СЕКЦИЯ «БИОЛОГИЯ»

ПОДСЕКЦИЯ «ЦИТОЛОГИЯ»

Новые изоформы белка p150^{Glued}: локализация, тканеспецифичная экспрессия, взаимодействие с микротрубочками

Брянцева София Алексеевна, Жаппарова Ольга Наилевна

студент *аспирант*

Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

sofia.bryantseva@gmail.com

Транспорт различных органелл внутри клетки осуществляется белками динеинами и кинезинами. Динеин в клетках тесно связан с мультипептидным комплексом динактином. Динактин увеличивает длину трека непрерывного движения динеина вдоль микротрубочки (МТ) и служит адаптером для взаимодействия динеина с грузами. Одним из компонентов динактинового комплекса является белок p150Glued, молекула которого содержит участок, отвечающий за связывание с МТ. Белок p150Glued существует в виде двух изоформ: 150 кД изоформа-1 и 135 кД изоформа-2, лишенная первых 143 аминокислот. Анализ нуклеотидных баз данных выявил существование еще двух изоформ p150Glued, отличающихся длиной микротрубочко-связывающей области на N-конце. Короткая изоформа (p150-1B) имеет 20-аминокислотную делецию (131-151амк-т) по сравнению с длинной формой (p150-1A). Методом RT-PCR нами было показано, что короткая изоформа p150Glued-1B является доминантной во всех тканях, за исключением нервной. В нервных тканях, напротив, преобладает длинная изоформа p150Glued-1A, а в тканях ненервного происхождения она отсутствует. Длинная форма присутствует также в культивируемых фиброластоподобных клетках. Целью нашей работы являлось изучение 2х изоформ, их внутриклеточной локализации, тканеспецифичной экспрессии и влияния на радиальность системы МТ. Исследования проводили на культуре клеток эпителия почки зеленой мартышки Vero. При экспрессии в культивируемых клетках длинной или короткой изоформ p150Glued, слитых с GFP, наблюдали различный характер их распределения вдоль МТ: короткая изоформа белка располагалась в клетке в виде «комет» на плюс-концах МТ. Длина этих комет варьировала в зависимости от уровня экспрессии белка, но никогда не наблюдали распределение по всей длине МТ. Среднее значение длины комет при экспрессии короткой формы составило 2,74 +/- 0,18 мкм. Для сравнения, длина комет эндогенного p150Glued, выявленная окраской моноклональными антителами к белку, составила 2.3 +/- 0.2 мкм. Длинная изоформа декорировала МТ по всей длине, независимо от уровня экспрессии, и при высоком уровне экспрессии вызывала образование пучков МТ. Иммунизацией кролика вариабельным участком p150Glued из 20 аминокислот, слитых с GST, мы получили поликлональные антитела, специфично узнающие длинную изоформу p150-1A. Вестерн-блот с лизатами различных тканей, окрашенный этими антителами и моноклональными антителами к p150Glued, подтвердил тканеспецифичное распределение двух изоформ. Иммунофлуоресцентное окрашивание культивируемых клеток Vero поликлональными антителами выявило локализацию длинной изоформы p150-1A на центросоме и по всей длине отдельных МТ, причем окрашивались только некоторые МТ клеток. Для изучения сродства разных изоформ p150Glued к МТ было проведено соосаждение in vitro. Для этого N-концевые фрагменты короткой и длинной изоформ p150Glued инкубировали с МТ и осаждали через глицериновую подушку. Количество p150Glued в осадках и супернатантах анализировали путем белкового фореза и окраски гелей по Кумасси.

Большая часть длинной формы связывалась с МТ, в то время как короткая изоформа присутствовала в осадке трубочек лишь в незначительном количестве. Полученные данные свидетельствуют о функциональном различии изоформ p150, отличающихся длиной микротрубочко-связывающего участка.

Исследование участия элементов цитоскелета в реорганизации половой плазмы на зародышах шпорцевой лягушки

Бакурадзе Р. В. [1]**, Кондукторова В. В.** [2]**, Берекеля Л. А.** [3]
Студент [1], Аспирант [2], к.б.н., ст.н.с. [3]
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия
E-mail: virgo584@yandex.ru

У представителей многих таксонов, также и у шпорцевой лягушки, предшественниками половых клеток – первичных половых клеток – становятся те, что унаследовали половую плазму (ПП) [1]. ПП обнаруживается в созревшем ооците шпорцевой лягушки в виде островков на вегетативном полюсе. В ее состав входят РНК, митохондрии, ЭР и особые (половые) гранулы. Структура половых гранул в составе ПП изменяется в ходе развития. После оплодотворения они мелкие и округлые. Затем на ранних этапах дробления они компактизируются и объединяются в сложные агрегаты, а перед гаструляцией материал ПП из примембранных гранул переходит в околоядерное пространство. Этот момент является ключевым в обособлении линии половых клеток. Вероятно, что в таком перемещении участвуют транспортные системы цитоскелета, основанные на микротрубочках или микрофиламентах. Чтобы исследовать это влияние, мы использовали ингибиторы микротрубочек – колхицин и паклитаксель, а также ингибитор микрофиламентов – цитохалазин Д. Нарушая работу цитоскелета, все они в значительных концентрациях являются летальными для зародышей. Для нас наиболее интересными были сублетальные концентрации ингибиторов, с одной стороны, достаточно большие, чтобы обнаружить их влияние, с другой – не останавливающими развитие зародышей. После подбора такой концентрации зародыши инкубировали в соответствующих растворах ингибиторов. Инкубация производилась в момент, когда материал ПП должен перейти из примембранных гранул в околоядерное положение. В контрольной группе использовались зародыши, неподвергавшиеся воздействию ингибиторов. Затем проводилась in situ гибридизация с маркером половой плазмы (РНК Xpat) и приготавливались гистологические срезы. Результаты при инкубации зародышей в цитахалазине Д, который блокирует полимеризацию актиновых микрофиламентов, были схожи с результатами, полученными в контрольной группе. После инкубации зародышей в паклитакселе наблюдалось сосредоточение материала половой плазмы с одной стороны ядра, т.е. ее неравномерное распределение. Но и нормальное распределение половых гранул было зафиксировано. Известно, что паклитаксель способен блокировать деполимеризацию микротрубочек и, следовательно, нарушать нормальный транспорт. Наконец, при использовании колхицина, блокирующего полимеризацию микротрубочек и, соответственно, нарушающего многие внутриклеточные процессы, во многих образцах материал половой плазмы остался в конденсированном состоянии у клеточной мембраны и не переместился по направлению к ядру. С помощью использованных нами методов показано, что в преобразованиях половой плазмы перед гаструляцией ключевую роль играют микротрубочки. Ингибирование их сборки блокирует распад гранул и переход их материала в околоядерное пространство первичных половых клеток. Однако надо заметить, что наши воздействия приводили лишь к частичным нарушениям функций микротрубочек, но увеличение концентрации ингибиторов являлось летальным для зародышей.

Литература: 1. Берекеля Л. А., Пономарев М. Б., Микрюков А. А., Лучинская Н.Н., Белявский А. В. (2005) Молекулярные механизмы детерминации клеток зародышевого пути у животных // Мол. биол. Т.39. №4

Ультраструктура кардиомиоцитов левого желудочка сердца крыс при реперфузионном повреждении.

Вареник Евгения Николаевна
студентка 5 курса
МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва
evvalussia@rambler.ru

Реперфузия широко применяется в практической медицине для лечения инфаркта миокарда. При этом, на сегодняшний день ещё не показано, что положительное влияние реперфузии превалирует над её отрицательным воздействием. Поскольку известно, что ответная реакция сердца на нарушение кровоснабжения варьирует в зависимости от возраста, то целью данной работы является исследование миокарда молодых (возраст 3-4 месяца) и старых крыс (возраст – более 1,5 лет) в условиях ишемии (перевязка левой нисходящей коронарной артерии по методу Селье) и последующей реперфузии. Изучены следующие группы молодых (м) и старых (с) животных: «К» - миокард интактных животных, «И-Р» - миокард животных после 2,5ч ишемии и 3суток реперфузии, «И-Р+См» - как «И+Р» с введением семакса – гептопептида с противоишемическим действием (внутрибрюшинно в дозе 150 мкг/кг в объеме 0.1 мл в день операции два раза - через 15 мин и 2 часа 15 мин после операции). Анализ ультраструктуры кардиомиоцитов проводился методом трансмиссионной электронной микроскопии на микроскопе Jem-100C. Электронномикроскопический анализ группы К(м) не выявил отличий структуры отдельных органелл и клеток в целом от ранее описанных в литературе нормальных кардиомиоцитов. При этом в группе К(с) морфология основных органелл клеток отличается от группы К(м). Ядро смещено к почке. Большинство ядер имеют извилистые границы. Встречаются ядрышки относительно крупных размеров. Помимо нормальных митохондрий встречаются слабо конденсированные и сильно набухшие. Миофибриллы расположены как в клетках молодых животных, однако изо- и анизотропные диски выражены слабо. Помимо вышеописанных структур во всех зонах клеток содержится большое количество миелиноподобных телец, гранул гликогена, встречается липофусцин. В группе И-Р(м) для подавляющего числа клеток характерно извилистое ядро с большим числом глыбок гетерохроматина. Митохондрии, как правило, слабо конденсированные с электронноплотными гранулами в матриксе и внутрикристными уплотнениями. Встречаются разволокнённые миофибриллы, также есть миофибриллы с нечётко выраженной Z-полоской и размытыми границами дисков. Вакуолярная система расширена. Во всех зонах кардиомиоцитов заметны многочисленные липидные капли разного размера. Морфология кардиомиоцитов в группе И-Р(с) отличается от К(с). Ядра содержат светлый эухроматин и малое количество пристеночного гетерохроматина. Размеры митохондрий резко отличаются, встречаются длинные митохондрии. Для группы И-Р+См(м) характерна гетерогенность ядер: встречаются ядра с нормальным хроматином но, при этом границы ядер варьируют от ровных до изрезанных, и ядра с ровными границами, но глыбками уплотнённого хроматина в толще ядра. Митохондрии с электронноплотными гранулами в матриксе и внутрикристными уплотнениями, большое число слабоконденсированных митохондрий. Миофибриллы в основном с не чётко выраженными границами изотропных и анизотропных дисков. Встречаются полосы пересокращения. В большом количестве встречаются миелиноподобные тельца. Вакуолярная система незначительно расширена. Встречаются отёки гиалоплазмы. В группе И-Р+См(с) ядра с просветлённой нуклеоплазмой. Митохондрии с электронноплотными гранулами в матриксе и внутрикристными уплотнениями. Много полос пересокращения в миофибриллах. Эксперименты проводятся совместно с

сотрудниками кафедры нормальной и патологической физиологии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В.Ломоносова.

Экстракт пигментного эпителия сетчатки тритона стимулирует пролиферацию клеток в пигментном эпителии сетчатки крысы

Ганчарова Ольга Сергеевна, Килина Ольга Валерьевна
студентка третьего курса, аспирантка третьего года
Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: olgancharova@gmail.com

Введение. Некоторые хвостатые амфибии могут восстанавливать функционирующую сетчатку глаза после ее повреждения или удаления. Регенерация сетчатки у тритонов происходит за счет трансдифференцировки клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), процесса, в ходе которого клетки эпителиального типа превращаются в нервные клетки. Сетчатка глаза млекопитающих, однако, не обладает столь выраженным регенеративным потенциалом. По этой причине дегенеративные заболевания сетчатки глаза млекопитающих, в том числе человека, неминуемо приводят к прогрессирующей потере зрения и в конечном счете – к слепоте. Тем не менее, существуют данные, которые указывают на присутствие некоторого регенеративного потенциала и в сетчатке высших животных [1]. В настоящей работе мы попытались ответить на вопрос, способен ли экстракт ПЭС тритона вызвать регенеративные процессы в сетчатке млекопитающих. Для получения экстракта препараты ПЭС тритона помещали в пробирку, содержащую экстрагирующий буфер [3], и растирали стеклянной палочкой для разрушения клеток ПЭС. Препараты заднего сектора глаза (склера-хороид-ПЭС без нейральной сетчатки), взятые от шести взрослых (2-3 мес.) крыс-альбиносов линии Wistar, культивировали в течение 10 дней на роллере (скорость вращения 60 об/мин) при 37ºС в среде DMEM с добавлением фетальной сыворотки крови [2] в присутствии экстракта ПЭС тритонов (опытные пробы) или без него (контроль). По окончании культивирования часть препаратов подвергали гистологической обработке с окрашиванием гематоксилином и эозином. Результаты. Гистологическое исследование полученных препаратов показало, что добавление экстракта ПЭС тритона в среду культивирования вызвало существенные изменения морфологии слоя ПЭС и хороида в составе заднего сектора глаза крысы. Так, ПЭС крысы в опытных пробах приобрел многорядный фенотип, число клеток в слое ПЭС значительно увеличилось, и в нем выявлялись картины митозов. В то время как ПЭС в контроле оставался монослойным, и митозы в нем отсутствовали. В процессе культивирования опытных препаратов (добавлен экстракт ПЭС тритона) хороид в составе заднего сектора глаза крысы сохранял нормальную морфологию, тогда как в контрольных пробах слой хороида истончался и количество клеток в нем снижалось. В настоящее время нами ведется иммуногистохимическое исследование описанных препаратов и определение состояния дифференцировки составляющих их клеток. Выводы. Экстракт ПЭС тритона стимулирует пролиферацию клеток ПЭС в составе заднего сектора глаза крысы, что, предположительно, можно объяснить эффектом ростовых факторов, присутствующих в упомянутом экстракте. ПЭС, в норме однослойный, приобретает под действием экстракта многорядный фенотип, что свидетельствует о запуске механизмов трансформации клеток ПЭС. На следующем этапе нашей работы будет проведена идентификация факторов, присутствующих в экстракте ПЭС тритона и ответственных за обнаруженные нами эффекты экстракта на состояние и морфологию ПЭС и хороида в составе заднего сектора глаза крысы.

Литература: 1. Engelhardt M. et al. Brain Research. 2005;1040:98-111. 2. Григорян Э.Н. и др. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2007;4:207-215. 3. Маргасюк Д.В. и др. Офтальмология. 2005;3:81-87.

Морфогенез микроспор в культуре пыльников in vitro подсолнечника.

Костина Екатерина Евгеньевна
молодой ученый
Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова
bio@sgau.ru, kostinaee@yandex.ru

Для подсолнечника технология получения гаплоидов методом андрогенеза in vitro представляется перспективной, но на данный момент слабо разработана. Получаемые растения-регенеранты, обычно соматического происхождения [2,3]. Целью данной работы являлось изучение морфогенеза микроспор в культуре пыльников in vitro подсолнечника. Для инокуляции пыльников корзинки стерилизовали, цветки вычленяли из край-них внешних рядов корзинки. Пыльники помещали на питательную среду MS, с различ-ными вариантами содержания фитогормонов и сахарозы. В течение месяца через каж-дые 5 суток цитологически оценивали состояние микроспор. Установлено, что культивирование тетрад не ведет к дальнейшему морфогенезу. Даже в случае распада тетрад на отдельные микроспоры они продолжали оставаться од-ноядерными, причем ядро занимало весь объем клетки, а оболочка оставалась тонкая без шипиков. Известно, что микроспоры, инокулированные in vitro в премитотической стадии, могут развиваться по нормальному и аномальному пути развития [1]. В соответствии с этим, были обнаружены двуядерные клетки с мелким и крупным ядром (предположительно – это вегетативное и генеративное ядра), а также трехядерные клетки с одним крупным (предположительно, вегетативным) и двумя мелкими (генера-тивными) ядрами. Оболочка таких микроспор утолщалась, и образовывались шипики, то есть формировалось нормальное пыльцевое зерно. В других случаях наблюдали равное деление ядра в нескольких вариантах 2 крупных ядра, 2 мелких, с образованием клеточной стенки или без нее, дробление одного из двух образовавшихся ядер, в том числе образование каллусоподобных структур, в исключительных случаях формировались многоядерные клетки. Основная масса микроспор сохраняла жизнеспособность, оставалась одноядерной, происходило существенное утолщение клеточных стенок, вплоть до изменения геомет-рии внутреннего пространства клеток. Проведенные цитологические исследования показывают, что в культуре пыльни-ков подсолнечника в микроспорах могут протекать морфогенетические процессы с не-которой частотой. Видимо, принципиально возможно получение гаплоидных структур и регенерантов in vitro из микроспор у подсолнечника. Причем, скорее всего, развитие может происходить по пути образования каллуса. Изученные варианты гормонального состава и концентрации сахаров на образова-ние двухядерных и многоядерных микроспор не оказали. Сочетание гормонов 6 БАП и 2,4 Д при концентрации сахаров и 60 и 90 г/л способствовало каллусогенезу из сомати-ческих тканей пыльников и элементов цветка.

Литература: 1. Круглова Н.Н. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас – М.: Нау-ка, 2005. – 99 с. 2. Нгуен Тхань Хай Экспериментальный морфогенез в культуре изолированных кле-ток и тканей подсолнечника (Helianthus annus L.) / Известия ТСХА – 2007. – выпуск 2, –С. 116-124. 3. Носова Н.Н., Тучин С.В. Морфогенетические процессы в культуре микроспоро-филлов подсолнечника / Сельскохозяйственная биология – 1988. – №4. – С. 72-74.

«Поиск и захват»: молекулярные основы динамического взаимодействия микротрубочек с мембранными органеллами

Ломакин Алексей Юрьевич[1,2], *Семенова Ирина Анатольевна*[2], *Надеждина Елена Сергеевна*[1], *Ахманова Анна Сергеевна*[3], *Родионов Владимир Иванович*[2]
аспирант
[1]*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
[2]*University of Connecticut Health Center, Farmington, CT, USA*
[3]*Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands*

Клеточные микротрубочки (МТ) характеризуются уникальным свойством – динамической нестабильностью – их плюс-концы, обращенные к периферии клетки, постоянно находятся в состоянии случайно чередующихся фаз роста-укорочения и пауз. Для объяснения биологической целесообразности этого феномена была предложена модель «поиска и захвата»: во время событий роста и укорочения, плюс-концы МТ получают возможность «нащупать» в пространстве клетки мишени, подлежащие активному транспорту вдоль МТ, или мишени, движение которых, непосредственно связано с динамикой плюс-концов МТ. Классическим и хорошо изученным примером «поиска и захвата» является взаимодействие плюс-концов МТ с кинетохорами хромосом в митотических клетках, однако эпизоды «поиска и захвата», а также механизмы их обеспечивающие, в интерфазных клетках изучены значительно хуже. В настоящей работе мы попытались выяснить вопрос о необходимости «поиска и захвата» при взаимодействии динамичных МТ с мембранными органеллами, которые должны быть транспортированы в направлении минус-конца МТ посредством цитоплазматического динеина. В качестве клеточной модели для наших экспериментов, мы использовали культивируемые меланофоры *Xenopus laevis*, цитоплазма которых обогащена пигментными гранулами (ПГ) – мембранными пузырьками, наполненными черным пигментом, меланином. В ответ на различные внеклеточные стимулы, меланофоры способны быстро перераспределять свои ПГ в объеме цитоплазмы, за счет работы молекулярных моторов, транспортирующих ПГ по цитоскелетным трекам. Видеонаблюдения за совместным поведением индивидуальных МТ и ПГ в меланофорах, в которых был искусственно активирован динеин-зависимый транспорт, позволили зарегистрировать взаимодействия между плюс концом МТ и ПГ. МТ подрастала к неподвижной ПГ, контактировала с ней своим плюс-концом, в результате такого контакта ПГ оказывалась заякоренной на МТ и приступала к перемещению в направлении минус-конца МТ. Ингибирование же динамики МТ с помощью таксола в низких концентрациях, исключало такие взаимодействия и резко снижало эффективность минус-концевого транспорта ПГ. Каковы же молекулярные механизмы взаимодействия плюс-концов МТ с ПГ? Наиболее вероятными кандидатами на роль «коннекторов» между плюс-концом МТ и ПГ, являются белки, специфически связывающиеся с плюс-концами микротрубочек (+TIPs). Попеременное блокирование функций основных белков этой группы (EB1, p150Glued, CLIP-170, Lis1), позволило нам выявить роль CLIP-170, который был впервые открыт как белок, связывающий микротрубочки с мембранами (Cytoplasmic Linker Protein, 170K). Мы показали, что диссоциация эндогенного CLIP-170 с плюс-концов МТ на фоне эктопической экспрессии доминантно-негативной формы белка исключает взаимодейсвия растущих концов МТ с ПГ и ингибирует их динеин-зависимый транспорт. Более того, CLIP-170 биохимически обнаруживается в составе ПГ, выделенных из меланофоров. Известно, что благодаря N-концевому домену CLIP-170 взаимодействует с плюс-концами МТ, а его С-концевой домен экспонирует множественные участки для белок-белковых взаимодействий. Вероятно, именно благодаря С-концевому домену ассоциированный с МТ CLIP-170 устанавливает связь с ПГ. Таким образом, наши данные свидетельствуют о

необходимости механизма «поиска и захвата» для инициации динеин-зависимого транспорта мембранных органелл.

Изучение компонентов ядерного белкового матрикса в ядрах Бальбиани вида Chironomus plumosus

Макаров Максим Сергеевич
Студент
Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия
e-mail: mcsimmc@yandex.ru

Ядерный белковый матрикс (ЯБМ) является важным компонентом клеточного ядра. Он участвует в поддержании структуры хромосомы и ее локализации в ядре, а также взаимодействует с активными районами ДНК в интерфазной клетке. Одной из форм интерфазных ядер являются гигантские ядра Бальбиани слюнных желез двукрылых, содержащие гаплоидный набор морфологически различимых хромосом. Эти хромосомы образуются в результате конъюгации гомологичных хроматид в ходе их многократной эндорепликации и потому называются политенными. Они имеют исчерченный вид: темные полосы- диски - районы конденсированного хроматина и светлые - междиски. В отличие от митотических хромосом, политенные хромосомы представляют собой активно функционирующие структуры. Несмотря на весьма подробную изученность политенных ядер и их негистоновых компонентов в частности, до сих пор не удавалось определить влияние негистоновых белков на строение политенных хромосом внутри целого, не разрушенного ядра. Цель работы - изучить роль негистоновых белков в поддержании структуры политенных хромосом. В работе использовались ядра Бальбиани из слюнных желез *Chironomus plumosus*, которые подвергались стандартной обработке по выявлению ЯБМ по [1]. Так же исследовалось влияние гипертоничных растворов. Для окраски объекта применяли краситель Кумасси, краситель DAPI, антитела к ламину B1. Удаление гистона H1 не приводит к потере исчерченной структуры хромосомы. Удаление всех гистонов приводит к исчезновению тела хромосомы, которое можно восстановить путем длительной обработки 3 mM Ca2+. Предварительная обработка ДНКазой приводит к потере тела хромосомы и беспорядочному распределению дисков. Стандартная методика получения ЯБМ не позволяет выявить данную структуру на светооптическом уровне. Однако добавление Ca2+ после каждого акта экстракции гистонов позволяет наблюдать тело хромосомы с остатками исчерченности даже после удаления ДНК. Ламины располагаются почти по всей поверхности ядра, подстилая при этом хромосомы. Гистон H1 не является необходимым для поддержания исчерченной структуры хромосомы. Для подержания структуры хромосомы в изотоничных условиях необходим полный набор гистонов. 3 mM Ca2+способствует конденсации хроматина и сохранению тела хромосомы. Ламин B1 взаимодействует с некоторыми районами политенных хромосом.

Литература: 1. Berezney R., Coffey D.S. The nuclear protein matrix: Isolation, structure and function/ J. Cell. Biol.1977. Vol73. P. 616-637.

Регенерация сперматогенного эпителия у старых ускоренно стареющих мышей SAMP1 (senescence-accelerated mouse prone) после мутагенного воздействия

Малолина Екатерина Андреевна
студент
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия
E-mail: kate-malolina@mail.ru

Мутантные короткоживущие мыши линии SAMP1, средняя продолжительность жизни которых составляет 9.9 мес., представляют собой удобную модель для изучения механизмов старения клеток и тканей. Эти исследования приобретают тем больший интерес, что одной из характеристик тканевых систем у мышей этой линии является высокий уровень генетической нестабильности, что позволяет изучать зависимость темпа и полноты регенерации от ее уровня. Одним из показателей устойчивости систем является способность их сравнительно легко и быстро восстанавливаться после действия повреждающих факторов различной природы. Целью данной работы стало изучение процессов восстановления сперматогенеза у старых 9−10-месячных мышей SAMP1 после мутагенного вмешательства. Подопытным мышам однократно внутрибрюшинно вводили химический мутаген дипин в генетически активной дозе 30 мг/кг, контрольным животным также однократно внутрибрюшинно инъецировали по 0.2 мл физиологического раствора. Забой животных проводили путем дислокации шейных позвонков на 14, 28 и 56 сут после начала эксперимента. Реакцию сперматогенной системы мышей SAMP1 на действие дипина изучали с помощью количественного, гистологического и цитогенетического методов. Количественный анализ показал, что в отличие от контроля у подопытных мышей SAMP1 на 14 и 28 сут фиксации число мейотических и постмейотических клеток, но не сперматогониев, существенно снижается. Морфогистологические наблюдения, в свою очередь, выявили многочисленные структурные нарушения в организации сперматогенного эпителия. Причем наиболее разрушительно эффект дипина проявился на 28 день фиксации. Однако уже через 4 нед после этого (56 день последействия) в большинстве семенных канальцев подопытных мышей картина сперматогенеза практически не отличалась от таковой у контрольных животных. Между тем в опыте цитогенетический подход с использованием метода учета микроядерных аберраций выявил в популяции сперматогониев и округлых сперматид высокий процент клеток со следами хромосомных поломок. По частоте встречаемости число генетически аберрантных клеток статистически значимо превышало уровень спонтанного хромосомного мутагенеза, свойственный мышам с ускоренным старением. Итак, полученные данные свидетельствуют о том, что усиление генетической нестабильности в одном из источников регенерации − стволовых сперматогониальных клетках − проявляющееся в образовании большого числа мутантных клеток на отдаленных сроках последействия, не влечет за собой необратимой деградации сперматогенного эпителия. Его восстановление в гонадах старых мутагенезированных мышей SAMP1 протекало вполне нормально. Интересно также отметить, что наши наблюдения хорошо согласуются с результатами аналогичного исследования, выполненного ранее на модели сперматогенеза молодых 3−4-месячных ускоренно стареющих мышей линии SAMP1.

Выявление ядрышек в интактных лимфоцитах периферической крови у овец

Мачкаева Наталья Тухтаровна[1]
ассистент, кандидат биологических наук
Калмыцкий государственный университет, Элиста, Россия
E–mail: bio@kalmsu.ru

Исследованиями установлено широкое распространение в пределах видов полиморфизма ядрышкообразующих районов, затрагивающее число, размеры и морфологию ядрышковых организаторов [2]. Произведено цитохимическое обследование овец в ходе, которого изучено число ядрышек для оценки у животных активности рибосомных генов 18S/28S. Для исследования было отобрано по 10 овец пород советский меринос, калмыцкая и каракульская. Изучали число активных ядрышек окрашенных серебром ядрышек в лейкоцитах и клетках лимфоцитарного ряда циркулирующей крови. В основу получения, окраски и анализа препаратов клеток белой крови овец были положены стандартные методы и их различные модификации, описанные в ряде специальных руководств [1,3]. В результате исследований нами было установлено существование достоверных различий по признакам, характеризующим активность ядрышковых организаторов у исследованных пород овец. При этом оказалось, что максимальная доля клеток, содержащих окрашенные азотнокислым серебром ядрышек, выявлена у овец породы советский меринос. Далее следуют овцы каракульской и калмыцкой пород. По среднему числу ядрышек на окрашенную клетку породы были распределены следующим образом: советский меринос, калмыцкая и каракульская. У овцы ядрышковые организаторы связаны с пятью кластерами р-генов, расположенных терминально на коротких плечах 1 пары, длинных - плеч 2 и 3 пар и акроцентрических хромосом 4 и 25. У овец практически все клетки несут окрашенную серебром метку. Число активных ядрышковых организаторов колеблется от 1 до 10. В среднем на окрашенную клетку приходится 2,64 ядрышка. В результате исследований было установлено, что число активных ядрышковых организаторов в лимфоцитах видоспецифично и коррелирует с числом кластеров р-генов у исследуемых видов. Следовательно, метод окраски ядрышковых организаторов в интактных лимфоцитах азотнокислым серебром может быть использован для оценки функционирования генов 18S/28S - рРНК у домашних животных.

Литература: 1. Графодатский А.С., Раджабли С.И., Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных животных. Атлас.- Новосибирск: Наука. – 1988.-127 с. 2. Кленовицкий П.М., Завада А.Н., Живалев И.К., Некрасов А.А. Ядрышкообразующие районы у трансгенных свиней // Генноинженерные сельскохозяйственные животные/ Сб. науч. Тр.- 1995. Вып. 1. 3. Кленовицкий П.М. и др. Использование прикладных программ обработки изображений, совместимых в Windows, в цитогенетических исследованиях. – Дубровицы: ВИЖ.- 2002.

[1] Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Кленовицкому П.М. за помощь в подготовке тезисов.

Исследование кариотипа *Iris sibirica* L.

Муратова Эльвира Ахатовна
аспирант
Ботанический сад-институт Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия
E-mail: elvira-murka@yandex.ru

Iris sibirica L. растет на пойменных, болотистых и лесных лугах, по лесным опушкам от таежной до теплоумеренной зоны Европы, Кавказа, Западной и Средней Сибири. Охраняемый редкий вид, включен в Красные книги многих регионов России. Декоративен. Отвар листьев используют при болезнях сердца и как ранозаживляющее. Целью данной работы является исследование кариотипа *Iris sibirica* L. Развертывание кариологических исследований необходимо для сравнительной кариологии, понимания эволюции кариотипов организмов. Анализ структуры кариотипов позволяет использовать эти данные в ботанической кариосистематике и филогении растений. В качестве материала для исследований нами использованы семена *Iris sibirica* L.,произрастающего на коллекционном участке Ботанического сада-института УНЦ РАН. Кариологический анализ проведен по методике З.П. Паушевой [3]. Материал изучен в масляной иммерсии с использованием микроскопа БИМАМ-Р13. В результате исследований выявлено число хромосом, установлены морфометрические параметры и определены типы хромосом [4]. Результаты исследований метафазных пластинок *I. sibirica* L. показали, что у данного вида насчитывается 28 хромосом (рис.1), что соответствует данным предыдущих авторов [1,2,5]. Размеры хромосом находятся в пределах 1,05 - 3,98 мкм. Хромосомный набор состоит из 5 пар метацентрических, 2 пар субметацентрических и 7 пар субакроцентрических хромосом.

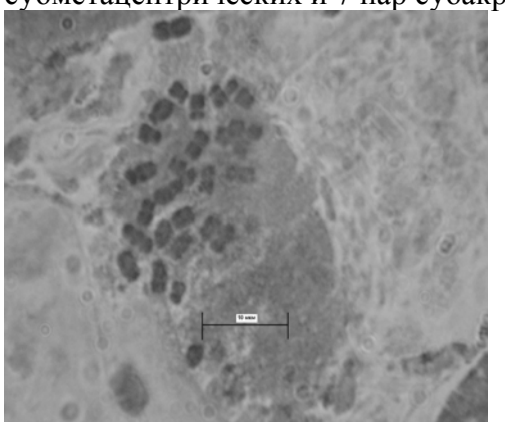

Рис 1. Хромосомы метафазной пластинки *I. sibirica* (2n=28)

Литература: 1. Матвеева Т.С. Полиплоидные декоративные растения. Однодольные. Л., 1980. 300 с. 2. Парфенов В.И. Обусловленность распространения и адаптация видов растений на границах ареалов. Минск, 1980. 205с. 3. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М., 1980. 304 с. 4. Levan A., Fredga K Sandberd A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes // Hereditas, 1964, Vol. 52, №2. P. 201-220. 5. Köhlein F. Iris. Ulmer, 1981. 360 p.

Влияние стабильного изотопа 25Mg на прорастание спор и развитие протонемы зеленого мха *Hyscomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.

Осташева Н.В., аспирант.

Московский Государственный университет, Биологический факультет, кафедра эмбриологии, Москва, Россия

E–mail: **mrrr@nm.ru**

Хорошо известно, что объекты живой природы избирательно фракционируют изотопы из внешней среды. Изотопное отношение сдвинуто (относительно превращаемого субстрата) у автотрофов в сторону легкого изотопа, в то время как у гетеротрофов, напротив – в сторону тяжелых изотопов. Обычно эти феномены объясняют кинетическими и термодинамическими изотопными эффектами, пренебрегая спецификой организации собственно живой системы. В последние годы убедительно показана роль ядерно-магнитного изотопного эффекта в кинетике химических и биохимических процессов, что позволяет просто и изящно объяснять поразительные превращения, осуществляемые в живом веществе [1]. Сведения о влиянии обогащения внешней среды тем или иным стабильным малораспространенным изотопом немногочисленны, фрагментарны и противоречивы. Ниже представлены данные о влиянии изотопа 25Mg, добавленного в адекватной концентрации (т.е. соответствующей стандартной концентрации природного магния) в твердой агаровой среде культивирования. Сульфат 25Mg во внешней среде существенно (в 2,5 – 3 раза) снизил численность проросших спор, затормозил (почти вдвое) темп развития проросших протонем. Культура прекращает развитие задолго до исчерпания питательных ресурсов в среде. Описанное влияния обогащения среды изотопом магния представляется парадоксальным в свете данных о существенном повышении выхода АТФ на последних этапах окислительного фосфорилирования в системе in vitro с введенным в реакционную среду 25Mg [1].

Литература: 1. Бучаченко А. Л. (2007) Новая изотопия в химии и биохимии. М.: Наука, 189 с.

Структурно – функциональный гомеостаз плаценты при нормально протекавшей беременности, хламидиозе и смешанной инфекции

Перетятько Ольга Викторовна

студент

Сибирский федеральный университет, институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Красноярск, Россия

E-mail: peretyatkoolga@mail.ru

Небывало широкое распространение заболеваний, передающихся половым путем, заставляет медиков и правительства разных стран задумываться о здоровье молодого поколения. Заболевание половых путей, вызываемое внутриклеточным паразитом — хламидией — отличается скрытым, бессимптомным течением, трудностью диагностики и лечения, а также очень высокой контагиозностью. Риск возникновения врождённых пороков особенно велик в эмбриогенезе и органогенезе. Взаимная связь поражений последа и инфекции несомненна, учитывая роль плаценты, как органа барьерного типа. Объектом исследования служили плаценты, полученные от родильниц с нормальной и осложнённой хламидиозом и смешанной инфекцией беременностью. Нормальный и патологический морфогенез плаценты к окончанию гестации имеет определенный набор гистологических признаков, которые целесообразно оценивать в трех зонах (центральной, парацентральной, краевой). На препаратах определяли удельный объем (%) различных компонентов плаценты, используя стереометрическую сетку Г.Г. Автандилова, вмонтированную в окуляр микроскопа. Дополнительно морфометрию проводили методом линейных измерений при прямом микроскопическом исследовании с помощью окуляра – микрометра. В ходе исследования были сформулированы следующие выводы. Морфофункциональное состояние плаценты характеризуется выраженной динамичностью, обусловлено комплексом морфологических признаков и находится в тесной связи с компенсаторно – приспособительными реакциями в норме и патологии. Структурный гомеостаз плаценты при не осложненной беременности имеет принципиально единую организацию, но в тоже время изменяется на протяжении. При хламидиозе резко снижены диаметр, объем, и площадь капилляра, количество капилляров (в 3 раза) и их общая площадь в концевых ворсинах (в 2,34 раза по сравнению с контролем) особенно в парацентральной зоне плаценты, возрастает объем микропоражений и снижается количество синцитиокапиллярных мембран концевых ворсин особенно в краевой зоне. В парацентральной зоне наиболее активно идут компенсаторные процессы, сопровождающиеся увеличением количества синцитиальных почек, основного вещества и волокон. Наблюдается увеличение количества децидуальных клеток в базальной пластинке и септах и объёма их ядер. При смешанной инфекции на фоне слабого кровоснабжения, за счет снижения объема сосудов (в 3,5 раза), диаметра, площади капилляра и капиллярного русла в концевых ворсинах (в 6 раз), количества синцитиокапиллярных мембран, отмечается повышенная активация компенсаторно – приспособительных реакций, в виде увеличения объёма синцитиальных почек и основного вещества, а также увеличения объёма ядер и количества децидуальных клеток септ на 1 мм^2.

Количественная томография раннего эмбриона мыши в условиях осмотического шока: 3-D реконструкция и LSM

Погорелова Мария Александровна [1,2], Голиченков Владимир Александрович[1], Погорелова Валентина Николаевна [2]

аспирант; зав. каф. эмбриологии, д.б.н., профессор; с.н.с., к.б.н.

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия, [2]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

E-mail: pogm2007@rambler.ru

Изменение объема клетки и механизмы, индуцированные этим фактором, играют ключевую роль в регуляции ряда функций: синтез белков, клеточная смерть, экспрессия генов, выброс гормонов, пролиферация. В ткани межклеточная среда сохраняет постоянные характеристики, точные значения которых, тем не менее, остаются неизвестными. Для автономных клеточных систем, например, изолированного раннего эмбриона млекопитающих, поддержание интактного объема бластомера in vitro трудно выполнимо. Это обусловлено отсутствием подходов для количественного контроля влияния внеклеточной среды на объем отдельной эмбриональной клетки. На основе метода freeze-drying разработана технология, которая обеспечивает сохранение интактной формы (объема) эмбриона. Осмотический шок моделировали изменением концентрации NaCl в среде инкубирования. Серию последовательных оптических срезов объекта получали посредством лазерной сканирующей микроскопии (LSM). Количественные характеристики компартментов эмбриона рассчитывали на основе его 3-D реконструкции. Полученные данные показывают, что при длительной гипотонии начальное набухание бластомера носит обратимый характер. Используемые в эксперименте гипертонические условия приводят к необратимому сжатию эмбриональной клетки. Анизотонические условия индуцируют также качественную трансформацию ее формы. Полученные количественные данные согласуются с качественными эффектами, которые наблюдали визуально в экспериментах in vitro. Отметим, что разработанная технология количественной томографии раннего эмбриона мыши позволяет проводить измерения объема других объектов, сравнимых с ним по величине.

Малые дозы гиббереллиновой кислоты индуцируют нарушение митоза и апоптоз в культуре клеток карциномы человека А431.

Саблина Анна Александровна
Студент
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия
E–mail: sablinaaa@mail.ru

Одной из актуальных задач является поиск препаратов, способных влиять на состояние опухолевых клеток человека. Часто в этом качестве применяют растительные экстракты, механизм действия которых трудно объясним, поскольку они являются сложной смесью веществ. В данной работе оценивается влияние индивидуального соединения растительного происхождения (гиббереллиновой кислоты) на состояние опухолевых клеток человека. Существуют данные о способности этого вещества оказывать влияние на физиологическое состояние различных представителей позвоночных, в частности, имитировать действие различных стероидоподобных веществ, изменять состояние общего метаболизма, влиять на активность внутриклеточных ферментов, вызывать появление злокачественных новообразований в концентрациях, больших, чем использованные в этой работе. Для оценки влияния гиббереллиновой кислоты на состояние клеток культуры А431 её добавляли в среду культивирования в виде раствора в этиловом спирте на первые сутки культивирования так, что доля этанола в среде составляла 0,2%. Конечные концентрации фактора роста составляли от 5 нМ до 10 мкМ. Клетки фиксировали метиловым спиртом или фиксатором Буэна через одни, двое и трое суток после добавления раствора гиббереллина и окрашивали гематоксилином и эозином. Для оценки состояния культуры клеток использовались следующие количественные характеристики: число поликарионов; число апоптотических клеток; число апоптотических телец; число полиморфных ядер, морфология которых отличалась от округлой или овальной; число микроядер; число фагоцитированных окружающими клетками апоптотических телец; число митозов; число патологических митозов, с разделением на типы: К-митоз, многополюсный митоз, отставание встраивания хромосомы в метафазную пластинку, отставание отхождения хромосомы к полюсу в анафазе. Все концентрации гиббереллиновой кислоты, начиная с 5 нМ, усиливали проявления апоптоза. Концентрации от 100 нМ резко увеличивали количество микроядер, что свидетельствует о неправильном прохождении митоза. При концентрации 10 мкМ наблюдалось увеличение доли патологических митозов. Увеличение числа полиморфноядерных клеток в присутствии гиббереллина мало отличалось от аналогичного эффекта, вызванного одним этанолом. В наномолярных концентрациях наблюдалась широкая вариабельность различных параметров состояния культуры: уменьшение, а затем, при возрастании концентрации, увеличение числа митозов, уменьшение (в отличие от микромолярных концентраций) доли патологических митозов. Результаты работы позволяют высказать предположение о том, что гиббереллиновая кислота, вызывая разнообразные митотические аномалии, индуцирует митотическую катастрофу – один из вариантов апоптотической гибели клеток.

Работа поддержана грантами: РФФИ № 05-04-49247; РНП 2.1.1.7842; НШ 1861.2003.4

Сравнение воздействия α-токоферилсукцината на пролиферацию и гибель культуры эпителиальных трансформированных клеток разного происхождения.

Савицкая Маргарита Анатольевна
Студент
Московский Государственный Университет имени М. В. Ломоносова,
Биологический факультет, г. Москва, Российская Федерация
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, изменяет пути передачи внутриклеточных сигналов. Внутриклеточные естественные антиоксиданты (витамины групп Е, С, глутатион и др.) 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 эффекты как in vivo, так и in vitro. Причем данные эффекты могут быть не связаны напрямую с антиоксидантными свойствами этих химических соединений. Целью работы являлось исследование изменения пролиферативной активности и гибели трансформированных эпителиальных клеток разного происхождения при воздействии производного витамина Е α-токоферилсукцината (vitamin E succinat - VES). Работа проводилась на культуре клеток эпидермоидной карциномы человека А431 и культуре клеток рака молочной железы человека MCF-7. В среду культивирования клеток А431 добавлялось соответствующее количество спиртового раствора VES для получения конечных концентраций 20 мкМ, 40мкМ, 60 мкМ, 100 мкМ. Подсчет митотического (МИ) и апоптотического (АИ) индексов проводился на фиксированных препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Было выявлено, что воздействие VES не приводит к изменению МИ и АИ клеток А431 на 1 сутки культивирования. На 2 сутки культивирования наблюдается снижение МИ по сравнению с контролем (2,6%) при воздействии концентраций начиная от 40 мкМ (0,69%). На третьи сутки митотических клеток практически не обнаруживается. Подсчет АИ показывает, что на 2-е сутки инкубации отчетливо проявляется цитотоксическое действие концентраций начиная от 40 мкМ (22% апоптотических клеток). При концентрациях 60 и 100 мкМ на 2-е сутки апоптотический индекс превышает 50%. На 3-и сутки практически все клетки гибнут. При этом концентрация 20 мкМ VES значимо не изменяет МИ и АИ в течении 2 и 3 дня культивирования: 3,1% и 2,9% соответственно. Данные литературы [1] свидетельствуют о том, что воздействие VES стимулирует дифференцировку клеток MCF7 уже на первые сутки культивирования. Апоптоз, в зависимости от концентрации (10 мкМ, 20 мкМ) наблюдается либо на 2 либо на 3 день культивирования. Наши данные подтверждают, что концентрация 20 мкМ приводит к падению МИ на первые сутки культивирования и вызывает гибель клеток MCF7 на 3 сутки культивирования. Полученные результаты показывают, что VES в концентрациях от 40 мкМ и выше индуцирует остановку клеточного цикла и последующий апоптоз в клетках А431. Воздействие на протяжении 3 дней концентрации 20 мкМ не является токсичным. Таким образом, трансформированные клетки эпидермоидного происхождения А431 являются менее чувствительными к воздействию VES по сравнению с клетками рака молочной железы MCF7.

Работа поддержана РФФИ № 05-04-49248, РНП 2.1.1.7842, НШ 1861.2003.4

Литература: 1. Yu, W., Simmons-Menchaca, M., Gapor, A., Sanders, B.G., Kline, K. (1999) Induction of apoptosis in human breast cancer cells by tocopherols and tocotrienols. //Nutr Cancer., № 33(1), p.26-32.

Колебания митохондриального мембранного потенциала в кардиомиоцитах новорожденных крысят

Семейко Елена Юрьевна
Студент
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
E–mail: semeyko@gmail.com

В последнее десятилетие найдены разнообразные способы стимуляции обратимых изменений митохондриального мембранного потенциала. Так, в условиях субстратного голодания в культуре кардиомиоцитов взрослой крысы удается вызвать колебания митохондриального мембранного потенциала в целой группе митохондрий [2]. Этот метод в сочетании с последующим электронномикроскопическим изучением серийный срезов может стать основой для исследования связи морфологии митохондриома и его функциональной активности. Очевидным претендентом на роль структуры, обеспечивающей функциональную связь отдельных митохондрий, является межмитохондриальный контакт (ММК). Подтверждением этого служит следующий эксперимент: при окрашивании кардиомиоцитов потенциал-зависимым флуорохромом лазерное микрооблучение одной митохондрии вызывает гашение всех связанных с ней посредством ММК органелл [1]. Цель данной работы – изучить поведение митохондрий в клетках с системой ММК в условиях субстратного голодания. В качестве объекта исследования была выбрана первичная культура кардиомиоцитов новорожденных крысят. Прижизненное наблюдение за автофлуоресценцией флавопротеинов и флуоресценцией потенциал-зависимого красителя TMRE показало, что субстратное голодание в течение 1-2 ч. в клетках трехдневной культуры приводит к появлению скачкообразных изменений метаболической активности и мембранного митохондриального потенциала в многочисленных митохондриях. Помимо деэнергизации одиночных митохондрий, в условиях данного эксперимента удается наблюдать группы митохондрий, в которых происходит одновременная потеря сигнала. Такие группы состоят обычно из 2-4 (редко - из нескольких десятков) рядом расположенных митохондрий. В ходе работы был разработан метод компьютерной обработки изображений, позволивший автоматизировать процесс поиска групп митохондрий, в которых происходят синхронные изменения трансмембранного потенциала. Культура кардиомиоцитов новорожденных крысят является удобной моделью для изучения на электронномикроскопическом уровне функциональной роли морфологического объединения митохондрий посредством ММК.

Литература: 1. Amchenkova A.A., Bakeeva L.E., Chentsov Y.S., Skulachev V.P., Zorov D.B. 1988. Coupling Membranes As Energy-transmitting Cables. I. Filamentous Mitochondria in Fibroblasts and Mitochondrial Clusters in Cardiomyocytes. The Journal of Cell Biology. 107: 481-495. 2. Romashko D.N., Marban E., O'Rourke B. 1998. Subcellular metabolic transients and mitochondrial redox waves in heart cells. Cell Biology. 95: 1618-1623.

Использование эксплантационной органотипический культуры сетчатки для исследования воздействия ростовых факторов *на различные типы клеток*

Сергеев Сергей Александрович
студент
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: embryossa@gmail.com

Исследование целого организма или его органа чрезвычайно затруднительно. Метод клеточных культур позволяет обойти многие трудности экспериментов in vivo. Клетки сетчатки способны продолжать свой рост in vitro, образуя контакты между собой. Показано, что при культивировании в монослое, в первичной культуре снижается разнообразие клеточных типов, так как клетки с большим пролиферативным потенциалом вытесняют другие [1]. Этого недостатка лишен метод органотипического эксплантационного культивирования, так как при его применении сохраняется не только цитоархетиктоника ткани, но и взаимосвязи между клетками, что особенно важно при моделировании развития сетчатки, влияния на нее ростовых факторов [2]. В нашей работе мы использовали прикрепленные органотипические культуры сетчатки новорожденных крыс линии Wistar для изучения влияния трофических факторов на клетки эксплантатов сетчатки. Культивирование проводили в течение 30 сут. в стандартных условиях [3] в модифицированной среде DMEM/F12, содержащей 7% ФБС, EGF, FGF, с добавкой BDNF 100нг/мл; PEDF 5 нг/мл; «Авастином» 2.5 мг/мл, либо в среде без добавок. На 30-е сут. образцы фиксировали в 4% параформальдегиде на ФСБ. Для иммуногистохимического анализа использовали антитела к GFAP (Sigma, G9269), к β III тубулину (Chemicon, MAB1637) и фактору Виллибранта (Sigma F3520). В присутствии BDNF из эксплантата преимущественно выселялись нейроны и глиальные клетки, а в контроле - только глиальные. Под действием BDNF нейроны формировали длинные ветвящиеся отростки, в том числе собранные в крупные пучки. В контроле отростки нейронов были немногочисленны и не ветвились. При культивировании с PEDF возрастал пролиферативный потенциал глиальных клеток, интенсивнее шло их расселение за зону эксплантата, зона распространения глиальных клеток превышала диаметр эксплантата в несколько раз, по сравнению с контролем активнее шла миграция нейральных клеток. Для исследования влияния VEGF на культуры сетчатки использовали коммерческий препарат «Авастин» - моноклональные антитела класса IgG против VEGF. При культивровании с «Авастином» наблюдалась активная миграция как нейральных, так и гиальных клеток и их расселение по значительной площади, не превышающей, однако таковую при воздействии PEDF. Практически отсутствовала экспрессия эндотелиальных маркеров клетками эксплантата в присутствии фактора. В опытной группе нейральные клетки активно образовывали разветвленные нейриты. Таким образом, была показана способность эксплантационных культур сетчатки реагировать на ростовые факторы усилением процессов дифференцировки нейрональных клеток, их миграции вместе с глиальными клетками, формирование длинных ветвящихся нейритов. Это дает возможность использовать данный тип культур как адекватную модель для проведения предклинического тестирования различных препаратов, направленных на изменение соотношения ростовых факторов.

Литература: 1.Johansson K., Ehinger B. Structural changes in the developing retina maintained in vitro. // Vision Research. 2005. V.45. P.3235–3243. 2. Kretz A., et al. A novel primary culture technique for adult retina allows for evaluation of CNS axon regeneration in rodents. //Journal of Neuroscience Methods. 2004. V.136 P.207–219. 3. Avwenagha O., et al. The outgrowth response of the axons of developing and regenerating rat retinal ganglion cells in vitro to neurotrophin treatment. //J. Neurocytol. 2003. V.32. P.1055–1075.

Избирательное подавление экспрессии генов в мышечных клетках по механизму РНК-интерференции[2]

Сурков Константин Викторович, Суханова Ирина Федоровна, Авдонин Павел Владимирович

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия; Институт общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва, Россия

E–mail: sur_237@mail.ru

РНК-интерференция - это механизм избирательного ингибирования экспрессии белков путем расщепления их матричной РНК (мРНК). Целью работы является изучение возможности применения механизма РНК-интерференции на культуре мышечных клеток млекопитающих. Применение малых интерференционных РНК (миРНК) может стать доступным и удобным подходом для исследования функций отдельных белков в исследуемых типах клеток. Исследования проводились на культуре гладкомышечных клеток из аорты крысы, миобластах C2C12 скелетной мускулатуры мыши, а также на дифференцирующихся миотубулах клеток C2C12. В основные задачи работы входил подбор наиболее подходящих реагентов и условий для обеспечения транспорта (трансфекции) последовательности миРНК в исследуемые клетки. В качестве критериев эффективности трансфекции рассматривались выживаемость клеток и эффективность переноса миРНК через клеточную мембрану. Были протестированы трансфицирующие реагенты, содержащие полимерный компонент: jetPEItm (Polyplus transfection), DreamFecttm (OZ Biosciences). Также были использованы реагенты MetafectinetmPRO (Biontex) и Lipofectaminetm2000 (Invitrogen), которые имели основу липидного состава. Проведенные тесты показали наименьший цитотоксический эффект при использовании реагента jetPEI, имеющего в своем составе полиэтиленимин, при проведении обратной трансфекции гладкомышечных клеток аорты крысы и прямой трансфекции миобластов C2C12 и миотубул. Для оценки эффективности трансфекции использовали двухцепочечную короткую РНК (siGLORiscFree RNA, Dharmacon), несущую флуоресцентную метку Cy3 (λвозбуждения=543нм, λэмиссии=570нм). Поступление меченой миРНК в клетки регистрировали при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP. Эффективность трансфекции была близка к 100% для всех объектов исследования – гладкомышечных клеток, миобластов и миотубул C2C12. Дальнейшие исследования показали принципиальную возможность избирательного подавления в изучаемых мышечных клетках уровня мРНК отдельных белков по механизму РНК-интерференции. Была использована миРНК, последовательность которой направлена на подавление в исследуемых клетках экспрессии глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФДГ). Для оценки уровня мРНК в трансфицированных и контрольных образцах клеток был применен метод количественной полимеразной цепной реакции (real-time PCR). По данным количественной полимеразной цепной реакции, через 48 часов после трансфекции данной миРНК, уровень мРНК ГАФДГ в скелетных миобластах и миотубулах уменьшился до 20 раз относительно контроля. Результаты проведенной работы показывают возможность эффективного транспорта коротких двухцепочечных интерференционых РНК в клетки скелетной и гладкой мускулатуры с целью подавления уровня мРНК исследуемых белков-мишеней и определения их функциональной роли во

[2] Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках грантов Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант №05-0449166) и SCOPES №IB74A0-110940.

время прижизненного исследования клеток. Подбор оптимальных условий трансфекции с низким цитотоксическим эффектом обеспечивает возможность постановки на этих клетках последующих физиологических экспериментов.

Влияние избытка ростовых факторов на систему микротрубочек клетки и ход митоза

Усова Евгения Витальевна
Студентка
Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: eugenia125@mail.ru

Одним из обязательных компонентов цитоскелета эукариотической клетки являются микрорубочки (МТ). Во время митоза МТ формируют веретено деления, обеспечивая равномерное распределение генетического материала между дочерними клетками, а в интерфазе обеспечивают внутриклеточный транспорт при помощи белков-моторов. Строение системы интерфазных МТ различается у клеток разных типов – у многих они организованы в виде звезды, у некоторых располагаются хаотично. Целью нашей работы было выяснение того, насколько упорядоченная система МТ в интерфазе необходима для нормальной жизнедеятельности животной клетки и для правильного осуществления митоза после окончания интерфазы. Существуют разные способы нарушить радиальность системы МТ. Это может быть простая стабилизация их таксолом, или нарушение работы динактинового комплекса, заякоривающего их в центре клетки; или ингибирование одного из клеточных регуляторов – протеинкиназы LOSK, и др. Наши предварительные данные показали, что при условии повышенного содержания эмбриональной сыворотки в среде, система МТ претерпевает морфологические изменения. Мы культивировали клетки линии Vero в течение нескольких месяцев в присутствии трёхкратного избытка сыворотки, после чего сравнивали параметры таких клеток с контролем. Для выполнения цели работы были сформулированы следующие задачи: 1)сравнить морфологию систем МТ контрольных и экспериментальных клеток; 2)исследовать функциональную активность центросом в контрольных и экспериментальных клетках путём разборки и последующей сборки МТ на центросомах; 3)количественно проанализировать содержание белков – основных, функциональных компонентов центросомы – в центросомах контрольных и экспериментальных клеток; 4)сравнить способность клеток двух популяций к распластыванию и перемещению по субстрату; 5) проанализировать в таких клетках морфологию актинового цитоскелета и аппарата Гольджи, а также способность его к поляризации на краю раны; 6) установить, наблюдаются ли отдалённые последствия хаотизации МТ, отслеживая в клеточных популяциях наличие центросомных аномалий, появившихся вследствие не правильно прошедших митозов, и общее количество аномальных митозов в популяции. Нами было показано, что в условиях избытка ростовых факторов, содержащихся в эмбриональной сыворотке, добавляемой в культуральную среду, в популяции клеток происходит достоверное увеличение доли клеток с хаотичной системой МТ (доля клеток с упорядоченной системой МТ составляет 94% в контрольной популяции и 66% в экспериментальной). Функциональная активность центросом в таких клетках также претерпевает изменения, и восстановление на них МТ после разборки идёт по-другому. Через час после отмывки клеток от нокодазола, 73% контрольных клеток обладали выраженной звездой из МТ, в то время как среди экспериментальных клеток таких было всего 35,5%. При этом количественный анализ иммунофлуоресцентого окрашивания клеток антителами к основным функционально активным белкам центросомы, гамма-тубулину и найнеину, показал, что их содержание в центросоме заметным образом не меняется. В эксперименте в 1,5 раза увеличивается средняя площадь клеток, что, как недавно было показано, может служить косвенным признаком старения популяции. Количество нарушений митоза также возрастает при избытке сыворотки в культуральной среде – с 2,8 до 21%. Основываясь на полученных данных, мы можем сделать вывод, что хаотизация МТ, вызванная избытком в культуральной среде

факторов из эмбриональной сыворотки, приводит не только к морфологическим, но и к функциональным изменениям клеток млекопитающих.

N-ацетилцистеин является прооксидантом в сочетании с витамином B_{12}[3]

Фасхутдинова Алсу Амировна[4]
аспирант
Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пущино, МО, Россия
E–mail: falsou@rambler.ru

Антиоксидант N-ацетилцистеин, являясь веществом широко спектра действия, используется в медицине в качестве лекарственного средства как в отдельности, так и в комплексе с другими веществами. NAC применяют в антиоксидантной терапии с витаминными препаратами. Он является основным компонентом лекарственного средства АЦЦ, применяемого при простудных заболеваний для лечения насморка. NAC является компонентом препарата Церефолин NAC для лечения заболеваний нейроваскулярного окислительного стресса, васкулярной дименции, болезни Альцгеймера и ишемического шока. В последнем случае, NAC идет в комплексе с веществами L-метилфолат и метилкобаламин. Однако часто не учитывается прооксидантный эффект этого соединения проявляющегося при сочетании с соединениями содержащие металлы переменной валентности. Недавно нами был обнаружен цитотоксический эффект N-ацетилцистеина в сочетании с витамином B12b [1]. Мы предположили, что в сочетании с кобальтом входящим в состав гидроксикобаламина (витамина B12b) NAC проявляет себя как прооксидант и способен генерировать АФК, повреждающие клетки. Актуальность данной работы обусловлена тем, в терапии зачастую не учитывается сопутствующее поступление соединений прооксидантного действия, что может привести к понижению её эффективности и даже к повреждающему воздействию на клетки и ткани организма [2]. С другой стороны, цитотоксический эффект сочетания N-ацетилцистеина с витамином B12b может быть взят за основу при разработке новых лекарственных (противоопухолевых) средств. Согласно нашим данным N-ацетилцистеин не оказывает цитотоксического действия на клетки, однако вызывает гибель опухолевых клеток совместно с витамином B12b в фармакологических дозах. Нами установлена длительная генерация перекиси водорода системой NAC/B12b в физиологических концентрациях в среде. Экзогенный окислительный стресс вызывает повышение внутриклеточной активности. Этот стресс может быть обусловлен внутриклеточной генерацией АФК и потоком в клетку перекиси водорода, образующийся вне клетки. Тип гибели, инициируемый воздействием тиол/B12b – апоптоз. Опыты с хелаторами металлов показали, что в инициации гибели участвует внутриклеточное железо. Дефероксамин и фенантролин, связывающие ионы железа, устраняли гено- и цитотоксический эффект сочетания NAC/B12b, не влияя на накопление в среде H2O2. Предполагается, что в цитотоксическом действии системы NAC/B12b участвует железо, вытекающее из лизосом при дестабилизации их мембран при воздействии N-ацетилцистеина с витамином B12b. Причиной гибели клеток является накопление нерепарированных разрывов ДНК. Полученные данные представляют практический интерес для онкологии и фармакологии, а также для корректного использования витаминных и антиоксидантных препаратов в медицине.

Литература: 1. Соловьева М.Е., Соловьев В.В., Фасхутдинова А.А., Кудрявцев А.А., Акатов В.С. Прооксидантное и цитотоксическое действие N-ацетилцистеина и глутатиона в сочетаниях с витамином B12b. Цитология, 2007, №: 1, 70-78. 2. Бобырев В.Н., Почерняева В.Ф., Стародубцев С.Г., Бобырева Л.Е., Дубинская Г.М.,

[3] Работа выполнена при поддержке программы Университеты России, проект УР 11.01.028.
[4] Автор выражает признательность за помощь в подготовке тезисов и проведении экспериментов сотрудникам лаборатории тканевой инженерии ИТЭБ РАН Акатову В.С., Соловьевой М.Е., Соловьеву В.В. и Кудрявцеву А.А.

Воскресенская О.Н. 1994. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей – основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами. Эксперим и клин. фармакол. 57 (1):47.54.

Гетерогенность митохондриального потенциала как маркер для выделения чистой популяции кардиомиобластов.

***Хряпенкова Татьяна Геннадьевна**, Коротецкая Мария Валерьевна, Зоров Дмитрий Борисович, Плотников Егор Юрьевич*
Аспирантка.
Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
Факультет Биоинженерии и Биоинформатики
E–mail: tenella@list.ru

Выделение истинных стволовых и прогениторных клеток, в том числе кардиомиобластов, является важной задачей в связи с перспективами их терапевтического применения для лечения различных патологий сердечной ткани. Одной из проблем выделения чистой популяции любых прогениторных клеток является отсутствие единого мнения по фенотипической характеристике этих клеток. Кроме того, выделение нефиксированных клеток методами флуоресцентного или магнитного мечения антителами, несет высокую вероятность повреждения клеток или микробной контаминации. В связи с этим, использование методик, позволяющих быстро и селективно выделять популяцию кардиомиобластов, отделяя их от фибробластов и других балластных клеток, вызывает большой интерес. В данной работе было показано, клетки первичной культуры имеют различное строение актинового цитоскелета: около 50% клеток имеют поперечную исчерченность актиновых волокон, то есть обладают сформированным сократительным аппаратом. Именно эти клетки мы считаем истинными кардиомиобластами. Также эти клетки отличаются по флуктуациям внутриклеточной концентрации кальция. Кроме того, нами обнаружено уникальное свойство кардиомиобластов – высокий уровень энергетики этих клеток, обеспечиваемый большим количеством митохондрий. Проанализировав все полученные данные, мы пришли к выводу, что первичная культура клеток эмбрионального миокарда содержит как минимум 2 типа клеток: 1) кардиомиобласты, способные к самопроизвольному сокращению, обладающие более высоким трансмембранным потенциалом, имеющие поперечную исчерченность актиновых волокон, в которых наблюдаются флуктуации внутриклеточного кальция; 2) клетки, не обладающие всеми вышеперечисленными признаками. Это балластные клетки, прежде всего фибробласты и кардиофибробласты. Мы показали, что окрашивание смешанной первичной культуры эмбрионального миокарда высокоспецифичным флуоресцентным митохондриальным зондом дает четкое разделение смешанной популяции: популяция кардиомиоцитов и кардиомиобластов обладает высоким трансмембранным потенциалом, а балластные клетки низким. В результате, применив проточную цитометрию, сопровождающуюся сортингом клеток по этому признаку, мы можем получить популяцию обогащенную именно кардиомиоцитами и кардиомиобластами. А поскольку краситель не оказывает токсического действия на клетки и достаточно быстро элиминируется, риск повреждения и гибели клеток в процессе сортинга значительно снижается по сравнению с традиционными методиками. Таким образом, помимо нового фундаментального знания о биологии кардиомиобластов данное исследование открывает возможности для разработки нового специфичного метода выделения культуры кардиомиоцитов из фетальных и эмбриональных источников для дальнейшего использования в клеточной терапии.

Влияние повышенной температуры на процесс сперматогенеза у мышей.

Челомбитько Оксана Михайловна
Студент
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: ksuxxa@gmail.com

В современном мире особенно остро стоит проблема бесплодия, в том числе, мужского. Нарушения сперматогенеза могут быть связаны с генетическими изменениями, экологической обстановкой, образом жизни. Одним из факторов является гиподинамия и непосредственно с ней связанная гипертермия паховой области. Для изучения влияния повышенной температуры на сперматогенез был создан ряд моделей, среди них – модель искусственного крипторхизма. Основная задача работы состояла в изучении зависимости и глубины обратимости нарушений сперматогенного процесса от длительности крипторхизма. Исследование проводилось на мышах гибридах F1 (СВА × С57Bl6). В возрасте 2–2,5 мес им проводилась операция по инициации крипторхизма. После этого через 7, 14, 35, 56, 70 сут часть животных забивали. Остальным мышам через 14 и 35 сут проводили операцию орхидопексии (возвращение семенника в мошонку), и через 35–40 сут исследовали состояние сперматогенного эпителия. Семенники контрольных (интактных) и экспериментальных животных после извлечения взвешивали, затем готовили препараты для последующего гистологического анализа. У контрольных животных масса семенников не изменялась в течение всего времени эксперимента и составляла в среднем 110 мг, в то время как в условиях гипертермии она постепенно уменьшалась. Снижение веса наиболее выражено в первые 2 нед, а к 70 сут масса гонад достигает 34 мг. Значительные изменения происходят в морфологии семенных канальцев. Через 7 сут после операции во многих канальцах обнаруживались отслоения клеток от базальной мембраны, межклеточные пространства, слущенные клетки, а также гигантские многоядерные клетки, множество гибнущих по механизму пикноза клеток. Просвет канальцев был значительно большим, чем в контроле. На 14 сут фиксации после операции канальцы уже заметно опустошены: полностью отсутствуют сперматиды, спермии, редко встречаются мейоциты. На более поздних сроках (35–70 сут) происходит значительное уменьшение диаметра семенных канальцев. Клетки в них лежат, в основном, в один-два слоя, присутствуют только сперматогонии и клетки Сертоли. Дальнейшие исследования показали, что в заданных условиях эксперимента полное восстановление нормального сперматогенеза после возвращения семенника в мошонку возможно только после 14 сут пребывания семенника в условиях гипертермии. Оказалось, что после 14 сут крипторхизма сперматогенез восстаналивается полностью в течение 35–40 сут. Если же семенник находился в брюшной полости 35 сут, восстановление замедляется, сперматогенез остается частично нарушенным. Сперматогенез в семенниках, находившихся в условиях повышенной температуры 56 сут, практически не восстанавливается. Особое внимание в работе было уделено изменению популяции клеток Сертоли, являющихся основными элементами ниши для стволовых сперматогониев, от сохранности которых зависит восстановление сперматогенного эпителия. На тотальных препаратах семенников после 35 и 56-дневного крипторхизма при обработке антителами к маркеру пролиферации Ki-67 были обнаружены клетки Сертоли, положительно окрашенные. Кроме этого, на гистологических срезах в слое клеток Сертоли встречаются митозы и клетки с несколькими (2–6) ядрышками, что является признаком либо незрелых, либо только что завершивших деление клеток Сертоли. Таким образом, показана способность клеток Сертоли вступать в пролиферацию в условиях гипертермии, что указывает на глубокую перестройку сперматогенного эпителия и позволяет предполагать, что после длительной гипертермии восстановление сперматогенного процесса возможно, но требует большего времени.

Изучение действия митохондриальных антиоксидантов на клетки карциномы шейки матки линии SiHa.

Шагиева Галина Сергеевна
студент
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, г. Москва, Россия
E-mail: strax_i_trepet@list.ru

При опухолевой трансформации клеток большое значение имеют процессы изменения цитоскелета и усиления подвижности клеток, которые лежат в основе способности опухолевых клеток к инвазии и метастазированию в здоровые ткани организма. Отмечено действие антиоксидантов на цитоскелет трансформированных клеток, заключающееся в частичной реверсии трансформированного фенотипа и снижении клеточной подвижности. Качественно новым классом синтетических антиоксидантов являются митохондриально-направленные антиоксиданты, имеющие в своем составе специфические катионы, обеспечивающие быстрое и обратимое накопление антиоксидантов в митохондриях, что повышает эффективность их действия. Был проведен морфологический и биохимический анализ изменений цитоскелета и межклеточных адгезионных структур трансформированных клеток культуры SiHa и нормальных клеток культуры HaCaT, обработанных митохондриальным антиоксидантом SkQ (40нМ, 7 сут). Также было исследовано влияние антиоксиданта SkQ на скорость роста клеток культуры SiHa. Было отмечено ингибиторное влияние антиоксиданта SkQ на скорость роста клеток культуры SiHa. На клетки культуры HaCaT антиоксидант SkQ заметного влияния не оказывал. В ходе работы было показано, что обработка клеток культуры SiHa антиоксидантом SkQ ведет к усилению пучков актиновых микрофиламентов, их упорядоченному расположению, увеличению их толщины и количества, концентрации актиновых микрофиламентов в местах межклеточных контактов. Иммунофлуоресцентное окрашивание Е-кадгерина и бета-катенина выявило перераспределение этих белков в упорядоченные тангенциальные межклеточные контакты. Увеличение экспрессии Е-кадгерина в клетках культуры SiHa при обработке SkQ было подтверждено с помощью иммуноблоттинга. Таким образом, митохондриальный антиоксидант SkQ вызывает морфологическую нормализацию трансформированных клеток культуры SiHa.

Анализ клеток костного мозга и крови у летально облученных мышей после восстановления кроветворения dsRed-маркированными клетками костного мозга.

***Шишкина Валентина Сергеевна*[2]**
студентка 5 курса
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия
E–mail: ShishkinaValya@mail.ru

На сегодняшний день актуальным является изучение роли клеток костномозгового происхождения в процессах физиологической репарации и патологического ремоделирования тканей на модели животных с маркированными клетками костного мозга. Для маркирования этих клеток одним из наиболее перспективных является метод генетических конструкций на основе лентивирусов. Данные конструкции позволяют осуществить трансгеноз неделящихся клеток, в том числе стволовых клеток костного мозга. Такой подход представляется особенно актуальным в свете недавно полученных данных, подтверждающих прямое участие костномозговых прогениторных элементов в ремоделировании поврежденной сосудистой стенки, в частности, в развитии интимальной гиперплазии. Это создает предпосылки для использования костномозговых предшественников эндотелиальных и гладкомышечных клеток в качестве средств доставки терапевтических генов в область репарации. В связи, с чем актуальной задачей является разработка эффективного метода трансдукции данного типа клеток, который обеспечит стабильную экспрессию трансгена в их дифференцированных потомках in vivo.

Настоящая работа посвящена выявлению маркированных красным флуоресцентным белком (dsRed) клеток костного мозга и крови у радиационных костномозговых химерных мышей. Кроветворение химерных мышей было восстановлено клетками обогащенных субпопуляций костного мозга с фенотипами Lin-c-kit+ и Lin-c-kit+Sca-1+, прошедшими in vitro трансдукцию с помощью генетической конструкции на основе лентивируса HIV-1, несущей ген dsRed, методом трансдукции ex vivo. Целью исследования являлось проведение анализа экспрессии dsRed в клетках костного мозга и периферической крови химерных мышей через 1-11 месяцев после восстановления кроветворения. Флуоресценцию dsRed в клетках костного мозга и крови определяли методом поточной цитофлуориметрии. Выявление нуклеотидных последовательностей Y-хромосомы и фрагмента генетической конструкции в геноме исследуемых клеток проводили с помощью полимеразной цепной реакции. Флуоресценция dsRed в клетках костного мозга и крови химерных животных была выявлена на 1, 4, и 11 месяц после восстановления кроветворения. При восстановлении кроветворения маркированными клетками субпопуляций Lin-c-kit+ и Lin-c-kit+Sca-1+ количество флуоресцирующих клеток составило соответственно до 3% и до 1%. Анализ ДНК, выделенной из клеток костного мозга химерных самок, выявил наличие Y-хромосомного маркера, что свидетельствует о донорском происхождении этих клеток. Анализ ДНК клеток костного мозга химерных мышей, кроветворение которых было восстановлено трансдуцированными клетками, выявил наличие вирусного маркера PROSIH, что подтверждает стабильность интеграции генетической конструкции. Полученные результаты говорят о том, что кроветворение может быть длительно восстановлено клетками выбранных субпопуляций, т.е. среди них присутствуют примитивные костномозговые клетки-предшественники. Эти клетки могут подвергаться лентивирусной трансдукции in vitro и служить подходящим инструментом для маркирования костномозговых клеток ex vivo.

Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ (грант № 07-04-01456). Автор выражает признательность в.н.с. ФГУ РКНПК Росздрава Н. В. Радюхиной за помощь в проведении экспериментов

Исследование роли Т-кадгерина в опухолевом ангиогенезе in vivo и росте опухолевых клеток in vitro

Юрлова Екатерина Ивановна
Студент
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия
E–mail: yurlova@mail.ru

Т-кадгерин, атипичный представитель семейства кадгеринов, не имеющий трансмембранного и цитоплазматического доменов, а его присоединение к мембране осуществляется при помощи гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря. Данные литературы позволяют предположить, что повышенная экспрессия Т-кадгерина в опухоли может подавлять прорастание в нее кровеносных сосудов и, как следствие, тормозит её рост. Кроме того, на клетках карциномы и нейробластомы обнаружено снижение пролиферативной и инвазивной способности опухолевых клеток, трансфицированных кДНК Т-кадгерина, что указывает на возможную роль Т-кадгерина в контроле клеточной подвижности и роста. В работе были использованы клетки мышиной меланомы B16F10, стабильно трансфицированные плазмидным вектором, кодирующим человеческий Т-кадгерин, и клетки B16F10, трансфицированные контрольной плазмидой. На линии клеток мышиной меланомы in vitro было исследовано влияние Т-кадгерина на митотическую активность и степень пигментации (как показателя уровня дифференцировки) клеток мышиной меланомы. In vivo исследование проводилось на модели хорио-аллантоидной мембраны куриного эмбриона и модели метастазирующей меланомы B16F10 в легких у мыши. Контрольные и гиперэкспрессирующие Т-кадгерин клетки мышиной меланомы вводили в хорио-аллантоидную мембрану и анализировали приживаемость опухолевых клеток, размер и морфологию формирующихся опухолевых масс и степень их васкуляризации. На модели метастазирующей меланомы B16F10 у мыши проводилось сравнение васкуляризации метастазов в лёгких после подкожного введения суспензии клеток меланомы B16F10, гиперэкспрессирующей Т-кадгерин, или контрольной меланомы. В результате исследования было показано: 1. Т-кадгерин-гиперэкспрессирующие клетки мышиной меланомы реже имплантируются в хорио-аллантоидную мембрану, чем контрольные клетки; 2. клетки меланомы, гиперэкспрессирующие Т-кадгерин, в большинстве случаев формируют на хорио-аллантоидной мембране пигментированные опухолевые массы площадью до 0,1 мм2, тогда как контрольные клетки чаще формируют непигментированные или слабо пигментированные опухолевые массы площадью более 0,1 мм2; 3. число сосудов, подрастающих к опухолевым массам, сформированным на хорио-аллантоидной мембране клетками, гиперэкспрессирующими Т-кадгерин, меньше аналогичного показателя для опухолевых масс, сформированных контрольными клетками; 4. in vitro в культуре клеток мышиной меланомы, гиперэкспрессирующей Т-кадгерин, выявлено снижение митотической активности и более высокая степень пигментации по сравнению с контрольными клетками; 5. число сосудов среднего диаметра в лёгочных метастазах, формирующихся после введения Т-кадгерин-гиперэкспрессирующих клеток меланомы B16F10, достоверно меньше по сравнению с метастазами, формирующимися после введения контрольных клеток меланомы. Полученные нами данные подтверждают гипотезу о возможном участии Т-кадгерина в торможении опухолевого роста путем подавления васкуляризации опухоли, а также указывают на возможную роль Т-кадгерина в контроле пролиферативной активности и степени диффенцированности клеток меланомы.

Влияние генов xGα13, xLarg, xRhoA на интеркаляцию и эпиболию в крыше бластоцеля зародышей Шпорцевой лягушки

Шустикова Любовь Александровна
Аспирант
Институт Молекулярной Биологии им. В.А.Энгельгардта РАН
E-mail: listarova@mail.ru

Сложные гаструляционные преобразования требуют четкой регуляции структуры и динамики цитоскелета, клеточных контактов, миграции и адгезии клеток. Подобными универсальными регуляторами являются малые ГТФ-азы семейства Rho. Во многих сигнальных каскадах также участвуют гетеротримерные G белки [2]. Известно, что G белки могут передавать сигналы от внеклеточных лигандов на малые Rho-ГТФазы через специфические GEF белки, одним из которых является Larg [1]. Целью проекта является исследование множественных перекрещивающихся путей молекулярных взаимодействий, инициированных сигналом извне и приводящих к активации Rho-ГТФаз и их мишений, а также роли этих путей в развитии. Возможность влияния этих генов на процессы эпиболии и интеркаляции было решено проверить путем экспериментов по анимальной оверэкспрессии изучаемых генов. мРНК генов xGα13, xRhoA и xLarg инъецировали в анимальный полюс зародышей на стадии зиготы. Эффект от подобных инъекций мРНК является дозозависимым. Анимальные инъекции мРНК в высоких концентрациях блокируют радиальную интеркаляцию и эпиболию анимальных бластомеров. В результате формируется плотная многослойная, хорошо эпителизованная шапочка. Снижение дозы мРНК приводит к снижению наблюдаемого эффекта. Следовательно, оверэкспрессия генов xGα13, xLarg, xRhoA вызвала подавление интеркаляции и эпиболии в крыше к началу гаструляции. В целом сходство морфологического эффекта изучаемых генов показывает, что белки могут являться звеньями единого сигнального каскада активации Rho. Для демонстрации влияния исследуемых генов на подвижность и адгезию клеток была использована модель сворачивания крыши бластоцеля ранней гаструлы в физиологических условиях. При анимальной оверэкспрессии Gα13 формируется многослойная шапочка, сворачивание которой значительно затруднено. Однако клетки сохраняют способность к поляризации. Оверэкспрессия RhoA вызывает утолщение крыши, по краю эксплантата клетки сохраняют тенденцию к поляризации, однако в гораздо меньшей степени, чем у Gα13-инъецированных зародышей. Инъекции Larg вызывают не столь значительное утолщение крыши, поэтому сворачивание подобных эксплантатов происходит быстрее, чем у Gα13-инъецированных зародышей, но медленнее, чем у контроля. Эксперименты, проведенные на данной модели, показывают, что изучаемые гены влияют на поляризацию и адгезию клеток, а, следовательно, и на их подвижность. Для улучшения представлений об ультраструктуре клеток при различных уровнях экспрессии изучаемых генов было проведено исследование состояния фибриллярного актина в клетках крыши ранней гаструлы Xenopus методом конфокальной микроскопии. Показано, что оверэкспрессия Gα13 усиливает полимеризацию актина в кортексе клеток и сборку волокон вблизи контактных зон. Таким образом, полимеризация кортикального актина в клетках Xenopus регулируется Gα13 и RhoA.

Литература: 1. Fukuhara S., Chikumi H., Gutkind J. S. Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G12 family to Rho // FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters. 2000, 485, 183-188. 2. Malbon C.C. G proteins in development // Nature Reviews. 2005, vol.6, pp.689-701.