффективных индукторов апоптоза, однако, реакция ядрышка на этот вид воздействия на сегодняшний день описана плохо. Цель настоящей работы – изучение реакции ключевых белков ядрышка, принимающих участие в ранних (фибрилларин) и поздних (B23/нуклеофозмин) стадиях сборки рибосом, на обработку клеток человека линии HeLa пероксидом водорода ( $H_2O_2$ ). Эффекты воздействия изучали в реакции непрямой иммунофлуоресценции и на иммуноблотах с помощью антител к фибрилларину и B23/нуклеофозмину, а также путем экспрессии плазмиды, кодирующей фибрилларин человека, слитый с EGFP (enhanced green fluorescence protein), методами конфокальной микроскопии и FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). В современной литературе реакция фибрилларина и B23/нуклеофозмина на окислительный стресс не описана. Полученные результаты позволили сделать следующие выводы: 1. Реакция белков зависит от концентрации и времени воздействия  $H_2O_2$  на клетки. Обработка 1мкМ раствором  $H_2O_2$  в течение 2 часов или 100мкМ раствором  $H_2O_2$  в течение 5-15 мин не приводила к изменениям в локализации или электрофоретической подвижности фибрилларина и B23 по сравнению с контролем. Воздействие 50-100 мкМ  $H_2O_2$  в течение 0,5-2 часов вызывало перераспределение белков: фибрилларин мигрировал из ядрышек в нуклеоплазму, тогда как, B23, напротив, преимущественно выявлялся в ядрышках. 2. Воздействие 100 мкМ перекиси водорода не вызывает массовой гибели клеток, о чем свидетельствуют данные микроскопического анализа, а также выявление маркерного белка поздних стадий апоптоза, PARP-1, на иммуноблотах. 3. Было доказано, что возвращение исходного состояния белков не происходит после отмытки клеток в среде DMEM полного состава в течение 24 часов. То есть, действие 100 мкМ раствора  $H_2O_2$  на клетки HeLa необратимо. 4. Изменения в локализации белков совпадают с дезорганизацией митохондрий, о чем свидетельствовала прижизненная окраска клеток красителем TMRE. 5. Миграция фибрилларина из ядрышек, а B23 в ядрышки сопровождалась замедлением электрофоретической подвижности белков, что может свидетельствовать в пользу изменения молекулярной массы белков в процессе окислительного стресса. 6. Реакция фибрилларина и B23/нуклеофозмина происходит одновременно с реорганизацией актинового и тубулинового цитоскелета. 7. В присутствии  $H_2O_2$  подвижность фибрилларина/EGFP замедляется, а доля мобильной, т.е. активной, фракции белка уменьшается.

**Активность аппарата раннего везикулярного транспорт необходима для формирования бесцентросомной радиальной сети микротрубочек**

*Бродский И.Б. (Москва, brodsky-i@yandex.ru)*

Микротрубочковый цитоскелет в эукариотических клетках позволяет осуществлять направленный транспорт различных грузов с помощью белков-моторов на расстояния, сравнимые с размерами самой клетки. В большинстве культур фибробластов мы можем наблюдать радиальную структуру сети микротрубочек, при которой минус-концы микротрубочек собраны в центре организации, где часто находится центросома, а плюс-концы расположены на периферии клетки. Механизмы образования радиальной системы микротрубочек остаются непонятными. Обычно основную роль здесь отводят центросоме, которая нуклеирует микротрубочки и закоривает их в центре организации, однако радиальная система микротрубочек может образовываться и без участия центросомы. В данной работе, чтобы исследовать роль мембранных органелл в организации клеточных микротрубочек были получены бесцентросомные цитопласты из клеток HeLa и BSC-1, которые и при отсутствии центросомы образуют радиальную систему микротрубочек. Изначально нами предполагалось, что формирование

бесцентросомной радиальной сети микротрубочек идет за счет компактной структуры аппарата Гольджи (АГ), собирающегося в центре цитопластов после отмывки нокодазола, агента, разрушающего микротрубочки и необходимого для получения цитопластов. Однако ингибирование процесса сборки компактного АГ воздействием брэфелдина А (BFA) не препятствовало возникновению радиальной системы микротрубочек, поэтому АГ не может считаться движущей силой данного процесса. Окадаевая же кислота (ОА), которая является ингибитором протеинфосфатаз и экспорта белка из эндоплазматического ретикулума (ЭР) в СОPII везикулы, эффективно блокировала формирование радиальной сети микротрубочек в цитопластах. Следовательно, данный сегмент аппарата транспорта может принимать участие в организации системы микротрубочек. Возможно, однако, что действие окадаевой кислоты на организацию системы микротрубочек основано на подавлении фосфатаз. Поскольку при комбинации ингибиторов СОPI (BFA) и СОPII (ОА) бесцентросомные цитопласты образуют радиальную сеть микротрубочек, можно предположить, что основная роль в формировании радиальной сети микротрубочек в бесцентросомных цитопластах принадлежит промежуточному компартменту (ERGIC). Это следует из того, что окадаевая кислота, блокируя формирование СОPII везикул, вызывает потерю АГ и ERGIC по СОPI механизму. Однако в присутствии BFA ERGIC сохраняется, что и может объяснять образование радиальной системы микротрубочек в этих условиях. Для более специфической проверки гипотезы участия аппарата раннего везикулярного транспорта в организации клеточных микротрубочек были получены бесцентросомные цитопласты из клеток, экспрессирующих доминантно-негативный мутант ГТФазы Sar1a – Sar1a[T39N], который ингибирует экспорт белков из ЭР с помощью СОPII-зависимого транспорта. Действительно, такие цитопласты не могли эффективно образовывать радиальную систему микротрубочек без участия центросомы, в отличие от цитопластов с ГТФазой Sar1 дикого типа. Данные эксперименты позволяют предположить, что в организации радиальной системы микротрубочек в бесцентросомных цитопластах ведущую роль играет аппарат раннего везикулярного транспорта, который, возможно, путем динеин-динактин-зависимого заякоривания микротрубочек и способствует их организации в радиальную сеть.

### **Распределение изоформ белка p150Glued**

*Брянцева С.А. (Москва, sofia.bryantseva@gmail.com)*

Внутриклеточный транспорт от периферии к центру клетки обеспечивается белковым комплексом динеином. У динеина существует кофактор, который увеличивает процессивность его движения вдоль микротрубочек, и который служит адаптером для связи динеина с грузами. Этим кофактором является мультисубъединичный комплекс динактин, одним из белков которого является белок p150Glued. Для данного белка показано наличие нескольких изоформ, отличающихся длиной микротрубочко-связывающего участка на N-конце. Изначально были известны изоформа-1 p150Glued и изоформа-2 p135 (лишенная первых 143 аминокислот и присутствующая только в нервных тканях). Однако оказалось, что изоформа-1 объединяет в себе длинную изоформу p150Glued-1A и короткую p150Glued-1B, содержащую делецию в 20 аминокислот (131-151a.o.) в области микротрубочко-связывающего участка. Мы показали, что длинная изоформа p150Glued-1A имеет большее сродство к микротрубочкам *in vitro*, чем p150Glued-1B. Экспрессия изоформ, слитых с GFP, в культивируемых клетках также показала различное сродство изоформ к микротрубочкам. Длинная изоформа распределяется вдоль всей длины микротрубочек, в то время как короткая изоформа располагается на плюс-концах микротрубочек в виде комет. Методом RT-PCR была показана тканеспецифичность экспрессии двух изоформ: длинная изоформа p150Glued-1A обильно присутствует в тканях нервного

происхождения, в то время как короткая изоформа p150Glued-1B представлена повсеместно. Вестерн-блот с лизатами тканей различных органов, окрашенный поликлональными антителами к варибельному участку p150Glued и моноклональными антителами, узнающими обе изоформы, подтвердил тканеспецифичность экспрессии двух изоформ. В эмбриональных тканях также присутствуют обе изоформы, длинная изоформа преобладает в мозге, но также присутствует и в других тканях. Экспрессия изоформы p150Glued-1A сохраняется в культуре первичных эмбриональных фибробластов. В различных линиях культивируемых клеток, таких как Vero и HeLa, преобладает короткая изоформа p150Glued-1B, однако в минорном количестве присутствует и длинная изоформа. Вестерн-блот с лизатами культивируемых клеток с различной плотностью монослоя показал, что уровень экспрессии p150Glued-1A увеличивается в разреженном монослое и в условиях экспериментальной раны монослоя. Иммуофлуоресцентное окрашивание клеток Vero поликлональными антителами к варибельному участку p150Glued выявило локализацию длинной изоформы на центросоме и по всей длине некоторых микротрубочек. Также было проведено окрашивание в условиях экспериментальной раны монослоя. Измерение удельной флуоресценции покраски на микротрубочки и на p150Glued-1A показало, что, в отличие от микротрубочек, которые распределяются по клетке равномерно, покраска на p150Glued-1A преобладала на ведущем крае клеток, обращенных в рану. Таким образом, в отличие от короткой изоформы, встречающейся повсеместно, изоформа p150Glued-1A экспрессируется в тканях нервного происхождения, присутствует в тканях эмбриона и в минорном количестве – в культивируемых клетках. В экспериментальной ране монослоя происходит увеличение экспрессии длинной изоформы, причем p150Glued-1A преобладает на ведущем крае клеток. Возможно, эта изоформа принимает участие в образовании клеточных выпячиваний при движении клеток или при росте отростков нейронов.

#### **Исследование локализации аппарата Гольджи относительно системы актиновых филаментов в клетках меристемы корня пшеницы *Triticum aestivum* L.**

*Ван Вэньчжу (Москва, wangwenzhu@yandex.ru)*

Цитоскелет клеток высших растений представляет собой совокупность микротрубочек и актиновых филаментов, которые обеспечивают разные внутриклеточные функции. Предполагается, что транспорт разных внутриклеточных органелл, в том числе и диктиосом аппарата Гольджи, в клетках растений связан с системой актиновых филаментов. Однако, роль разных элементов цитоскелета в упорядоченной локализации органелл на разных стадиях клеточного цикла и в ходе роста и дифференцировки клеток изучена недостаточно. Поэтому целью нашей работы было установить, есть ли связь между локализацией и распределением аппарата Гольджи и системой актиновых филаментов в клетках меристемы корня пшеницы *Triticum aestivum* L на разных стадиях клеточного цикла и разных стадиях дифференцировки. Для исследований были использованы клетки, выделенные в виде суспензии из фиксированных корешков пшеницы. Аппарат Гольджи выявляли с помощью антител к белку-маркеру 58K и актиновые филаменты с помощью TRITC-фаллоидина. Наблюдения проводили с использованием люминесцентного микроскопа Axiovert 200M. Проведенные исследования показали, что в интерфазных клетках актиновые филаменты формируют субкортикальные пучки. В таких клетках везикулы аппарата Гольджи располагаются по периферии цитоплазмы и симметрично в виде скоплений, расположенных на противоположных сторонах ядра, которые называются полярными зонами. Кроме этого, скопления аппарата Гольджи колокализуются с некоторыми субкортикальными пучками. В G2-периоде актиновые филаменты собираются в околядерных полярных зонах и в области препрофазного кольца. В

кортексе цитоплазмы везикулы аппарата Гольджи располагаются диффузно, а на уровне ядра конденсируются также в околоядерных полярных зонах. В профазе актиновые филаменты располагаются в полярных зонах профазного веретена, и там же располагаются везикулы аппарата Гольджи. В прометафазе актиновые филаменты располагаются над полярными зонами веретена и между хромосомами, а везикулы аппарата Гольджи формируют в полярных зонах многочисленные цепочки. В метафазных клетках актиновые филаменты располагаются над полярными зонами веретена, и там же располагаются везикулы аппарата Гольджи. В анафазе актиновые филаменты находятся в области полярных зон веретена и между хромосомами (в интерзоне). Везикулы аппарата Гольджи располагаются в интерзоне, полярных зонах и на периферии цитоплазмы. В телофазе актиновые филаменты локализуется в зоне фрагмопласта, а везикулы аппарата Гольджи занимают пространство между ядрами. Полученные результаты говорят о том, что аппарат Гольджи меняет свою локализацию в клеточном цикле. При этом колокализация актиновых филаментов и аппарата Гольджи наблюдается в связи с некоторыми участками субкортикальных пучков интерфазных клеток, на периферии актиновой сети, окружающей веретено в G-2 периоде и митозе, в скоплении актиновых филаментов в интерзоне во время анафазы, на периферии актиновых филаментов в составе фрагмопласта в ранней телофазе. Следовательно, локализация аппарата Гольджи совпадает с отдельными участками пучков или систем актиновых филаментов на определенных стадиях клеточного цикла.

**Ультраструктура кардиомиоцитов левого желудочка сердца крыс при попеременном действии гипергравитации и антиортостатического вывешивания**

*Вареник Е.Н. (Москва, evdiva@rambler.ru)*

Основные факторы, воздействующие на сердце при космическом полёте – это гипергравитация и невесомость. Известно, что при длительном воздействии невесомости наблюдается гипотрофия кардиомиоцитов левого желудочка, а при круглосуточном воздействии гипергравитационной перегрузки, напротив, наблюдается гипертрофия клеток этого отдела сердца. Ультраструктура при совместном влиянии этих факторов на сердце не описана, однако её изучение представляет несомненный практический интерес. В эксперименте были использованы самцы крыс линии Вистар. Для моделирования некоторых эффектов невесомости использовали антиортостатическое вывешивание, а для создания гипергравитации использовали центрифугу (2G). Крысы были вывешены круглосуточно в течение 24 суток, при этом их ежедневно, начиная с 5 суток, помещали на 1 час в условия 2G-гравитации, при этом вектор перегрузки действовал в направлении «спина-грудь». Постановка эксперимента осуществлялась на базе ГНЦ РФ – ИМБП под руководством ведущего научного сотрудника, к.м.н. И.Б. Краснова. Анализ ультраструктуры продольноориентированных на пирамитоме кардиомиоцитов левого желудочка, проводился методом трансмиссионной электронной микроскопии на микроскопе Jem-100С. В качестве контроля использовались кардиомиоциты интактных животных этой же линии. Проводился подсчёт количества межмитохондриальных контактов (ММК), как динамичный и универсальный показатель общего состояния митохондрия сердечномышечных клеток. Проверка достоверности отличий от контрольных значений проводилась в программе STATISTICA при помощи непараметрического U-теста Манна-Уитни. Электронномикроскопический анализ показал, что морфология основных органелл кардиомиоцитов сердца опытных крыс не сильно изменена относительно контрольной группы животных. Морфология ядер соответствует таковой в кардиомиоцитах интактных животных. Структура миофибрилл также соответствует контрольной (чётко выражены основные компоненты саркомеров). Следует отметить некоторое расширение саркоплазматического ретикулума. Наибольшее количество изменений обнаружено в энергопродуцирующем аппарате:

характерен полиморфизм митохондрий – наряду с органеллами ортодоксальной морфологии встречаются конденсированные и слабонабухшие. Также обнаружены отличия в количестве ММК, приходящихся на 100 митохондрий; их количество достоверно увеличено относительно контроля по всем зонам кардиомиоцитов и составляет 66 в межфибриллярной, 89 в субсарколеммальной околососудистой и 80 в околядерной, что достоверно выше контроля на 24, 19 и 32 ММК соответственно. Кроме того можно отметить визуальное увеличение объёмной плотности митохондрий в кардиомиоцитах опытных животных. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что кардиомиоциты левого желудочка сердца крыс при попеременном действии гипергравитации и антиортостатического вывешивания указанной продолжительности работают в условиях определенной функциональной перегрузки.

### **Сравнение экспрессии тканеспецифических и регуляторных генов в мозге и сетчатке человека в развитии и культуре клеток**

*Вердиев Б.И. (Москва, yuryevpolskei@yandex.ru)*

Клетки, следующие по нейральному пути развития, детерминируются в онтогенезе одними из первых еще на стадии ранней гастрюлы. В дальнейшем, из нейроэпителиальных клеток переднего мозгового пузыря образуются все отделы переднего и промежуточного мозга, среди которых ламинарные структуры неокортекса и сетчатка глаза имеют сходство по механизмам регуляции гетерохронного рождения нейробластов, их миграции по отросткам клеток радиальной глии и специфической дифференцировки. О процессах развития и регенерации в неокортексе и сетчатке накоплены значительные фундаментальные знания, которые практически не переносят с одной структуры на другую, поскольку традиционно принято исследовать эти отделы ЦНС независимо друг от друга. В связи с этим, целью работы было проведение сравнительного анализа характера экспрессии ряда тканеспецифических и регуляторных генов в ходе нормального развития и культуре клеток мозга и сетчатки плодов человека с помощью методов количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуногистохимического окрашивания. В сетчатке и неокортексе в ходе нейрогенеза (9-20 недель развития), уровни экспрессии транскрипционных факторов *Oct4* и *NANOG* сходны и имеют слабое повышение экспрессии к продвинутым срокам развития. В профиле экспрессии *PROX1* наблюдался рост в сетчатке и спад в мозге. По мере развития уровень экспрессии *Pax6* в сетчатке и неокортексе колеблется незначительно, хотя в сетчатке он постоянно более высокий по сравнению с мозгом. Иммуногистохимическая окраска в сетчатке и мозге на 9 неделе развития выявила нестинпозитивные волокна радиальной глии,  $\beta$ III-тубулинпозитивные ранние нейробласты, ГФКБ-позитивных клеток нет. На 20 неделе развития присутствуют клетки, окрашивающиеся на нестин,  $\beta$ III-тубулин, ГФКБ. ПЦР-анализ культур клеток из эмбриональной сетчатки и мозга показал во всех случаях экспрессию *Pax6*, характер которой сходен с нативными тканями. Экспрессия *Oct4* и *NANOG* в клеточных культурах не детектировалась. Во всех культурах сохранилась экспрессия маркеров дифференцировки, свойственных нативной ткани. Таким образом, сравнительный ПЦР-анализ развивающейся коры мозга и сетчатки эмбриона человека показал, что они сходны по профилю экспрессии регуляторных факторов *Oct4* и *NANOG*. В то время как, уровень экспрессии *Pax6* в сетчатке значительно выше, чем в мозге. Хотя в обеих структурах в исследованный период уровни экспрессии этого регуляторного фактора остаются практически постоянными. Уровень экспрессии *PROX1* в сетчатке растет, тогда, как в мозге падает, что, вероятно, отражает дифференцировку специфических типов нейронов. Анализ культуры сетчатки и мозга показал, что клетки в процессе культивирования теряют экспрессию регуляторных факторов *PROX1*, *NANOG*, *Oct4* и сохраняют экспрессию *Pax6* и маркеров клеточной дифференцировки, что

свидетельствуют о том, что они адекватно переносят условия культивирования и сохраняют потенции к специфической нейтральной дифференцировке. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 08-04-00081а) и Федерального агентства по науке и инновациям по контракту № 02.512.12.2008 от 25.06.08.

### **Структурно-функциональная перестройка кожи шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis* Daudin) в период метаморфоза**

*Виноградская И.С., Молчанов А.Ю. (Москва, irina\_www@mail.ru)*

Процесс метаморфоза бесхвостых амфибий является очень интересным периодом онтогенеза, т.к. здесь в достаточно короткие сроки происходит перестройка организма, затрагивающая практически все уровни организации от биохимического до органного. В пигментной системе покровов, представленной у личинок отдельными меланинсодержащими клетками – дермальными меланофорами, в период метаморфоза происходит формирование новой структурно-функциональной единицы – дермальной пигментной единицы, в состав которой входят разные типы пигментных клеток.

В нашей работе, проводимой на личинках бесхвостой амфибии – шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis* Daudin), было показано, что по мере приближения личинок к метаморфозному климаксу, начиная со стадии прометаморфоза (56-59 стадия развития по таблицам нормального развития – Nieuwkoop, Faber, 1956), происходит нарушение динамики физиологических реакций дермальных меланофоров, которое выражается в увеличении скорости направленного перемещения меланосом. Такое нарушение сопровождается начинающимися перестройками в покровах амфибий. Используя гистологические методы анализа, мы показали, что по мере приближения к метаморфозному климаксу начинается структурная перестройка покровов личинки, которая затрагивает все слои кожи: и эпидермис, и дерму. В эпидермисе помимо изменений формы клеток, изменения толщины эпидермального пласта, появляются пигментные меланинсодержащие клетки, которых нет у личинок, находящихся на стадии прометаморфоза и начальных этапах прометаморфоза. Впервые такое появление меланинсодержащих клеток наблюдается на 59 стадии (окончание прометаморфоза). В дерме происходит разрыхление губчатого слоя дермы, и отмечается появление дермальных меланофоров в глубоких слоях дермы, чего также не наблюдается на стадиях пре- и раннего прометаморфоза. Таким образом, очевидно, что формирование новой структурно-функциональной единицы в период метаморфоза сопровождается не только серьезными перестройками клеточного пласта, но и появлением новых меланинсодержащих клеток, которые, как мы полагаем, примут участие в формировании дермальной клеточной единицы у взрослых особей.

### **Получение и характеристика культур фибробластоподобных клеток из пупочного канатика**

*Горкун А.А., Кошелева Н.В. (Москва, stgork@gmail.com)*

В настоящее время в клинической практике все чаще используют для лечения трансплантацию клеток. Источником аутологических низкодифференцированных клеток для таких операций при многих тяжелых заболеваниях могут стать клетки, выделенные из пупочного канатика. Они генетически идентичны клеткам новорожденного, легко доступны, обладают высоким пролиферативным потенциалом. Основным веществом пуповины является вартонов студень – особая эмбриональная слизистая соединительная ткань, расположенная между амниотическим покровным эпителием и кровеносными сосудами. Внеклеточный матрикс вартонова студня в основном представлен гиалуроновой кислотой и коллагенами I и IV типа. Целью нашего исследования стало выделение и характеристика фибробластоподобных клеток пупочного канатика. Из 6

образцов пупочного канатика человека после ферментативной обработки (эквимолярная смесь 0,075% растворов коллагеназ I и IV типов, 8 часов, 37°C) выделяли фибробластоподобные клетки вартонова студня. Фибробластоподобные клетки активно прикреплялись к поверхности пластика в первые 24 часа. В культуре *in vitro* сохраняли высокую пролиферативную активность в течение 6-19 пассажей (количество клеток увеличивалось в 1,5-2,5 раза за 48 часов). В первичных клеточных культурах присутствовали два типа фибробластоподобных клеток: 1) распластанные по субстрату крупные клетки и 2) веретенновидные клетки. Количество крупных клеток заметно уменьшалось в процессе культивирования. По результатам иммуногистохимического исследования фибробластоподобные клетки пупочного канатика на четвертом пассаже экспрессировали виментин, нестин, фибронектин и коллагены I и IV типов. По результатам сравнительной геномной гибридизации в них отсутствовали числовые нарушения хромосом и несбалансированные транслокации. По данным проточной цитометрии, выделенные фибробластоподобные популяции клеток экспрессировали маркеры, характерные для мезенхимальных стволовых клеток: CD44, CD105 и CD90, экспрессия которых сохранялась и на девятнадцатом пассаже. После цикла замораживание/размораживание жизнеспособность исследуемых клеток составила около 97%, и они сохраняли высокую пролиферативную активность при дальнейшем пассировании. Таким образом, пупочный канатик может являться приемлемым источником аутологичных стволовых и прогениторных клеток.

### **Особенности формирования постожогового рубца: иммуногистохимическое исследование ткани, биохимические характеристики крови**

*Григорьева О.А. (Москва, o\_grigorieva@list.ru)*

Фибробласты дермы являются ключевыми участниками процесса заживления раны. В настоящее время при поражениях кожи используется метод закрытия обширных постожоговых поверхностей перфорированным кожным лоскутом, как источником аутологичных кератиноцитов. В качестве подложки применяют синтетические носители, покрытые монослоем аллогенных фибробластов. Для этих целей используют клетки сертифицированных линий фибробластов человека или эмбриональные фибробласты. Использование фибробластов в данной системе обеспечивает наилучшую приживаемость кожного лоскута за счет факторов, выделяемых фибробластами. Однако применение аллогенных клеток может приводить к развитию иммунной реакции. Перспективным направлением представляется разработка методов выделения и культивирования аутологичных фибробластов для использования при лечении последствий ожогов большой площади. Известно, что при термических поражениях больших площадей срок регенерации кожи может значительно увеличиваться, а ожоги третьей и четвертой степени часто сопровождаются образованием гипертрофированного шрама. По всей вероятности, изменение динамики заживления раны в этих случаях связано с системными нарушениями баланса факторов роста, хемокинов и цитокинов и, соответственно, с изменением характеристик фибробластов, участвующих в регенерации кожи и формировании рубца. В работе проведено сравнение уровня факторов роста и цитокинов в крови ожоговых больных и здоровых доноров, а также сопоставление этих данных с результатами цитологических и гистологических исследований с целью выявления молекулярных механизмов заживления постожоговых ран и разработки способов выделения и наращивания фибробластов для закрытия ожоговых поверхностей. На криосрезах рубцовой ткани на разные сроки заживления иммуногистохимическими методами проанализировано наличие пролиферирующих и апоптотических клеток; исследовано развитие сосудов в формирующемся рубце. Показано, что на поздних сроках формирования рубца (7-11 месяцев после повреждения) в биоптатах рубцовой ткани наблюдается активная пролиферация клеток,

которая со временем падает, при этом процент апоптотических клеток возрастает. В сыворотке крови больных с ожогами (3 и 4 степени) большой площади и в сыворотке крови здоровых доноров проанализировано содержание основных факторов роста: VEGF, bFGF, HGF и ангиопоэтина-1. Установлено, что в сыворотках крови пациентов с ожогами уровень факторов роста (VEGF, bFGF, HGF и ангиопоэтина-1) достоверно выше, чем у здоровых доноров. В работе сделана попытка выделить фибробласты из биоптатов ожоговых больных по стандартной методике. Оказалось, что фибробласты, выделенные из ожоговой ткани и прилежащей к ней здоровой кожи, выделяемые и культивируемые по стандартной методике, не пролиферируют *in vitro*. Полученные данные позволяют предположить, что высокий уровень факторов роста в крови пациентов с ожогами большой площади влияет на пролиферативные характеристики фибробластов как в зоне повреждения, так и в прилежащей коже.

### **Влияние трансплантации нейральных прогениторных клеток на нейрогенез в мозге взрослых мышей**

*Дьякова Ю.Б. (Москва, osel888@mail.ru)*

Возможность использования нейральных стволовых и прогениторных клеток (НСПК) при нейродегенеративных заболеваниях, таких, как болезни Паркинсона, Альцгеймера, Гентингтона, на протяжении многих лет привлекает внимание исследователей. Считается, что при трансплантации НСПК происходит замещение поврежденных нейронов и происходит стимуляция компенсаторных процессов и нейрогенеза в мозге реципиента за счет выделения НСПК различных трофических факторов. В нашей работе было исследовано влияние трансплантатов НСПК на пролиферацию эндогенных стволовых клеток в субвентрикулярной зоне (СВЗ) мозга реципиента. Для получения первичной культуры НСПК нами были взяты клетки переднего мозга 19-дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)/Osб/J. Клетки (0 пассаж) культивировали в бессывороточной среде с добавлением EGF и FGF до формирования нейросфер. Далее культуру подвергали неоднократному пассированию с разбиением нейросфер. Трансплантации клеток 0 и 3 пассажа проводили взрослым мышам линии C57BL путем инъекции 2 мкл суспензии клеток плотностью 100000кл/мкл. Клетки инъецировали в область неокортекса и стриатума правого полушария мозга по координатам: от брегмы 0,45 мм, латерально 2 мм, 3,5 мм в глубину. Контрольным животным вводили 2 мкл стерильного PBS без клеток. Часть мышей использовали в качестве интактного контроля клеточной пролиферации в СВЗ. Всем мышам в одни и те же сроки со 2 по 6 сутки после операции внутрибрюшинно инъецировали бромодеооксиуридин (БРДУ) для мечения пролиферирующих клеток. На 7 и 34 сутки после операции мышам перфузировали 4% раствором параформа, мозг извлекли и изготовили фронтальные криосрезы толщиной 20 мкм. На неокрашенных срезах исследовали распределение и миграцию трансплантированных клеток. Для выявления их дифференцировки в астроциты и для количественного анализа уровня нейрогенеза в СВЗ латеральных желудочков мозга реципиента использовали антитела против GFAP и БРДУ. В результате было показано, что трансплантированные клетки сохраняются в мозге реципиента, и их количество существенно не изменяется на сроках от 7 до 34 суток. Трансплантаты обнаруживаются в коре, белом веществе и стриатуме. Они взаимодействуют с тканями реципиента: формируют отростки и активно мигрируют по белому веществу и сосудам. Дальность миграции на различных сроках не отличается, из чего следует, что основная миграция происходит в течение первых суток после трансплантации. Трансплантация НСПК и введение PBS без клеток вызывают достаточно сильную реакцию воспаления и глиоз, которые снижаются с течением времени. Некоторые из трансплантированных клеток экспрессируют маркер астроцитов – GFAP. Количество меченных БРДУ клеток в СВЗ через 7 суток после трансплантации

не отличается в группах с НСПК и интактного контроля, однако оно выше в группе мышей с инъекцией PBS. Следовательно, можно полагать, что мозг реципиента реагирует на инъекцию PBS как на травму, в то время как инъекция НСПК компенсирует эту реакцию, и пролиферация в СВЗ сохраняется в пределах нормы.

### **Светооптический анализ миокарда левого желудочка крыс при развитии экспериментального аутоиммунного миокардита**

*Земцова Л.В. (Москва, zemlyudmila@yandex.ru)*

Аутоиммунный миокардит – хроническое воспаление миокарда, возникающее при нарушении иммунитета. Его причиной может быть инфекция, токсическое воздействие, наследственно обусловленные сбои в работе иммунной системы. Следствием воспаления в миокарде является гибель части кардиомиоцитов и замещение их соединительной тканью. Это влечет за собой истончение стенки сердца и развитие сердечной недостаточности. Заболевание обычно выявляют на поздних сроках, в то время как ранние стадии его развития недостаточно изучены. Экспериментальный аутоиммунный миокардит вызывают инъекцией животным сердечного миозина в комплексе с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ). ПАФ представляет собой водно-масляную эмульсию, содержащую убитые микобактерии, и используется для усиления иммунного ответа. Предыдущие работы нашей лаборатории показали, что ПАФ сам по себе вызывает неспецифическое воспаление, что затрудняет оценку специфической аутоиммунной реакции. В данной работе исследовали изменение структуры миокарда левого желудочка сердца крыс на ранних стадиях развития экспериментального аутоиммунного миокардита, индуцированного инъекцией сердечного миозина крысы в смеси с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ), который не содержит микобактерий. Постановка эксперимента проводилась сотрудниками кафедры экспериментальной и патологической физиологии факультета фундаментальной медицины МГУ под руководством профессора В.Б.Кошелева. Очищенный сердечный миозин вводили беспородным крысам в дозе 800 мкг/кг в смеси с эквивалентным объемом НАФ (группа М-НАФ). Контролем служили крысы, инъекцированные НАФ с физиологическим раствором (группа НАФ), а также интактные животные (группа ИК). Кусочки миокарда фиксировали на 4, 14, 21 сутки после инъекции. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином, метиленовой синькой и по методу Романовского. Методом TUNEL оценивали число апоптотических ядер кардиомиоцитов. Развитие воспалительной реакции в миокарде животных группы М-НАФ наблюдается уже на 4 сутки, она усиливается на 14 сутки и наиболее выражена на 21 сутки. Воспаление носит диффузно-очаговый характер и проявляется в появлении лимфоцитов и макрофагов в капиллярах и межклеточных пространствах. В кардиомиоцитах нарушается исчерченность, характерны сокращения в виде поперечных полос. На более поздних этапах эксперимента отмечено нарушение параллельного расположения мышечных волокон, увеличение количества соединительной ткани в миокарде. В группе НАФ изменения сходные, но они менее выражены. Морфометрический анализ на срезах миокарда показал, что в группе М-НАФ уже на 4 сутки количество лимфоцитов увеличено по сравнению с ИК в 2 раза, на 21 сутки – в 3.7 раза, а тучных клеток соответственно в 4 и 10 раз. В группе НАФ на 4 сутки число лимфоцитов больше в 1,7 раза, чем в ИК, и достоверно не отличается от группы М-НАФ, а на 14 сутки достоверные отличия между всеми группами отсутствуют. На 21 сутки количество лимфоцитов в группе НАФ в 2.2 раза превышает интактный контроль, но в 1,7 раза меньше, чем в группе М-НАФ. Число тучных клеток в группе НАФ достоверно не отличается от контроля на всех сроках эксперимента. Определение числа апоптотических ядер на 21 сутки не выявило отличий между группами ИК и НАФ, в то время как у крыс группы М-НАФ число апоптотических ядер примерно в 2 раза выше,

чем в контроле. Таким образом, в миокарде крыс группы М-НАФ, начиная с 4 суток, наблюдается иммунная реакция, ведущая к повреждению кардиомиоцитов. Инъектирование НАФ приводит к развитию неспецифической реакции, но достоверно менее интенсивной на 21 сутки. Можно полагать, что к этому сроку развивается специфический иммунный ответ.

**Роль механических натяжений в регуляции морфогенетических движений и региональной экспрессии тканеспецифичных генов у зародышей шпорцевой лягушки**

*Корникова Е.С. (Москва, ekorni@yandex.ru)*

В период гастрюляции амфибий формируется супрбластопоральная область (СБО) которая, согласно картам презумптивных зачатков, содержит предшественники осевых структур организма – нервной системы, хорды и сомитов. Важным свойством ее клеток является способность совершать конвергентные движения в латеро-медиальном направлении (перпендикулярно будущей переднезадней оси организма). До сих пор остается нерешенным, осуществляется ли стабильная разметка зародыша до и независимо от латеро-медиальной конвергенции, и являются ли эти движения внутренним свойством клеток СБО.

В работе исследовали влияние механических натяжений на направление клеточных движений, формообразование и экспрессию тканеспецифичных генов. У зародышей шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis* Daudin) на стадии ранней гастрюлы вырезали и ретрансплантировали в ту же область участок СБО, что приводило к релаксации основного дорсомедиального узла натяжений. В результате этого конвергентные движения возникали вместо СБО в области боковых губ бластопора и в направлении вентральной средней линии, то есть перпендикулярно вновь возникшим линиям максимальных натяжений. Через 24 часа после операции зародыши формировали особый фенотип, сходный с зародышем высших позвоночных – «фарингулой». Материал СБО либо не совершал никаких видимых движений, либо асимметрично «стекал» по боковым губам открытого бластопора в вентральном направлении. Если бы разметка зародышей осуществлялась до и независимо от движений латеро-медиальной конвергенции, то у оперированных зародышей следовало ожидать следовало ожидать либо более или менее точного воспроизведения карт презумптивных закладок, либо деформации карт презумптивных закладок в соответствии со «стеканием» клеточного материала. В действительности же расположение зон экспрессии независимо от характера миграции клеток СБО существенно не отличалось друг от друга и мало соответствовало «гипотезе карт». У оперированных зародышей происходила переориентация переднезадней полярности: экспрессия маркера переднего мозга, гена *Otx2*, наблюдалась в дорсальной области. Зачаток хорды имел изменчивую форму. Маркер нервной системы, ген *Sox3*, экспрессировался в дорсальной области и в боковых губах бластопора, а маркер сомитов, ген кардиального актина, – в боковых губах бластопора латеральнее нейральных зачатков. Кроме того, на разных зародышах области экспрессии исследуемых генов перекрывались. Несмотря на такую вариабельность в деталях, паттерны экспрессии рассмотренных генов были значительно симметричнее распределения меченого материала, т.е. мало зависели от региональной специфики клеточного материала. При асимметричном вентральном стекании клеточного материала соответственной асимметрии в расположении зон экспрессии исследуемых генов не наблюдалось.

Данные результаты показывают, что нормальные морфогенетические движения необходимы для правильной разметки СБО, а их направление находится под контролем внешних полей механических натяжений. Интактная механически напряженная СБО

является организатором клеточных потоков, от которых решающим образом зависит дифференцировочная разметка всего зародыша.

### **Влияние препарата Ксефокам на ультраструктуру миокарда левого желудочка крыс в условиях ишемии**

*Кост Е.А. (Москва, Lenok.kst@rambler.ru)*

Ксефокам является неселективным противовоспалительным ингибитором. В настоящее время он применяется в клинике при лечении различных видов артритов, артрозов и болях в суставах. Показана его хорошая переносимость пациентами, быстрый анальгетический эффект и высокая биодоступность. Влияние Ксефокама на течение инфаркта миокарда исследовано не достаточно, однако показано, что данный препарат снижает смертность крыс на модели инфаркта миокарда коронароокклюзией. При этом изменения ультраструктуры миокарда при инфаркте практически не изучены при применении данного препарата. Цель настоящего исследования – изучение влияния препарата Ксефокам, введенного в острую стадию инфаркта миокарда, на ультраструктуру миокарда крыс (самцы белые беспородные) при ишемии. Постановка эксперимента проводилась на базе кафедры нормальной и патологической физиологии Факультета фундаментальной медицины Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова. Ишемию вызывали перевязкой левой нисходящей ветви коронарной артерии, что приводит к развитию инфаркта в верхушке левого желудочка. Ксефокам (230 мкг/кг) или воду вводили внутривенно однократно через 20 минут от начала ишемии. Через 3 суток после ишемического повреждения рассматривается 3 группы животных: Контроль, Ишемия, Ишемия + Введение Ксефокама. Ультраструктура кардиомиоцитов верхушки левого желудочка изучалась на просвечивающем электронном микроскопе. Далее по негативам проводился анализ основных компонентов клетки и измерение относительного объема митохондрий и миофибрилл с помощью квадратной тестовой системы коротких отрезков. Для статистической обработки результатов использовали пакет программ STATISTICA. Для оценки значимости различий применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали значимыми, если  $p < 0,05$ . В группе Ишемия встречаются ядра кардиомиоцитов с изрезанной границей. Миофибриллы, как правило, имеют нормальную структуру. Отмечено незначительное количество набухших митохондрий, нередко встречались миелиноподобные тельца. Соотношение энергопродуцирующего и сократимого аппаратов клетки составило 0,72. Наблюдались отёки гиалоплазмы, выраженные в разной степени. В целом, указанные изменения согласуются с описанными ранее в литературе в аналогичных условиях. В группе Ишемия + Ксефокам ядра имели нормальный вид, миофибриллы и большинство митохондрий практически не имеют нарушений. Их соотношение составило 0,77, что не отличается достоверно от группы Ишемия. Как и в группе Ишемия встречались миелиноподобные тельца. Сильно увеличено количество, но не размер липидных капель в разных районах клетки. В результате исследования было показано, что Ксефокам на данном сроке оказывает кардиопротекторное действие на клетки миокарда в ишемизированной области левого желудочка, но необходимы дополнительные исследования для выявления оптимального сочетания данного препарата с другими терапевтическими воздействиями.

## **Цитотоксическое исследование компонентов растений рода *Astragalus*, произрастающих в Республике Каракалпакстан**

*Кучербаев К.Д., Наубеев Т.Х., Мамадалиева Н.З. (Ташкент, Узбекистан, kamalkj@rambler.ru)*

Астрагалы издавна применяются в народной медицине при различных заболеваниях. Некоторые виды астрагала применяются в научной медицине в качестве успокаивающих и гипотензивных средств. Они также обладают противовирусной и противоопухолевой активностями. Растения рода астрагал в основном являются источниками таких биологически активных соединений как тритерпеновые гликозиды, флавоноиды, полисахариды. Ранее нами были изучены циклоартановые гликозиды надземной части и корней растения *Astragalus unifoliolatus* Bunge, *Astragalus chivensis* Bunge и *Astragalus flexus* Fisch. В данном сообщении мы приводим результаты цитотоксического исследования *in vitro* на мышинных миеломных клетках P3X основных компонентов этих растений. Результаты тестов *in vitro* показали, что при концентрации вводимого образца 20 µg/mL наиболее высокой противоопухолевой активностью обладает водный экстракт, а при концентрации 40 µg/mL – метанольный экстракт надземной части *A. unifoliolatus*. Противоопухолевая активность метанольного экстракта надземной части *A. chivensis* в наиболее высокой степени наблюдается при концентрации 40 µg/mL. Отмечено, что при повышении концентрации противоопухолевая активность экстрактов повышается на 45% и 19% соответственно, у метанольного и водного экстрактов надземной части *A. unifoliolatus* и на 36% у метанольного экстракта надземной части *A. chivensis*. Наиболее активными гликозидами оказались циклоунифолиозид А и В, цитотоксичность которых увеличивается при увеличении концентрации. Количество жизнеспособных клеток уменьшается на 12%, 37% и 16% соответственно при повышении концентрации олеаноловой кислоты, циклоунифолиозид А и циклоунифолиозид В. Таким образом, результаты цитотоксического исследования показывают о возможности использования метанольного и водного экстрактов надземной части *Astragalus unifoliolatus* Bunge и *Astragalus chivensis* Bunge, а также циклоунифолиозидов А и В для создания высокоспецифических противоопухолевых средств.

## **Изучение роли стабилизации негистоновых белков ионами $\text{Cu}^{2+}$ в организации митотической хромосомы из клеток культуры СПЭВ**

*Макаров М.С. (Москва, mcsimmc@yandex.ru)*

Остаточные негистоновые белки представляют собой нерастворимую ядерную фракцию, которая выявляется после удаления всех гистонов и нуклеиновых кислот, носит название «ядерный белковый матрикс» (ЯБМ). На выделенных митотических хромосомах было показано, что негистоновые белки образуют так называемый scaffold (остов), повторяющий очертания тела хромосомы, т.е. непосредственно участвует в структурной организации. Отмечено, что scaffold выявляется более отчетливо при использовании ионов двухвалентных металлов (главным образом,  $\text{Cu}^{2+}$ ), связывающих негистоновые белки. Однако *in situ* (при сохранении клетки) подобные работы не проводились. Предварительная стабилизация хромосом ионами  $\text{Cu}^{2+}$  позволяет выявить тело хромосомы даже после удаления всех гистонов и ДНК. При этом можно видеть неоднородность окрашивания тела хромосомы, как в исходном состоянии, так и в случае получения стабилизированного ЯБМ. Негистоновые белки, стабилизированные, играют решающую роль в сохранении тела хромосомы, независимо от присутствия гистонов и ДНК. Плотность распределения негистоновых белков неодинакова по всей длине хромосомы. Следовательно, наблюдается неоднородность компактизации как самих митотических хромосом, так негистоновых белков в их составе.

## Получение плюрипотентных линий гибридных клеток для изучения процесса инактивации X-хромосомы обыкновенных полевков рода *Microtus*

Малахова А.А., Григорьева Е.В., Шевченко А.И. (Новосибирск, amal@ngs.ru)

Моделью раннего развития млекопитающих являются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). При дифференцировке ЭСК воспроизводятся процессы раннего развития млекопитающих, в том числе происходит запуск процесса инактивации X-хромосомы. Получение ЭСК полевки столкнулось с методическими трудностями. Альтернативной моделью для исследования процесса инактивации X-хромосомы полевки могут служить гибридные клетки, содержащие X-хромосому полевки на фоне плюрипотентного генома мыши. Изучение дифференцировки таких клеток позволит судить о совместимости систем дозовой компенсации мыши и полевки. Проведена гибридизация ЭСК мыши линии TG-2a со спленоцитами полевков *Microtus rossiaemeridionalis* и *M. kirgisorum*. Полученные гибридные клоны имели различную морфологию: 9 ЭС-подобных клонов, 17 клонов по морфологии напоминают линии экстраэмбриональной эндодермы. Проведены тесты по оценке плюрипотентности линии гибридных клеток. Тест на активность щелочной фосфатазы показал, что в клонах с ЭС-подобной морфологией уровень экспрессии этого фермента сравним с таковым в ЭС клетках мыши линии TG-2a. ЭС-подобные гибридные клоны при дифференцировке способны образовывать эмбрионидные тельца и формировать тератомы при подкожном введении мышам линии *nude*. Гистологический анализ срезов тератом показал, что гибридные клетки в основном идут по пути нейрального гистогенеза или сохраняются в тератоме в виде ЭС-подобных клеток. Это свидетельствует об ограниченном потенциале дифференцировки у гибридных клеток. Цитогенетический анализ показал, что клоны с ЭС-подобной морфологией на фоне генома мыши содержат преимущественно от 1 до 5 фрагментов аутосом и X-хромосомы полевки. Иммунофлуоресцентный анализ клонов с морфологией, напоминающей клетки линии экстраэмбриональной эндодермы, показал, что в этих клетках отсутствует экспрессия генов *Oct4*, *Nanog*, участвующих в поддержании плюрипотентного состояния ЭСК, не выявляется поверхностный антиген ЭСК *SSEA-1*. В то же время в данных клетках экспрессируются такие факторы, как *Gata4*, *Gata6*, являющиеся маркерами клеток экстраэмбриональной эндодермы и ЭСК, дифференцированных в эндо- и мезодермальном направлении. Кроме того, не обнаружена экспрессия цитокератина 8 (*Krt8*), маркирующего производные эктодермы, а также фактора *Cdx2*, маркирующего клетки трофобласта. Таким образом, полученные гибридные клоны не сохраняют свойство плюрипотентности, характерное для родительской линии TG-2a. Для получения плюрипотентного клона, содержащего X-хромосому полевки на фоне генома мыши, в дальнейшем планируется провести репрограммирование имеющихся дифференцированных клонов методом внедрения ретровирусных векторов, несущих гены транскрипционных факторов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, а также гена *c-Myc*, способствующих индукции плюрипотентного состояния дифференцированных клеток.

## Возможные регенерационные потенциалы *rete testis* после механической травмы семенника крыс и мышей

Малолina Е.А., Кулибин А.Ю. (Москва, kate-malolina@mail.ru)

Сперматогенез – сложный процесс развития мужских половых клеток, ведущий к формированию большого количества мобильных гамет, способных переносить отцовский геном в яйцеклетку. В настоящее время основным источником регенерации сперматогенеза считают стволовые сперматогонияльные клетки (ССК). Однако ранее С.С. Райчиной (1985 г.) было показано, что у некоторых млекопитающих в ответ на действие ряда повреждающих факторов (в том числе после механической травмы у крыс) клеточные элементы сети семенника (*rete testis*) способны активизироваться и давать начало новым канальцам с развивающимися половыми клетками. На модели

ускоренно стареющих мышей линии SAMP1, достигших критического возраста (18–28 мес) или подвергшихся воздействию химического мутагена дипина, также было отмечено формирование вблизи *rete testis* новых семенных канальцев (наши результаты). Эти данные указывают на возможность восстановления сперматогенеза и у мышей за счет клеточных элементов *rete testis*. Цель настоящей работы – сравнительное изучение реакции *rete testis* крыс и мышей на механическую травму семенника. Последствия механической травмы семенника мышей изучены нами впервые. В работе использованы половозрелые 2–3-месячные крысы породы Wistar и мыши-гибриды F<sub>1</sub> CBA×C57Bl/6. Механическую травму производили путем удаления части семенных канальцев. Забой крыс производили на 14 и 49 сут после операции, а мышей – 3, 7, 14, 35 и 60 сут. В опытах на крысах на 14 сут после травмы нами было отмечено впервые найденное Райциной разделение *rete testis* на две зоны: зону полостей (у интактных животных присутствует только эта зона) и зону тяжей, располагающуюся между полостями *rete testis* и дегенерирующими семенными канальцами и часто заходящую далеко внутрь семенника. На 49 сут фиксации, в том случае, если регенерация семенника уже произошла (в 50% случаев), зона тяжей *rete testis* исчезала и сеть семенника вновь представляла собой большую вытянутую полость с небольшими ответвлениями, т.е. приобретала нормальную морфологию. У мышей, в отличие от крыс, разделения *rete testis* на две зоны в ответ на травму семенника обнаружено не было. Тем не менее, уже на 3 сут после операции ее структура заметно усложнялась по сравнению с интактными животными. Начиная с 7 сут, наряду с усложнением структуры, резко увеличивалась площадь *rete testis* – в отдельных случаях в 6 раз. На 14 сут фиксации площадь *rete testis* в опыте была в 2–2,5 раза больше, чем в контроле, а к 28 сут возвращалась к контрольному уровню. Однако параметры сети семенника у подопытных мышей восстанавливались только к 60 сут после травмы, когда происходило восстановление сперматогенеза. Существенно отметить, что к этому сроку у подопытных животных, так же как в контроле, размеры *rete testis* значительно возрастали по сравнению с предыдущими сроками фиксации. Полученные нами результаты позволяют сделать вывод о том, что ответ *rete testis* на механическую травму семенника при выбранных условиях эксперимента у крыс и мышей различается. Отсутствие у мышей ярко выраженных изменений в структуре *rete testis* после травмы, скорее всего, свидетельствует не об отсутствии у нее регенерационного потенциала, а о возможности его реализации по другому, чем у крыс, сценарию. Для ответа на этот вопрос необходимо изучить процессы деструкции и восстановления сперматогенеза после механической травмы у мышей более подробно.

#### **Исследование цитотоксических свойств фитоэкдистероидов и экстрактов растения *Silene viridiflora***

*Мамадалиева Н.З., Жанибеков А.А. (Ташкент, Узбекистан, mnilufar76@yahoo.com)*

Сумма фитоэкдистероидов, полученная из надземных частей *Silene viridiflora* L. (сем. Caryophyllaceae) рекомендована как эффективное актопротекторное средство для применения в спортивно-медицинской практике при пониженной работоспособности и ослабленных процессах восстановления после перенесенных заболеваний и тяжелых физических нагрузок. Результаты исследований биологической активности *in vivo* свидетельствуют, что экстракт *S. viridiflora* проявлял противоопухолевое действие.

Эти данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения экстрактов и фитоэкдистероидов из растения *S. viridiflora* в цитотоксических тестах. Исходя из этого, нами было изучена *in vitro* цитотоксическая активность метанольного экстракта и некоторых индивидуальных экдистероидов: интегристерона А, 2-дезоксидизона, 2-дезоксидизона-20-гидроксиэксидизона, 20-гидроксиэксидизона и 26-гидроксиполиподина В из надземных частей растения *S. viridiflora*.

Оценка противоопухолевого действия испытуемых образцов проводилась на мышинной миеломной клетке P3X и цитотоксическую активность оценивали с помощью МТТ-теста. Исследования *in vitro* показывают, что метанольный экстракт и индивидуальные экистероиды растения *S. viridiflora* подавляют рост клеток в различной степени, причем наиболее высокой противоопухолевой активностью отличался метанольный экстракт. В МТТ тестах метанольный экстракт (в 20 µg/mL концентрации) показал высокую (60%) цитотоксичность на клетках P3X. Но в концентрации 40 µg/mL активность экстракта уменьшалась и составила 125%. Фитоэкистероиды 2-дезоксизекдизон, 20-гидроксиэкидизон и 26-гидроксиполиподин В были неактивными в отношении клеток P3X. Однако, экистероиды интегристерон А и 2-деокси-20-гидроксиэкидизон в концентрации 4 µg/mL оказались более активными соответственно 75.4 и 73.3%, чем другие экистероиды и это, видимо, обусловлено различиями в строении соединений.

Таким образом, установлено, что метанольный экстракт и индивидуальные экистероиды *S. viridiflora* проявляют цитотоксическую активность на клетки P3X миеломы мышей. Представляет интерес дальнейшее углубленное исследование экстракта и индивидуальных экистероидов на человеческих моделях клеток для разработки новых противоопухолевых средств против рака или дегенеративных болезней.

Исследовательская работа поддерживалась грантом Tuscia University (Viterbo, Italy).

### **Влияние обогащённой тромбоцитами плазмы на морфо-функциональные характеристики культур клеток кордового материала человека**

*Маслова О.А. (Киев, Украина, rotiferko@gmail.com)*

Пуповина человека – источник клеток различных типов. В культуре можно обнаружить веретенообразные, эндотелиальные, округлые и отростчатые клетки. Особый интерес представляют мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Однако при культивировании мультиклеточного материала возникают некоторые сложности. Клетки имеют разную степень адгезии, разные типы клеток имеют различные формы контактов. Целью нашей работы было изучение влияния обогащённой тромбоцитами плазмы (ОбТП) на морфологические характеристики мультиклеточных культур и степень дифференциации МСК. Клетки культивировались на среде DMEM с низким содержанием глюкозы, с 5% аутологической сыворотки (АС). Для создания подложки культуральная посуда обрабатывалась фибронектином и гиалуроновой кислотой. ОбТП – относительно новая добавка к культуральным средам. Она содержит до 35 различных ростовых факторов и биологически активных веществ, которые способствуют более интенсивному росту клеток и влияют на степень их дифференциации. Для оценки морфологии клеток были использованы, адаптированные для данного материала, методики окраски гематоксилином и эозином, Суданом III. Оценивалась форма клеток, вид отростков, степень вакуоляризации, расположение ядра, количество ядрышек, тип формирования монослоя. Для оценки состояния ядерного материала был применён флюоресцентный краситель Hoechst 33342. Морфометрические данные были получены с помощью специализированного программного обеспечения. Аутологическую ОбТП получали с помощью методики двойного центрифугирования. Активация выброса содержимого альфа-гранул производилась путём индукции коагуляции раствором хлорида кальция и сухим тромбином. Клетки из кордового материала были получены следующими способами: вымыванием из вены по стандартной методике с использованием коллагеназы; путём посева измельчённых кусочков пуповины без ферментативной обработки. Оптимальной концентрацией ОбТП для поддержания морфологических характеристик стволовых клеток, согласно нашей работе, является 5%. Наилучший эффект наблюдался при комбинировании 5% АС и 5% ОбТП. В

результате исследования показано, что ОБТП повышает способность клеток пуповины прикрепляться к субстрату даже при отсутствии сыворотки. Также ОБТП повышает пролиферативную активность клеток. При добавлении ОБТП наблюдалось повышенное количество МСК в культуре, по сравнению с контрольными образцами, где преобладали другие типы клеток. Работа находится на начальном этапе и в наших планах – изучение влияния ОБТП на хондро- и адипогенез МСК из пуповины, и экспрессию внутриклеточных белков.

### **Трансдифференцировка клеток пигментного эпителия глаза человека на ранних стадиях развития *in vitro***

*Милюшина Л.А. (Москва, milyushina@rambler.ru)*

Пигментный эпителий сетчатки (ПЭ) является важной тканью глаза, жизненно необходимой для поддержания функциональной и структурной целостности сетчатки. При различных патологиях клетки ПЭ человека претерпевают фенотипические изменения, которые имеют некоторое сходство с процессами трансдифференцировки ПЭ в сетчатку у амфибий. Изучение *in vitro* клеток ПЭ глаза человека ранних стадий развития дает возможность выявить механизмы их модификации и глубже понять процессы, лежащие в основе ряда патологий сетчатки. Целью работы являлось исследование способности клеток ПЭ глаза плодов человека к дифференцировке в нейральном направлении *in vitro*. Изучали динамику поведения и фенотипические изменения клеток ПЭ при разных условиях культивирования. Полученные культуры анализировали с применением широко спектра антител – маркеров нейральной дифференцировки. Клетки ПЭ, выделенные на стадии 9-11,5 нед развития (нр), при культивировании в среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) образовывали адгезивные культуры, клетки которых активно пролиферировали. В культурах четко выделялись клетки эпителиальной и фибробластоподобной морфологии. В эпителиальных клетках иммуноцитохимически выявлялись белки межклеточных контактов Сх43. Клетки фибробластоподобной морфологии отличались наличием более широкого спектра маркерных белков. Некоторые из них давали положительную окраску при использовании маркера нейральной дифференцировки нестин, другие – ВПН-тубулин и реCOVERIN, однако, не было обнаружено окрасок на белки Oct4 и Рах6. В среде DMEM/F12, содержащей факторы FGF, EGF и 1% FBS клетки ПЭ, выделенные на стадии 11.5 нр вели себя по-разному. Часть клеток прикреплялась ко дну флакона, а другие формировали свободноплавающие агрегаты. В адгезивной культуре все эпителиоподобные клетки и некоторые фибробластоподобные сохраняли белок межклеточных контактов Сх43. Однако большинство фибробластоподобных клеток демонстрировали иммуноцитохимическое окрашивание антителами против Рах6, часть против ВПН-тубулин и реCOVERIN. Окраски антителами против Oct4 не наблюдалось. В клетках, растущие в виде сфер, на второй день после прикрепления ко дну культурального флакона выявлялась отчетливая иммуноцитохимическая окраска на Oct4, ВПН-тубулин и реCOVERIN, а на девятые сутки и на Рах6. При культивировании в среде с вышеуказанными факторами на девятые сутки сохранялись единичные клетки с окраской на Oct4, в отличие от культур, растущих на DMEM/F12 с добавлением 10-ти % FBS. Данная работа подтвердила данные о влиянии факторов FGF и EGF на пролиферацию, миграцию и на трансдифференцировку клеток ПЭ глаза человека. Однако впервые удалось показать, что популяция клеток ПЭ глаза человека, выделенных на стадии 9-11.5 нр гетерогенна, и в ней выделяется как минимум три субпопуляции клеток, ответ и поведение которых *in vitro* различны. Работа поддерживается грантом РФФИ 08.04.00081 и Контрактом Федерального агентства по науке и инновациям № 02.512.12.2008

## **Обогащение среды вызывает включение бромдезоксимуридина в клетки непролиферативных зон головного мозга**

*Минеева О.А., Ефимова О.И. (Москва, o.efimova.1@gmail.com)*

Обогащение (усиление сенсорного и моторного притока) окружающей среды в последнее время широко исследуют в связи с данными о компенсации, которую она оказывает при нейродегенеративных заболеваниях, а также при эпилепсии и инсульте. Известно, что обогащенная сенсорная среда и физическая активность усиливают нейрогенез в зубчатой фасции гиппокампа, и традиционно считается, что образование новых нервных клеток в мозге взрослых млекопитающих происходит только в субвентрикулярной зоне, зубчатой фасции гиппокампа и обонятельной луковице. Однако существует ряд работ, указывающих на нейрогенез во взрослом мозге за пределами этих зон. В частности, включение клетками бромдезоксимуридина (маркера синтеза ДНК) было показано в неокортексе. Целью настоящей работы было исследовать возможность активации обогащенной средой нейрогенеза вне традиционных зон пролиферации в мозге взрослых мышей. Для этого решались следующие задачи: 1) по включению 5-бромо-3-дезоксимуридина (BrdU) картировать зоны пролиферации в мозге взрослых мышей в стандартных условиях содержания (К) и после пребывания: а) в сенсорно обогащенной среде (ОС) и б) в сенсорно обогащенной среде с возможностью физической активности (ФА); 2) определить фенотип клеток, включивших BrdU, через 12-36 ч после мечения. Мы обнаружили, что в мозге взрослых мышей наблюдалось включение BrdU вне традиционных пролиферативных зон: фронтальной, прелимбической, цингулярной, моторной, соматосенсорной коре, в гиппокампе, в хвостатом ядре, миндалине, таламусе и гипоталамусе. В группе ФА выявлено достоверное увеличение количества клеток, включивших BrdU, в хвостатом ядре, фронтальной коре, первичной и вторичной моторной коре, первичной и вторичной соматосенсорной коре по сравнению с контролем. В группе ОС достоверные различия с контролем наблюдались только в первичной соматосенсорной коре. Оценка фенотипа BrdU-положительных клеток через 12-36 ч после инъекций выявила высокую степень колокализации этих клеток с маркером нейробластов 1 типа DCX ( $0,50 \pm 0,06$ ) и незначительную колокализацию с маркерами астроцитов (GFAP), микроглии (Iba-1) и зрелых нейронов (NSE) ( $0,11 \pm 0,01$ ,  $0,09 \pm 0,03$  и  $0,07 \pm 0,07$ , соответственно). Таким образом, обогащенная среда и физическая активность вызывают увеличение включения бромдезоксимуридина в клетки головного мозга взрослых мышей в непролиферативных зонах мозга. Полученные данные позволяют предполагать, что в этих клетках может происходить пролиферативный синтез ДНК, и клетки, включившие BrdU, начинают дифференцироваться по нейрональному типу. Дальнейшую судьбу этих клеток планируется исследовать в последующих экспериментах.

## **Влияние аминокислот на пролиферацию и апоптоз клеток в культуре нервной и мезенхимной тканей**

*Морозова П.Ю., Балыкина Н.А., Уртева С.А., Уртева Т.А., Морозова А.Ю. (Санкт-Петербург, aravenko\_polina@yahoo.com)*

Одной из функций биорегуляторных пептидов является осуществление воздействия на репаративные процессы в тканях организма за счет стимуляции клеточной пролиферации или ее торможения при процессах апоптоза. Можно полагать, что аминокислоты, входящие в состав пептидов в качестве структурных элементов, сами обладают некоторыми регуляторными свойствами в отношении тканей-мишеней и могут быть использованы для коррекции состояния здоровья на донологическом уровне. Одним из методов исследования биологически активных веществ является их тестирование в органотипической культуре ткани, в которой сохраняется иерархическая соподчиненность

клеточных популяций на фоне отсутствия нервных и гуморальных влияний, действующих в целостном организме. Изменение количества клеток в зоне роста, по сравнению с контролем, служит критерием первичной оценки биологической активности веществ. Целью настоящей работы было скрининговое исследование действия 20 незаменимых и заменимых аминокислот, на развитие органотипической культуры тканей различного генеза. На развитие культивируемых тканей коры головного мозга, подкорковых структур, мозжечка стимулирующим образом влияли преимущественно гидрофобные аминокислоты: валин, треонин, метионин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, триптофан. Зона роста экплантатов увеличивалась при этом на 25-38% по сравнению с контрольными значениями. В тканях мезодермального генеза клеточную пролиферацию стимулировали аминокислоты: аспарагин, лизин, аргинин, глутаминовая кислота. Кроме того в мышечных тканях (скелетные мышцы, сердце) и в семенниках наблюдалось стимулирующее пролиферацию действие аминокислот с разветвленными боковыми цепями – валина, лейцина, изолейцина. Полученные данные позволяют предложить использование ряда аминокислот на донозологическом уровне, в связи с выраженной их способностью стимулировать процессы клеточной пролиферации различных тканей и отсутствием аллергенных реакций.

***In vivo* оценка плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток линии Tau-GFP методом получения химер с эмбриональными партнерами разной плоидности**  
Назарко Н.С., Поварницына П.Ю. (Новосибирск, [homkis@ngs.ru](mailto:homkis@ngs.ru), [fotodota@gmail.com](mailto:fotodota@gmail.com))

Эмбриональные стволовые клетки (ES-клетки) – наиболее плюрипотентные из всех культивируемых клеток млекопитающих. Гибриды, полученные на их основе, являются одной из удачных моделей для изучения репрограммирования генома. Линия Tau-GFP представляет собой диплоидные ES-клетки мыши, удобные для визуализации в составе химеры благодаря стабильной экспрессии зеленого флюоресцентного белка (GFP). Целью нашей работы была *in vivo* оценка плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток линии Tau-GFP. Используемая линия имела инбредный генотип 129/Ola и большое количество (46-66) пассажей. Были исследованы два типа химер: с диплоидным и с тетраплоидным эмбриональным партнером. В первом случае химера состоит из смеси клеток-потомков линии Tau-GFP и клеток эмбриона-реципиента. Использование тетраплоидного эмбриона в качестве партнера для создания химеры (ТЕС-тест) позволяет тестируемым ES-клеткам сформировать целый организм, в то время как тетраплоидные клетки образуют экстраэмбриональные ткани. Методом инъекции ES-клеток линии Tau-GFP в диплоидную бластоцисту мыши было получено 13 взрослых химер. Гистологический анализ химер выявил, что потомки ES-клеток способны давать вклад во все зародышевые листки, однако имеются некоторые ограничения в заселении энтодермальных производных и преимущества в заселении мезодермы. Было показано, что жизнеспособность химер и доля потомков ES-клеток в тканях не зависит от накопления линией пассажей. С другой стороны, химерные эмбрионы, полученные методом агрегации ES-клеток линии Tau-GFP с диплоидным 8-кл эмбрионом, не способны были развиваться до рождения. Поскольку тетраплоидные бластоцисты оказались неспособными переносить инъекции, в ТЕС-тесте использовался метод агрегации. 170 нормальных химерных бластоцист, полученных *in vitro*, было трансплантировано реципиентным самкам мыши. Беременность наступала в 35% случаев. Химерные эмбрионы были полностью сформированы потомками ES-клеток, но их развитие было аномальным и продолжалось лишь до середины беременности. Таким образом в инъекционном эксперименте рассмотренная линия показала сравнительно высокий плюрипотентный статус. Методом агрегации не было получено взрослых химер, поскольку он не пригоден для работы с линиями ES-клеток, накопивших большое количество пассажей, что имеет подтверждение в литературе. Ограничения

потенциала к развитию, показанные в ТЕС-тесте связаны с используемым методом (агрегацией), а также, возможно, с количеством накопленных линией пассажей и ее генотипом. Тезисы доклада основаны на материалах исследований, частично проведенных в рамках гранта «Карл Цейсс для поддержки молодых ученых ведущих университетов РФ». Авторы выражают особую благодарность научному руководителю, к.б.н., н.с. Е.А. Кизиловой.

### **Гистологическая характеристика печени крыс и стабильность ядерной ДНК в условиях различной обеспеченности организма витамином А**

*Пасайлюк М.В., Филипчук В.М. (Черновцы, Украина, masha\_fok@mail.ru)*

Витамин А регулирует процессы роста и дифференцировки в течении всей жизни организма, необходимый для эмбрионального развития и репродуктивных процессов, реализация которых на генетическом уровне напрямую зависит от целостности молекулы ДНК. Природное происхождение витамина А позволяет использовать его в качестве терапевтического агента при лечении различных заболеваний, включая онкологические. Тем не менее нет единого мнения о беспечности продолжительного использования ретинола, как в качестве самостоятельного, так и дополнительного компонента терапии, поскольку длительное использование приводит к проявлениям гипервитаминоза. Главным местом метаболизма и депонирования витамина А является печень. Но как влияет на этот орган действие гипердоз витамина А, так и его отсутствие неизвестно. Мы решили определить каким образом различные условия обеспечения организма витамином А влияют на структуру печени и стабильность ее ДНК. Обеспеченность организма витамином А неоднозначно влияет на гистологическую картину срезов печени крыс. Так, снижение уровня ретинола в организме до состояния среднего дефицита витамина А (0,35 – 0,50 мкмоль/л витамина А в сыворотке) не позволяет зафиксировать достоверной разницы в гистологических срезах контрольных животных (крыс, которые получали норму витамина А) и подопытных. На препаратах животных сохранена структура органа, не четко выражено дольчатое строение, печеночные пластинки размещены радиально, центральные вены, ветки воротной вены, синусоиды умеренного кровенаполнения, умеренно выражена междольчатая соединительная ткань, характерный полиморфизм гепатоцитов (светлые и темные), большое количество светлых гепатоцитов в периферийных отделах долек. Цитоплазма гепатоцитов базофильная, ядро круглое, расположено в центре клетки, стенки желчных протоков покрыты кубическим эпителием. Маргинальное А-дефицитное состояние (уровень витамина А в сыворотке  $\leq 0,35$  мкмоль/л) сопровождается явлением тотального коликвационного некроза печени. Его гистологической основой является диффузный некроз гепатоцитов с моноцитарными и эозинофильными инфильтратами и сохраненной дольковой структурой печени. В это время на электрофореграммах ДНК появляются гетерогенные за молекулярной массой фрагменты, которые могут быть следствием генетической неустойчивости во время дефицита витамина А. Излишнее употребление витамина А сопровождается избытком (2,50 – 2,70 мкмоль/л) и гипервитаминозом (2,70 – 3,00 мкмоль/л) витамина А в сыворотке, что приводит к токсическим воздействиям ретинола. На препаратах виден некроз перипортальной зоны печени, скопление гепатоцитов, фиброз, особенно вокруг центральной вены, жировое перерождение. Плазмалемма гепатоцитов приобретает мицелярную структуру, внутриклеточные мембраны сливаются, происходит вакуолизация цитоплазмы, разрушение междуклеточных контактов, гипертрофия с последующим распадом эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. Характерно, что повреждение печени витамином А имеет центрлобулярную локализацию, затрагивая гепатоциты перивенозной зоны, что отображает структурную и функциональную неоднородность этого органа. Электрофореграммы ДНК печени крыс в условиях избытка витамина А не

фиксируют достоверных различий между животными с нормой витамина А в сыворотке (1,00 – 2,50 мкмоль/л) и подопытными. В условиях гипервитаминоза на электрофоретической картине появляются гетерогенные фрагменты, которые могут быть следствием некротических изменений печени.

### **TRIP8b: белок-адаптер, взаимодействующий с клатрином**

*Попова Н.В. (Москва, popova@ibch.ru)*

Кальцийнезависимый рецептор латротоксина (CIRL, calcium-independent receptor of  $\alpha$ -latrotoxin или latrophilin) принадлежит GPCR семейству G-белоксопряженных рецепторов (GPCR), имеющих протяженную N-концевую внеклеточную область, включающую структурные домены белков клеточной адгезии. Считается, что эти химерные рецепторы могут быть вовлечены в межклеточные взаимодействия и передачу сигналов, опосредованных G-белками. Но до сих пор для рецепторов данного семейства не найдены природные агонисты. Для выяснения молекулярных механизмов работы CIRL при помощи дрожжевой SR-системы выполнен поиск внутриклеточных белков, взаимодействующих с его цитоплазматическим доменом. Найден один из партнеров CIRL – цитоплазматический белок с несколькими тетраатрикопептидными повторами (TRIP8b), предположительно выполняющий адаптерные функции. Для изучения функциональной роли TRIP8b мы провели поиск белков, которые с ним взаимодействуют, методом аффинной хроматографии экстрактов мозга крысы на иммобилизованном TRIP8b. Методом масс-спектрометрии в элюатах с TRIP8b-Сефарозы были идентифицированы клатрин и субъединицы комплекса AP-2. С помощью укороченных конструкций и многоточечных мутантов TRIP8b, в последовательности этого белка были определены области, отвечающие за взаимодействие с клатрином. Как известно, клатрин и AP-2 участвуют в процессе эндоцитоза активированных рецепторов в составе клатрин-покрытых пузырьков. Выделение таких пузырьков и анализ их белкового состава позволяет находить новые белки, вовлеченные в эндоцитоз. Методом дифференциального центрифугирования была выделена фракция клатрин-покрытых пузырьков. Окрашивание специфичными антителами выявило, что TRIP8b действительно содержится во фракции клатрин-покрытых пузырьков. Полученные результаты позволяют предположить участие TRIP8b в клатрин-опосредованном эндоцитозе. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 06-04-49706а), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология». Автор выражает признательность научному руководителю, д.х.н. А.Г. Петренко за помощь в подготовке тезисов.

### **Изменение структуры фибронектиновой сети зародышей шпорцевой лягушки в ответ на растяжение и релаксацию.**

*Пухлякова Е.А. (Москва, ekaterina24\_87@mail.ru)*

В процессе гастрюляции амфибий направленная миграция мезодермальных клеток происходит по внеклеточному матриксу (ВКМ), который формируется на внутренней поверхности крыши бластоцеля зародыша. Основным компонентом ВКМ является фибронектин. Фибронектин связан с цитоскелетом клетки посредством фокальных контактов. Изменения в структуре цитоскелета передаются на ВКМ, и последний по механизму обратной связи корректирует возникшее клеточное напряжение для достижения соответствующего баланса клеточных сил. Однако существует недостаточно экспериментальных доказательств, подтверждающих существование обратной связи между механическими силами и распределением ВКМ. В работе исследовали влияние внешних механических воздействий (снятие напряжения –

релаксация и растяжение) на динамику распределения фибронектиновой сети. В первой серии экспериментов у зародышей шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis* Daudin) на стадии ранней гаструлы делали сагиттальный надрез на вентральной стороне зародыша и имплантировали сектор гомологичной ткани из зародыша на той же стадии развития. Таким образом, происходило снятие периферических напряжений на эктодерме зародыша. Оперированные зародыши фиксировались от 5 минут до 1 часа после операции. Во второй серии экспериментов у зародышей на стадии ранней гаструлы вырезали крышу бластоцеля и растягивали полученные эксплантаты с помощью стеклянных игл продольно (в передне-заднем направлении) или поперечно и фиксировали образцы через те же временные интервалы. Окраску на фибронектин производили иммуногистохимическими методами и с помощью конфокального микроскопа смотрели, как распределен ВКМ. Оказалось, что фибронектиновый матрикс очень чувствителен к механическому стрессу. Через 45 минут после снятия напряжения фибронектиновая сеть становилась более фрагментированной и гораздо меньшей плотности, чем на интактных зародышах. На искусственно растянутых эксплантатах уже через 10 минут после операции фибриллы фибронектина ориентировались преимущественно по направлению приложенного растяжения. Таким образом, полученные результаты – первые экспериментальные доказательства чрезвычайной механочувствительности фибронектинового ВКМ зародышей амфибий. Мы показали, что уже через несколько минут после механического стресса структура и ориентация фибронектиновой сети сильно изменяется.

#### **Изучение воздействия митохондриально-направленных антиоксидантов на культуры клеток нейробластомы**

*Рыбакова Ю.С. (Москва, julie\_ribakova@yahoo.com)*

Нейробластома относится к эмбриональным опухолям симпатической нервной системы. Нейробласты представляют собой недифференцированные клетки на разных стадиях эмбриогенеза. Есть данные, демонстрирующие, что более высокая степень дифференцировки клеток опухоли коррелирует с более эффективным лечением и лучшим клиническим прогнозом, поэтому исследования, связанные с выяснением механизмов дифференцировки нейробластов играют важную роль (Edsjö et al, 2007). Дифференцировка нервных клеток в культуре проявляется морфологически образованием нервных отростков – дендритов и аксонов. В основе формирования этих структур лежат последовательные перестройки цитоскелета (Welnhoffer et al, 1997). Известно, что активные формы кислорода (АФК) играют роль вторичных мессенджеров во многих сигнальных путях, воздействуют на клеточную пролиферацию, миграцию и выживаемость клеток, а значит способны вносить вклад в процесс канцерогенеза (Агапова и др, 2008). Кроме того, изменение уровня АФК наблюдаются в процессе развития и дифференцировки клеток головного мозга (Tsatmali et al, 2006). Мы исследовали процесс дифференцировки клеток нейробластомы в культуре под воздействием синтетических митохондриально-направленных антиоксидантов. Был проведен анализ морфологически трансформированных клеток культур человеческой нейробластомы SK-N-SH и IMR-32, а также мышинной нейробластомы N-18-1 при инкубации с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ 1 и его аналогами. Изучались реорганизации цитоскелета и скорости роста клеток данных культур. Было показано, что данные вещества способны индуцировать морфологическую дифференцировку клеток нейробластом, выраженную в образовании отростков. С помощью иммуноморфологических методов после инкубации с антиоксидантами в клетках были выявлены маркеры дифференцировки  $\beta$ III- тубулин и нейрофиламенты (200 кД). Методом проточной цитофлуориметрии было выявлено замедление скорости роста клеток под воздействием SkQ 1 и его аналогов. Таким образом, синтетические

митохондриально-направленные антиоксиданты способны вызывать дифференцировку клеток культур человеческой и мышинной нейробластомы. Автор выражает признательность кандидату биологических наук, ст.н.с отдела мат. методов в биологии НИИ им. А.Н. Белозерского МГУ, Дугиной Вере Борисовне за помощь в проведении работы и подготовке тезисов.

**Белок eIF3K как посредник взаимодействия компонентов стрессовых гранул с мотором микротрубочек динеином**

*Саблина А.А. (Москва, sablinaaa@mail.ru)*

Стрессовые гранулы (СГ) являются плотными тельцами, возникающими в цитоплазме эукариотических клеток в ответ на стресс (тепловой шок, окислительный стресс, облучение ультрафиолетом). Они играют важную роль в обеспечении жизнеспособности клеток в критических условиях, поэтому знание механизмов их формирования может быть применено в разработке средств, избирательно направленных против клеток, прошедших злокачественную трансформацию. СГ содержат мРНК, ассоциированные с ней белки, малые субъединицы рибосом и некоторые факторы инициации трансляции. Показано, что микротрубочки необходимы для формирования СГ и играют важную роль в их движении, а также что субъединица К фактора инициации трансляции 3 (eIF3K, eIF3 S12, PLAC-24) взаимодействует с промежуточной цепью моторного белка микротрубочек динеина (DIC). Было высказано предположение, что eIF3K является посредником при связывании с динеином компонентов СГ. В структуру белка eIF3K входит 3 домена: НАМ-домен (HEAT-analogous motif, аминокислотные остатки 1-130), имеющий сходство с доменами, участвующими в белок-белковых взаимодействиях, домен WH (winged helix, остатки 133-188), аналогичный РНК-связывающим доменам, и малоструктурированный С-концевой домен (остатки 191-219). Совокупность доменов НАМ и WH соответствует описанному в литературе домену PCI, который участвует в белок-белковых взаимодействиях, в частности, в составе протеасомы и COP-сигналысомы. В настоящей работе в клетках *HeLa*, обработанных арсенит-ионом (окислительный стресс) иммуноцитохимически выявлены скопления белка eIF3K, по размеру, форме и расположению в клетке напоминающие СГ. Экспрессия слитого с зелёным флуоресцентным белком (GFP) белка eIF3K в клетках *HeLa* угнетается по сравнению с нетрансфицированными клетками вызванное обработкой арсенит-ионом образование СГ, в качестве маркера которых была использована выявляемая иммуноцитохимически большая субъединица фактора инициации трансляции 3 (eIF3A). Это может свидетельствовать о конкурентном вытеснении с сайтов взаимодействия на DIC собственного белка eIF3K клетки, связанного с компонентами СГ, экзогенным белком, не связанным с ними. При одновременной экспрессии в клетке меченных различными флуоресцентными белками eIF3K и маркера стрессовых гранул PABP (polyA-binding protein) первый белок располагается равномерно в ядре и цитоплазме, причём наблюдается некоторое увеличение его плотности в местах расположения СГ. В этом эксперименте PABP, экзогенная экспрессия которого стимулирует образование СГ, практически полностью локализуется в них. Белок eIF3K, лишённый С-концевого домена, проявляет в аналогичном эксперименте паттерн расположения в клетке, сходный с таковым полноразмерного eIF3K. Копреципитация экспрессированной в *Escherichia coli* DIC человека на глутатион-агарозе с экспрессированными в *E. coli* доменами PCI и С-концевым белком eIF3K человека показала, что связывание происходит только в первом случае. Полученные данные указывают на ключевую роль домена PCI и во взаимодействии eIF3K с DIC, и в рекрутинге eIF3K в СГ. Автор выражает признательность к.б.н. П.А. Иванову за помощь в подготовке тезисов.

## **Исследование механизмов воздействия $\alpha$ -токоферилсукцината на клетки культуры эпидермоидной карциномы человека A431**

*Савицкая М.А. (Москва, nakomis@mail.ru)*

Активные формы кислорода (АФК) являются побочными продуктами метаболических реакций, протекающих в клетке. Повышенное образование АФК приводит к повреждению структуры нуклеиновых кислот, липидов и белков. Естественные антиоксиданты корректируют баланс АФК в клетке, поэтому эти вещества часто используются при поддерживающей терапии ряда заболеваний. В последние годы появились данные о том, что некоторые антиоксиданты проявляют противоопухолевые свойства как *in vivo*, так и *in vitro*. Причем данный эффект может быть не связан напрямую с антиоксидантными свойствами этих соединений. Ранее нами было показано, что при воздействии 40 мкМ  $\alpha$ -токоферилсукцината (производного витамина Е) на клетки эпидермоидной карциномы A431 происходит изменения морфологии клеток, а также уменьшается митотический и возрастает апоптотический индекс. Целью данной работы являлось исследование механизмов гибели клеток культуры A431 при воздействии  $\alpha$ -токоферилсукцината (СВЕ). В работе показано, что индукция апоптоза в культуре клеток A431 при воздействии СВЕ опосредована, с одной стороны, выходом цитохрома С в цитозоль, с другой стороны, наблюдается повышенное образование АФК ( $0,81 \pm 0,05\%$  в контроле,  $0,83 \pm 0,09\%$  в контроле с добавлением спирта и  $29,11 \pm 1,5\%$  в опыте). Одним из источников АФК в клетке является цепь переноса электронов в митохондриях. Прижизненное окрашивание митохондрий и электронно-микроскопические исследования при воздействии СВЕ выявили увеличение размеров митохондрий и появление митохондрий нетипичной формы. При этом наблюдаются разные варианты изменения ультраструктуры митохондрий: увеличение числа крист, уплотнение или набухание матрикса, деградация крист. Такая разнородность популяции митохондрий может отражать различные стадии повреждения этих органелл, приводящие к образованию АФК и выходу цитохрома С. Изменение формы клеток, которое предшествует апоптотической гибели при воздействии СВЕ, по-видимому, не связано напрямую с резкими изменениями структуры сети актиновых микрофиламентов и микротрубочек. Однако методом иммуоцитохимии нами показано перераспределение одного из основных белков межклеточных контактов (плакоглобина), который перемещается с мембраны клеток вглубь цитоплазмы, где обнаруживается либо в виде точек, либо в составе везикул. Таким образом, изменение формы, индуцируемое воздействием СВЕ, может быть связано с нарушением межклеточной адгезии, которое сопровождается активным эндоцитозом участков межклеточных контактов. Полученные результаты позволяют предположить, что СВЕ в концентрации 40 мкМ в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека, с одной стороны, вызывает нарушение межклеточных контактов, приводящее к изменению морфологии клеток. С другой стороны, мишенью воздействия являются митохондрии: нарушение процессов дыхания сначала может приводить к компенсаторному увеличению числа крист, затем происходит набухание и деградация митохондрий, сопровождающаяся образованием АФК, выходом цитохрома С в цитозоль и апоптотической гибелью клетки. Работа поддержана РФФИ № 08-04-00750-а, НШ 1861.2003.4

## **Применение 3D культур нейросетчатки в висячих каплях и роллерной установке для исследования поведения стволовых клеток после трансплантации**

*Сергеев С.А. (Москва, embryossa@gmail.com)*

Применение разнообразных моделей, позволяющих исследовать миграцию, дифференцировку и выживаемость клеток привело к продвижению в понимании взаимодействия трансплантатов и тканей реципиента. Одними из наиболее адекватных

модельных систем в таких экспериментах, являются агрегационные культуры нейросетчатки, полученные в условиях роллерного культивирования и методом висячих капель. Используя данные методы, удается не только *de novo* воссоздать из точно известного количества диссоциированных клеток нейросетчатки агрегационные образования, имеющие исходную архитектуру данной ткани, но и длительное время (до 2-х месяцев) поддерживать жизнеспособность большинства клеток полученных агрегатов, а их сокультивирование со стволовыми клетками, позволяет проследить динамику взаимодействий различных клеточных популяций в трехмерной системе. В данной работе нами было проведено сравнение сокультивирования дезагрегированных трипсином клеток нейросетчатки 4-х дневных крыс линии *Campbell* со стромальными клетками костного мозга (МСК) GFP+ мышей линии C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)/Osб/J. Культивирование проводили в стандартных условиях в среде DMEM/F12 с 10% FBS с добавлением EGF и bFGF в течение 30-ти суток в роллерной установке Ротамих РМ-1 при скорости вращения ротора 20 об/мин и в системе висячих капель, объемом 30 мкл на поверхности культурального пластика в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл. На 7-е сутки к сформировавшемуся агрегатам нейросетчатки добавляли суспензию МСК на 3-5 пассажах в концентрации  $200 \times 10^3$ /мл. Было показано образование агрегатов клеток нейросетчатки на 4-е сутки культивирования в роллерной установке и на 2-е сутки в висячих каплях. Очаги клеточной гибели формировались на 7-е сутки культивирования в роллерной культуре, а к 30-м составляли около 20% всей площади агрегата, в то время как в висячих каплях детектировали лишь единичные гибнущие клетки на протяжении всего эксперимента. Была отмечена морфологическая дифференцировка образовавшихся агрегатов с выделением в них слоистой структуры к 7-м суткам в роллерной культуре и к 3-м в висячих каплях с явным отделением ганглиозных клеток от остальной популяции. Процессы образования слоев сетчатки и дифференцировки их клеток у 4-х дневных крыс еще далеки от своего завершения, однако продолжали происходить в обеих культуральных системах до 14 дня, как и *in vivo*. При сокультивировании с МСК происходило внедрение стволовых клеток вглубь слоев агрегата через двое суток и их дифференцировка. В культуре висячих капель МСК занимали преимущественно центральное положение в агрегате в окружении ганглиозных клеток сетчатки, в то время как в роллерной системе располагались диффузно во всех слоях. Аналогично нашим предыдущим исследованиям по инъекции МСК в эксплантационную культуру нейросетчатки, наблюдали сильные морфологические изменения МСК с образованием нейритоподобных отростков данными клетками, приводившие к резкому подавлению их миграционной активности при отсутствии экспрессии характерных маркеров дифференцировки нейронов ( $\beta$ -III-тубулина) и глии (GFAP). Таким образом, предложенная система культивирования в висячих каплях по сравнению с роллерной системой эффективней моделирует процессы взаимодействия трансплантированных стволовых клеток с нейросетчаткой, отличается простотой в использовании и экономичностью расходных материалов.

**Объединение митохондрий кардиомиоцитов в функциональные группы не приводит к выравниванию их мембранного потенциала**

*Смирнова Т.А. (Москва, smirnovatiana@mail.ru)*

Митохондрии в кардиомиоцитах различных животных и в некоторых других клетках объединены посредством специализированных структур – межмитохондриальных контактов. На культуре кардиомиоцитов новорожденных крысят было показано, что при облучении отдельной митохондрии лазерным лучом потенциал сбрасывает как облученная митохондрия, так и все те, кто связаны с ней через цепочку межмитохондриальных контактов, и никакие другие. На основании этого эксперимента до настоящего времени предполагалось, что митохондрии, объединенные

межмитохондриальными контактами, ведут себя подобно нитчатым митохондриям, то есть имеют одинаковый мембранный потенциал. Воздействие луча лазера при этом не нарушает морфологическую целостность облученной митохондрии, и потеря мембранного потенциала объясняется открытием МРТР. При голодании и других воздействиях можно наблюдать самопроизвольные высокоамплитудные изменения величины мембранного потенциала в некоторых типах клеток (включая кардиомиоциты, у которых они могут объединять большое число митохондрий). В этом случае потеря мембранного потенциала также объясняется открытием МРТР. Разумеется, можно предположить, что синхронизация этих изменений в группе митохондрий обусловлена наличием межмитохондриальных контактов между ними. Однако можно привести данные, противоречащие гипотезе об унификации мембранного потенциала митохондрий, объединенных в функциональную группу. Все опыты проводились на культуре кардиомиоцитов новорожденных крысят, так как именно на ней была доказана связь между наличием межмитохондриальных контактов и совместным сбросом митохондриального потенциала при микрооблучении. Чтобы вызвать изменения величины мембранного потенциала, клетки помещались в раствор, лишенный питательных веществ. В этих условиях часто удавалось наблюдать (с использованием потенциал-зависимых красителей TMRE и родамина 123) изменения митохондриального мембранного потенциала. Повторяющиеся перепады потенциала могли затрагивать как отдельные митохондрии, так и различные по численности группы митохондрий. Таким образом, в условиях, при которых возникают самопроизвольные высокоамплитудные изменения мембранного потенциала, за совместным сбросом потенциала нескольких митохондрий следует постепенное его увеличение, которое может происходить асинхронно. Кроме того, митохондрии, совместно сбрасывающие потенциал при лазерном микрооблучении, в некоторых случаях до облучения поддерживали мембранный потенциал, различающийся по величине. Еще один аргумент против гипотезы о функциональном единстве митохондрий, объединенных межмитохондриальными контактами заключается в следующем: в кардиомиоците есть разные по свойствам субпопуляции митохондрий, с контактами между митохондриями разных популяций. Полученные данные позволяют утверждать, что межмитохондриальные контакты не унифицируют митохондриальный мембранный потенциал, но синхронизируют открытие МРТР в группе митохондрий.

**Структурные дезорганизации пигментных клеток личинок *Anura*  
как причина нечувствительности к гормону ритмоводителю – мелатонину**  
*Супруненко Е.А., Молчанов А.Ю. (Москва, suprunenkoe@mail.ru)*

Вопросы геронтологии в наши дни являются одними из наиболее актуальных в современной науке. Считается, что старение есть детерминированный процесс и имеет биологический смысл, выраженный в протективном эффекте от передачи потомству мутантных генов, накапливаемых организмом в течение жизни, и истощением пула стволовых клеток, а, значит, возможностью реобновления функциональных единиц организма. Интересной моделью для изучения подобных механизмов нам представляются процессы, связанные с метаморфозом бесхвостых амфибий, когда в короткие сроки в целом организме происходят значительные структурно-функциональные перестройки, при которых в большинстве систем организма осуществляется смена клеточных популяций. В этом случае период, предшествующий естественной запрограммированной гибели личиночных клеток эквивалентен процессу старения на клеточном уровне. Объектом исследований послужила пигментная система покровов личинок 3-х видов бесхвостых амфибий: *Xenopus laevis*, *Rana temporaria* и *Rana esculenta*. Распределение пигментных гранул (меланосом) в меланофорах в течение суток не одинаково, и колебания степени

дисперсии меланосом имеют строгую ритмику: в ночное время (в темноте) пигментные гранулы преимущественно агрегированы в области перикариона, а в дневное (на свету) – равномерно диспергированы по всей клетке. Основным гормоном-регулятором данных процессов является мелатонин, обладающий меланоцитотонирующей функцией (вызывает агрегацию пигментных гранул). Нами было выявлено, что циркадианные колебания степени дисперсии пигмента в меланофорах, выявляемые в условиях длительной световой депривации, и обусловленные циркадианной ритмикой содержания мелатонина, по мере приближения к метаморфозному климаксу затухают, и клетки проявляют тенденцию к устойчивому диспергированному расположению меланосом. Количество подобных клеток начинает увеличиваться и достигает максимума в момент метаморфозного климакса. При использовании иммуногистохимических методов выявления апоптоза (антитела к фосфатидилсерину Annexin с флуоресцентной меткой Alexa Fluo) и конфокальной микроскопии нами выявлены меланофоры с признаками апоптотических изменений мембраны у личинок, начиная со стадии середины прометаморфоза, что коррелирует с нарушением циркадианных колебаний распределения меланосом. По мере приближения к метаморфозному климаксу число таких клеток возрастает. Однако в клеточном пласте даже в начале метаморфозного климакса встречаются меланофоры, которые не окрашиваются данным красителем. Возможно, что лишь эта небольшая часть пигментных клеток покровов выживает в течение метаморфоза, и может участвовать впоследствии в образовании дермальной пигментной единицы взрослого животного.

### **Закономерности развития трансплантатов эмбриональной нервной ткани во взрослом мозге**

*Сухинич К.К. (Москва, [transpl@hotmail.com](mailto:transpl@hotmail.com))*

Повреждение мозга, возникшее в ходе заболевания или травмы, серьезно сказывается на состоянии всего организма. Ведется поиск эффективного лечения. Одним из перспективных направлений является нейротрансплантация. Замещение поврежденных клеток и восстановление функций может осуществляться с помощью трансплантации клеток из такого источника, как эмбриональная нервная ткань. В ранних работах по трансплантации кусочков эмбриональной нервной ткани исследования проводились с помощью гистологических и электронно-микроскопических методов. С развитием культуральных методов интерес сместился в сторону трансплантации клеточных культур. В то же время отсутствуют работы по трансплантации кусочков эмбриональной нервной ткани, в которых бы использовали современные подходы такие, как использование в качестве доноров трансгенных мышей с экспрессией GFP и метод иммунофлуоресцентного окрашивания. Поэтому целью данного исследования было проведение морфологического и иммуногистохимического анализа переживания аллотрансплантатов эмбриональной нервной ткани мозга мышей 14-ти дневного развития, в клетках которых экспрессируется белок GFP. Методика проведения эксперимента была следующая: кусочек неокортекса 14 дневного эмбриона мыши трансплантировали в мозг взрослого животного по координатам: от брегмы +0,45 мм, латерально 2 мм, 2,5 мм в глубину. Фиксация животных выполнялась через 7 и 30 суток после трансплантации. Мозг извлекали и резали на микротоме с замораживающим столиком. Затем проводили иммуногистохимическое окрашивание антителами против GFAP,  $\beta$ -tubulin-III, Vimentin, NeuN, Neurofilaments, PCNA, Tyrosine Hydroxylase. Через 7 и 30 суток у экспериментальных животных были обнаружены трансплантаты по флуоресценции GFP. Трансплантаты, как правило, имели четкие границы. Наблюдалась миграция единичных клеток из трансплантатов в стриатум, неокортекс. Наиболее обширная миграция была обнаружена вдоль нервных волокон мозолистого тела. Вокруг

трансплантатов выявлялась глиальная реакция, снижающаяся к 30 дням, что было обнаружено при окраске на GFAP. Окраска на GFAP также позволила выявить глиальную дифференцировку клеток трансплантатов как через 7, так и через 30 суток после операции. Через 7 суток в трансплантатах обнаруживаются PCNA-положительные клетки, тогда как на 30 сутки они практически не выявляются, что свидетельствует о снижении пролиферативной активности клеток трансплантата. По окраске на NeuN была выявлена нейрональная дифференцировка на 30 сутки. Также было выявлено вращание волокон и миграция глиальных клеток хозяина в трансплантат. Таким образом, было показано, что трансплантаты успешно переживают до 30 суток, клетки трансплантата мигрируют и дифференцируются в нейрональном и астроглиальном направлениях, реципиент образует связи с трансплантатом. Тезисы доклады основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ №03-04-00031 программы поддержки молодых ученых РАН. Автор выражает признательность к.б.н. Подгорному О.В. за помощь в подготовке тезисов.

**Морфометрический анализ нестабильности атеросклеротических бляшек**  
*Шушкина В.С., Каширина С.В. (Москва, shishkinavalya@mail.ru)*

Сердечно-сосудистые заболевания стоят на первом месте среди причин смертности населения развитых стран. Острые клинические проявления этих заболеваний связаны главным образом с развитием нестабильных (склонных к разрывам) атеросклеротических поражений стенок магистральных артерий. Выявление условного индекса нестабильности атеросклеротических бляшек может служить диагностическим показателем потенциальной предрасположенности бляшек к разрывам. Целью данного исследования была характеристика атеросклеротических поражений сонных артерий человека и определение условного индекса нестабильности атеросклеротических бляшек с помощью метода гистоморфометрии. В рамках комплексного клинического исследования проведена гистоморфометрическая характеристика атеросклеротических поражений, полученных в результате каротидной эндартерэктомии у 7 пациентов с острыми клиническими проявлениями каротидной недостаточности. Биопсийный материал фиксировали в метакарне, обезвоживали и заливали в гистамикс. Гистологические срезы (6 мкм) окрашивали гематоксилин-эозином для общеморфологической оценки, коллагеновые волокна выявляли по методу Ван-Гизона, эластические волокна – окраской орсеином, гликозаминогликаны (ГАГ) – путем окраски альциановым синим, локализацию внутри- и внеклеточных липидов проводили иммуноцитохимически с помощью специфических антител к белку apoB. Клетки в поражениях идентифицировали иммуноцитохимически: макрофаги (МФ) – с помощью специфических антител против антигена НАМ-56, гладкомышечные клетки (ГМК) – с помощью антител против  $\alpha$ -актина. Результаты окрасок оценивали полуколичественно, морфометрические измерения проводили на видеоизображениях препаратов в программе ImageJ. Проводили общую оценку атеросклеротического поражения в соответствии с классификацией ВОЗ, и по классификации Вермани, а также оценивали отдельные его участки (покрышку, атеронекротические ядра, соединительную ткань внутри бляшки, васкуляризацию). Согласно классификации ВОЗ поражения были отнесены к VI (осложненное поражение, 72%), Va (фиброатерома, 14%) и Vb (фиброкальцинозная бляшка, 14%) типам. Согласно Вермани 86% бляшек имели заживающие разрывы, 14% были представлены фиброатеромой. Все поражения были многослойными и содержали от 2 до 4 атеронекротических ядер, причем 79% ядер были некротическими, 14% – липидными и 7% организованными соединительной тканью. Все поражения были в разной степени осложнены отложениями фосфатов кальция, и 86% – заживающими интрамуральными тромбами. Явно выраженные области васкуляризации поражений отмечены в 43% случаев, единичные сосуды в разных областях бляшки – в

72% поражений. Во всех поражениях наблюдали присутствие МФ и ГМК в плечах бляшек, наружных покрышках и внутренней соединительной ткани. Морфометрический анализ показал, что 57% бляшек проявляли тенденцию к истончению и/или разрывам покрышек, что характеризовало их как нестабильные. Путем определения соотношения объемов «мягкой» (атеронекротические ядра и области скопления сосудов) и «жесткой» ткани (наружная покрышка, соединительная ткань бляшки) был выведен условный индекс потенциальной нестабильности атеросклеротической бляшки, который для исследованного материала составил от 0,5 до 2,9. Осложненные атеросклеротические поражения сонных артерий – это комплексные многокомпонентные тканевые образования, предрасположенность которых к разрывам можно оценивать на постоперационных биоптатах с помощью условного индекса нестабильности.

### **Роль малой ГТФ-азы Rho в дифференцировке нейробластомы N18**

*Шумская В.С. (Москва, vashumskaya@yandex.ru)*

Образование нейритов и формирование разветвленной сети нейронов является существенным этапом развития структур мозга. В основе этих процессов лежат внутренние перестройки клеток, базирующиеся на перестройках цитоскелета. Ключевыми регуляторами реорганизации цитоскелета являются белки семейства малых ГТФаз. Исследование роли белка Rho в формировании нейритов и было целью данной работы. Для исследования механизмов этих процессов использовалась модель дифференцировки клеток нейробластомы *in vitro*. Дифференцировка может быть вызвана культивированием клеток в бессывороточной среде. Для выяснения роли малой ГТФазы Rho в процессе дифференцировки N18 мы, с помощью иммунофлуоресценции, исследовали морфологию и цитоскелет клеток N18 до и после обработки ингибитором Rho-киназы – Y27632 в присутствии и в отсутствии сыворотки (FCS) через 72 часа после посадки на субстрат. При культивировании в редкой культуре клетки в присутствии FCS имеют округлую форму и располагаются в островках (по 4-5 клеток), образовавшихся в результате деления. В клетках хорошо видны актиновые пучки, расположенные в виде кольца. Микротрубочки образуют густую сеть в цитоплазме. Аппарат Гольджи располагается в околоядерной области. По всей поверхности клеток заметно большое количество мелких филоподий. По периферии клеток расположены мелкие фокальные контакты (0.5-2.µm). В бессывороточной среде происходит дифференцировка клеток: они изменяют форму и начинают вытягивать отросток, филоподии удлиняются. Для оценки эффективности дифференцировки мы подсчитывали количество клеток, у которых длина отростка превышает длину тела клетки. Таких клеток оказалось 34 %. Кольцевые пучки актина в таких клетках пропадают, но появляются пучки, вытянутые вдоль отростка. Пучки микротрубочек так же проходят в отростки. Аппарат Гольджи из околоядерной области начинает перемещаться в основание отростка. Наряду с мелкими, появляются более крупные фокальные контакты (до 7µm), в основном располагающиеся на конце отростка. Добавление ингибитора Y27632 в среду с сывороткой так же приводит к образованию отростков у 78,5% клеток, 30,5 % из которых имеют несколько отростков. Филоподии становятся ещё крупнее, и их количество увеличивается. Пропадают актиновые пучки, микротрубочки располагаются как в теле, так и в отростке. При добавлении ингибитора Y27632 в бессывороточную среду количество продифференцированных клеток возрастает до 87%, из которых 54% клеток приобретают неопределённую форму с несколькими отростками, густо покрытыми филоподиями. Актиновых пучков и контактов не выявлено. Таким образом, подавление активности Rho приводит к дифференцировке клеток нейробластомы и способствует усилению образования отростков. При этом так же увеличивается количество и размер филоподий, которые, как известно, участвуют во взаимодействии аксона с дендритами соседних клеток. Можно предположить, что регуляция активности Rho играет важную

роль при формировании сети нейронов. Настоящая работа выполнена в рамках проекта РФФИ (грант №08-04-00452).

### **Определения жизнеспособности предимплантационных зародышей после процедуры микроинъекции *in vitro***

*Храмцова Е.А. (Пушино, hramelan@mail.ru)*

После микроинъекции зародыши на стадии бластоцисты механически повреждаются в результате нарушения целостности блестящей оболочки (*zona pellucida*) и плазматических мембран, что впоследствии может приводить к снижению потенциала их развития *in vitro*. Для оценки влияния процедуры микроинъекции на эффективность развития зародышей мы использовали бластоцисты мышей 129/Sv, в полость которых вводили от 2 до 10 нл среды Виттена. Морфофункциональные параметры бластоцист оценивали в динамике их развития в течение 72 ч культивирования в той же среде Виттена. При этом учитывали время и процент бластоцист, вышедших из *z. pellucida*, адгезии и способность бластоцисты формировать колонии, представленные из двух типов клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофобласта. Было показано, что микроинъекция приводит к изменениям морфологии бластоцисты, вызванным механическим и, возможно, осмотическим шоком. Дополнительное введение жидкости, в частности среды Виттена в полость бластоцисты, приводит к уменьшению размеров полости, вплоть до полного ее исчезновения. После этой процедуры бластоциста морфологически напоминает стадию компактной морулы. Общий объем такого зародыша уменьшается на 11-18 %, но 2 ч культивирования более 80 % инъецированных зародышей восстанавливают морфологию до исходного уровня, что свидетельствует о высокой пластичности и репарационной способности, прежде всего, клеток трофобласта, которые участвуют в формировании полости бластоцисты. Согласно нашим данным, микроинъекция является не повреждающей, а стимулирующей процедурой, поскольку прокол или механическое повреждение *z. pellucida* способствует выходу бластоцисты из оболочки, что важно для последующего развития в системе *in vitro*. Нами было показано, что через 24 ч культивирования, инъецированные бластоцисты мыши эффективнее выходят из *z. pellucida*, прикрепляются к поверхности эмбриологической чашки Петри и формируют колонии (75 %) по сравнению интактными бластоцистами, не подвергавшимися процедуре микроинъекции (50 %). Зародыши мыши на этой стадии развития более чувствительны к изменениям осмотичности среды. После 30 мин экспозиции в гиперосмотических условиях (450 mosM) уменьшается их объем на 20 %, теряется способность выходить из оболочки и, как следствие этого – снижается способность бластоцист развиваться в культуре (35-40 % колоний). Таким образом, процедура микроинъекции в полость бластоцисты сбалансированных по солевому составу растворов, в частности среды Виттена, не является травматичной и стимулирует выход из *z. pellucida*, а также последующее развитие до стадии формирования колоний, что может иметь практическое значение при получении из бластоцист мышей первичных линий эмбриональных стволовых клеток – производных ВКМ. Работа выполнена при поддержке гранта НШ-2741,2008,4 «Рецепция сигналов химической и физической природы»

### **Стимулирующее действие бета-эндорфина и бета-эндорфинподобных пептидов на раннее развитие эмбрионов мыши *in vitro***

*Чернов А.С. (Пушино, c.h.e.r.n.o.v@rambler.ru)*

На развитие ранних эмбрионов млекопитающих оказывают влияние множество факторов. Важную роль в процессах клеточного деления и дифференцировки в период эмбриогенеза млекопитающих играют пептидные ростовые факторы. Получено много

данных, подтверждающих большое значение факторов роста и их рецепторов во время дробления клеток и образования бластоцист. Одним из факторов, который может определять нормальное развитие эмбрионов *in vivo*, является бета-эндорфин, который секретируется фолликулярными клетками, окружающими яйцеклетку и клетками эндометрия во время имплантации зародыша в стенку матки. В начале 80-х годов Джулиард и соавт. получили из экстракта плаценты человека фрагмент 364-377 тяжелой цепи IgG (SLTCLVKGIFYPSDI), который имел 50% подобия с центральной частью молекулы бета-эндорфина (10-23). Позднее, в лаборатории пептидных биорегуляторов ФИБХ РАН, г. Пущино, были синтезированы бета-эндорфинподобные пептиды – иммунорфин (SLTCLVKGIFY), и его фрагменты 6-10 – пентарфин (VKGIFY) и циклопентарфин (cycloVKGIFY). Показано, что эти фрагменты являются селективными агонистами неопиоидного (не чувствительного к налоксону) рецептора бета-эндорфина, обнаруженного на клетках иммунной системы, а так же, что иммунорфин ( $10^{-7}$ М) стимулирует раннее развитие зародышей мышей *in vitro*. Поскольку пентарфин и циклопентарфин являются фрагментами иммунорфина, в данной работе было изучено влияние этих пептидов и бета-эндорфина ( $10^{-7}$ М) на развитие 2- и 8-клеточных зародышей мыши *in vitro*. А также было изучено действие бета-эндорфина, пентарфина и циклопентарфина в присутствии блокатора опиоидных рецепторов налоксона, для определения механизма действия исследуемых пептидов. Нами было показано, что все исследуемые пептиды не оказывали отрицательного воздействия на раннее развитие зародышей мыши на всех протестированных стадиях. Пентарфин, бета-эндорфин и циклопентарфин увеличивали жизнеспособность 2- и 8-клеточных эмбрионов, стимулировали деление blastomeres, образование и выклевание бластоцист, по сравнению с контролем. При культивировании ранних эмбрионов в среде с налоксонам, наблюдалось большое количество аномалий, и меньший процент зародышей достигал стадии бластоцисты. Однако добавление налоксона в среду с пентарфином, циклопентарфином и бета-эндорфином не влияло на развитие зародышей. Процесс развития эмбрионов и формирование бластоцист происходил так же хорошо, как и с исследуемыми пептидами. Таким образом, мы предположили, что стимулирующее действие бета-эндорфина, пентарфина и циклопентарфина на ранние зародыши мыши осуществлялось через неопиоидные рецепторы бета-эндорфина. Наиболее активно на развитие ранних эмбрионов действовал циклопентарфин ( $10^{-7}$ М). Кроме того, показано, что в присутствии циклопентарфина наблюдалось ускорение развития зародышей без увеличения количества аномалий. Таким образом, представляется возможным использование бета-эндорфина, а также пентарфина и циклопентарфина, как неспецифических факторов роста, при культивировании ранних эмбрионов млекопитающих для улучшения их качества и повышения жизнеспособности.

### **Исследование механизма подавления роста опухоли и опухолевого ангиогенеза при гиперэкспрессии Т-кадгерина**

*Юрлова Е.И. (Москва, katerina-u48@mail.ru)*

Т-кадгерин – уникальный представитель суперсемейства кадгеринов. Т-кадгерин не имеет трансмембранного и цитоплазматического доменов и заякорен на плазматической мембране через гликозилфосфатидилинозитол (ГФИ). Данные литературы, а также данные, полученные в нашей лаборатории, позволяют предполагать, что Т-кадгерин является ингибитором опухолевого ангиогенеза, также подавляющим рост и метастазирование опухоли. В работе были использованы клетки мышинной меланомы В16F10, стабильно трансфицированные плазмидным вектором, кодирующим ген человеческого Т-кадгерина, и клетки В16F10, трансфицированные контрольной плазмидой. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени проведен анализ уровня экспрессии в контрольных (Т- В16F10) и Т-кадгерин-

гиперэкспрессирующих (Т+ В16F10) клетках мышинной меланомы следующих генов, участвующих в регуляции роста и васкуляризации опухолей: VEGF (сосудисто-эндотелиальный фактор роста), HGF (фактор роста гепатоцитов), PDGF- $\beta$  (фактор роста из тромбоцитов- $\beta$ ), TGF- $\beta$  (трансформирующий фактор роста- $\beta$ ), c-met, тромбоспондин-1, эндостатин. Для сравнительной оценки уровня экспрессии исследуемых генов использовали ген  $\beta$ -актина. В результате количественной оценки уровня экспрессии генов обнаружено, что между Т-кадгерин-гиперэкспрессирующими (Т+ В16F10) и контрольными (Т- В16F10) клетками мышинной меланомы нет достоверных различий по уровню экспрессии таких генов как VEGF, HGF и эндостатина. Однако при гиперэкспрессии Т-кадгерина в клетках меланомы (Т+ В16F10) наблюдается снижение уровня экспрессии PDGF- $\beta$ , c-met и тромбоспондина-1 по сравнению с контрольными (Т- В16F10) клетками. Кроме того, в Т-кадгерин-гиперэкспрессирующих (Т+ В16F10) клетках меланомы наблюдается повышение уровня экспрессии TGF- $\beta$  по сравнению с контрольными (Т- В16F10) клетками. Таким образом, при гиперэкспрессии Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы изменяется профиль экспрессии генов, которые влияют на пролиферацию (TGF- $\beta$ ) и апоптоз (c-met) опухолевых клеток, а также на стабилизацию сосудов, прорастающих в опухоль (PDGF- $\beta$ ). Возможно, что ранее наблюдаемое нами на модели метастазирующей в легкие меланомы у мышей *in vivo* снижение количества стабильных сосудов среднего диаметра, прорастающих в лёгочные метастазы, сформированные Т-кадгерин-гиперэкспрессирующими (Т+ В16F10) клетками меланомы, по сравнению с контролем (Т- В16F10) обусловлено подавлением созревания кровеносных сосудов при гиперэкспрессии Т-кадгерина через сигнальный путь PDGF- $\beta$ , назначением которого является привлечение перицитов к вновь сформированным кровеносным сосудам. Кроме того, гиперэкспрессия Т-кадгерина приводит к увеличению экспрессии TGF- $\beta$  и снижению экспрессии c-met в клетках мышинной меланомы (Т+ В16F10) по сравнению с контролем (Т- В16F10), что, возможно, вызывает снижение выживаемости опухолевых клеток и активирует сигнальный каскад, приводящий к TGF- $\beta$ -зависимой блокировке клеточного цикла и подавлению пролиферации.

Работа выполнена при финансовой поддержке федерального агентства по науке и инновациям, контракт 02.512.11.2222 и РФФИ, грант 08-04-01024-а.