

УДК 591

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ
ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН (17–18 ДЕКАБРЯ 2008 г.)**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ
ФАКТОРОВ И СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ
СЕТЧАТКИ ТРИТОНА**

© 2009 г. П. П. Авдонин, Ю. В. Маркитантова, Э. Н. Григорян, Р. Д. Зиновьева

Лаборатория проблем регенерации

Работа посвящена изучению молекулярно-генетических механизмов регенерации сетчатки у взрослого тритона *Pleurodeles waltl*, происходящей в результате трансдифференцировки клеток пигментного эпителия. Эффективный подход к пониманию механизмов регенерации – сравнительный анализ экспрессии генов, инициирующих и контролирующих последовательные стадии развития сетчатки позвоночных и регенерации сетчатки у тритонов. В основе развития сетчатки позвоночных лежит эволюционно-консервативная сеть генов глазного поля: *Rax6*, *Six3*, *Rx*, *Chx*, *Otx2*, *Mitf*, *Pitx2*, *FGF2*, *TGFβ2*, *Shh*, *Wnt*, *Bmp4*. Задача наших исследований состоит в идентификации генов, которые могут запускать и контролировать процесс регенерации сетчатки. Проводя параллель между развитием и регенерацией тканей глаза, в частности сетчатки, мы предполагаем существование сходных механизмов контроля обоих процессов.

В ходе наших исследований в тканях глаза тритона идентифицирован ряд генов, кодирующих гомеобоксодержащие транскрипционные факторы *Rax6*, *Otx2*, *Six3*, *Pitx2* и сигнальные молекулы *FGF2*, *TGFβ2*. Методом ПЦР выявлено возрастание уровня экспрессии регуляторных генов *Rax6*, *Six3*, *FGF2* в раннем зачатке регенерирующей сетчатки на стадии формирования нейробластов – клеточных источников всех типов клеток сетчатки. Активация исследуемых регуляторных генов на фоне снижения экспрессии регуляторного гена *Otx2* и ингибирования гена меланогенеза *RPE65* в зачатке регенерирующей сетчатки свидетельствует об индукции трансдифференцировки клеток пигментного эпителия. С помощью метода иммунохимии локализованы белки *FGF2*,

TGFβ2 в цитоплазме, а *Rax6*, *Pitx2* – в ядрах нейробластов регенерирующей сетчатки. В депигментирующихся клетках пигментного эпителия на стадии образования нейробластов иммунопозитивные сигналы для исследуемых белков не выявлены. Обнаружен сходный паттерн экспрессии транскрипционных факторов *Rax6* и *Pitx2* и сигнальных белков *FGF2*, *TGFβ2* в нейробластах сетчатки на ранней стадии регенерации, а также в клетках внутреннего ядерного слоя и ганглиозных клетках на поздних стадиях регенерации сетчатки. Паттерн экспрессии исследуемых генов в регенерате сетчатки на поздней стадии имеет много общего с наблюдаемым в нативной сетчатке. Однако в нативной сетчатке обнаружены региональные отличия в локализации исследуемых транскрипционных факторов. *Pitx2* выявляется во всех ядерных слоях сетчатки, а *Rax6* – в клетках внутреннего ядерного слоя и в ганглиозных клетках.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при регенерации сетчатки тритона происходит активация изучаемых нами транскрипционных факторов и сигнальных молекул, координированная работа которых инициирует и контролирует нормальное развитие сетчатки. Наши данные, сопоставленные с имеющимися в литературе, свидетельствуют о том, что регуляторные гены *Rax6*, *Otx2*, *Six3*, *FGF2*, *TGFβ2*, *Pitx2* участвуют в формировании сети взаимодействий, которая не только контролирует трансдифференцировку клеток пигментного эпителия – ключевую стадию регенерации сетчатки, но также и последовательные стадии ее восстановления.

Работа поддержана РФФИ (проект № 08-04-00462).

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ОПУХОЛИ WALKER 256 ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КРЫСАМ BRATTLEBORO

© 2009 г. М. А. Афанасьева

Лаборатория гистогенеза

Крысы Brattleboro характеризуются отсутствием синтеза и секреции вазопрессина в гипоталамусе и являются ценной моделью для изучения взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем. Ранее мы обнаружили устойчивое снижение темпов роста линейно-неспецифической карциномы Walker 256 у крыс Brattleboro по сравнению с физиологически нормальными крысами WAG. При повторном введении клеток Walker 256 крысам Brattleboro опухоль не возникала, что свидетельствует о непосредственном участии иммунной системы в обнаруженном феномене. Специфический иммунный ответ невозможен без эффективного представления опухолевых антигенов. Так как одними из ключевых участников этого процесса являются протеасомы, мы с помощью метода Вестерн-блоттинга исследовали динамику содержания тотального пула протеасом, иммунных протеасом, 19S-субчастицы 26S-протеасом и активатора протеасом белка PA28 в клетках опухоли Walker 256 после ее трансплантации крысам Brattleboro и WAG.

В опухоли, привитой крысам Brattleboro, в отличие от таковой у крыс WAG общее содержание протеасом постепенно уменьшалось: на 27 и 23% в период с 7-х по 14-е и с 14-х по 24-е сут после прививки соответственно. Белок Rpt6, маркер 19S-субчасти-

цы, которая является частью 26S-протеасомы и осуществляет распознавание и подготовку убиквитинированных белков к гидролизу, практически не выявлялся в опухоли у крыс Brattleboro начиная с 14-х сут. В опухоли у крыс Brattleboro к 7-м сут после прививки уровень иммунной субъединицы LMP7 был снижен почти вдвое по сравнению с опухолью у крыс WAG. Однако к 14-м сут он возрастал в два раза. Подобная динамика наблюдалась и в отношении иммунных субъединиц LMP10 и LMP2. В опухоли у крыс WAG динамика была обратной: наблюдалось снижение (на 45%) в период с 7-х по 14-е сут и возрастание (на 50%) с 14-х по 24-е сут. В отношении активатора PA28 отличия между линиями животных были слабо выражены.

По-видимому, в клетках опухоли Walker 256 у крыс Brattleboro иммунные 20S-протеасомы в комплексе с активатором PA28 или без него образуют антигенные эпитопы и способствуют обнаружению и уничтожению этих клеток иммунной системой.

Увеличение уровня конститутивных 26S-протеасом наряду с уменьшением содержания иммунных протеасом в опухоли у крыс WAG к 14-м сут обеспечивают ее активный рост и уход из-под иммунного надзора.

ОСОБЕННОСТИ ЭМБРИОГЕНЕЗА МУТАНТОВ *leg-arista-wing complex* С НАРУШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ TRF2 У *Drosophila melanogaster*

© 2009 г. Н. В. Бурдина

Лаборатория генетических основ морфогенеза

Ген *leg-arista-wing complex/TBP related factor 2 (lawc/trf2)*, кодирующий фактор базовой транскрипции дрозофилы, продуцирует две изоформы белка – полноразмерную и укороченную. Мы исследовали зиготическую и материнскую функции гена, используя изолированные гипоморфные летальные аллели с нарушенной экспрессией каждого из его продуктов.

Фенотип погибших эмбрионов показал, что небольшое нарушение концентрации любой из изоформ белка LAW/TF2 в слабых аллелях приводит к неправильному формированию вен-

тральной борозды. Этот процесс, очевидно, наиболее чувствителен к колебаниям уровня экспрессии гена *lawc/trf2*, более сильные аллели дополнительно вызывают нарушения сокращения зародышевой полоски и спинного закрытия. Эти процессы связаны с морфогенетическим движением и зеркально отражают ранозаживление у позвоночных, при котором обнаженная мезодермальная ткань покрывается эпителиальными клетками. Экспрессия полноразмерной изоформы специфически контролирует нейрогенез, воз-

можно, через активацию сигнального пути *Notch*, так как погибшие эмбрионы из линий со сниженной экспрессией этой изоформы проявляют нейрогенный фенотип, а исследование их нервной системы выявляет ее гипертрофию, характерную для мутантов гена *Notch*. Мы показали, что особой функцией в эмбриогенезе обладает эволюционно переменный N-концевой отдел полноразмерной изоформы белка LAWC/TRF2. Его экспрессия необходима для миграции и слияния трахейных ветвей при формировании дыхательной системы зародыша. Исследуя материнскую функцию *lawc/trf2*, мы обнаружили, что ее недостаток приводит к асинхронным делениям ядер эмбрионального синцития, в результате чего у

эмбрионов происходит дезорганизация полярных структур.

Таким образом, несмотря на то что продуктом *lawc/trf2* является один из трех известных на данный момент у дрозофилы факторов базовой транскрипции, нарушение его зиготической и материнской экспрессии вызывает хотя и сильные, но весьма специфические дефекты. Главным образом они связаны с нарушением либо синхронных делений дробления, либо миграции и движения эпителиальных клеток, в основе которых лежат скоординированные изменения их формы и размера.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ РЯДА РЕГУЛЯТОРНЫХ И ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ СЕТЧАТКИ И ПЕРЕДНЕГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В РАЗВИТИИ И В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

© 2009 г. Б. И. Вердиев

Лаборатория экспериментальной нейробиологии

Процессы развития неокортекса и сетчатки глаза во многом сходны. Обе структуры формируются из нейроэпителия переднего мозгового пузыря. Неокортекс и сетчатка являются ламинарными структурами, в которых в ходе морфогенеза используется сходный механизм гетерохронии и радиальной миграции нейробластов по отросткам клеток радиальной глии. Механизмы, лежащие в основе этих процессов, и факторы, регулирующие их, мало изучены, поэтому целью работы был сравнительный анализ экспрессии ряда регуляторных и тканеспецифических генов в ходе нормального развития и в культуре клеток неокортекса мозга и сетчатки с помощью методов ПЦР и иммуногистохимии.

Ранее методом ПЦР было показано, что в начале нейрогенеза (9 нед развития, нр) кора мозга и сетчатка эмбриона человека сходны по паттерну экспрессии исследованных регуляторных факторов *Rax6*, *Oct4* и *NANOG*. В конце нейрогенеза (20 нр) в переднем мозгу уже не выявляются регуляторные гены плюрипотентного статуса, а в сетчатке сохраняется прежний паттерн. Для уточнения полученных результатов применили метод количественной ПЦР как более чувствительный по сравнению с ПЦР. кДНК-библиотеки синтезировали на обработанной ДНКазой тотальной РНК с использованием

олиго-дТ-праймера. Контроль отсутствия геномной ДНК проводили до и после обработки ДНКазой, а также после реакции обратной транскрипции.

Поскольку проблемой в исследовании эмбрионального материала является его гетерогенность, нужно было подобрать оптимальный эндогенный контроль. Для этого мы провели сравнительный анализ между часто используемыми генами: *18S*, β -актином и *GAPDH*. Наиболее подходящим оказался *GAPDH*, так как имел наименьший разброс уровня экспрессии в исследованных образцах. Далее анализировали экспрессию транскрипционных факторов *Rax6*, *Oct4* и *NANOG* в эмбриональных сетчатках 9, 11, 12 и 18 нр и в неокортексе эмбрионального мозга 9, 11, 12 и 20 нр. Экспрессия генов *Oct4* и *NANOG* выявлялась во всех исследованных образцах примерно на равном уровне, имея тенденцию к небольшому увеличению на поздних стадиях эмбрионального развития. Экспрессия *Rax6* присутствовала во всех образцах, но в сетчатке она была значительно более высокой, чем в неокортексе мозга. Полученные результаты подтвердили и дополнили полученные ранее с помощью ПЦР.

Работа поддержана РФФИ (проект № 08-04-00081а).

ЭКСПРЕССИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ 5НТ-РЕЦЕПТОРОВ В АОРТЕ И БРЫЖЕЕЧНОЙ АРТЕРИИ КРЫСЫ

© 2009 г. А. Г. Давыдова

Лаборатория общей физиологии им. Х.С. Кошоянца

Серотонин (5НТ) относится к числу наиболее уникальных эндогенных регуляторных факторов. Он одновременно выполняет функции нейромедиатора и гормона общего и локального действия. Эффекты 5НТ осуществляются, по крайней мере, через 15 видов рецепторов, локализованных в центральной нервной системе и других органах и тканях. Многие из 5НТ-рецепторов выявлены в кровеносной системе, но при этом их функциональная роль до конца не ясна. Остается также неизученным вопрос, каким образом осуществляется регуляция активности 5НТ-рецепторов в кровеносных сосудах. Цель нашего исследования – определение функциональной активности различных видов 5НТ-рецепторов в аорте и брыжеечной артерии крысы, оценка уровня их экспрессии и выявление факторов, влияющих на индуцированное 5НТ сокращение сосудов.

Работа выполнена на крысах-самцах Вистар массой 200–220 г. Измерение силы сокращения изолированных колец сосудов проводили в изометрическом режиме. Для определения функциональной значимости отдельных видов 5НТ-рецепторов были использованы их селективные агонисты и антагонисты. Методом ОТ-ПЦР в аорте крысы выявлена экспрессия 5НТ1А, 5НТ1В и 5НТ1D-рецепторов. Уровень экспрессии 5НТ1D-рецепторов был значительно ниже уровня экспрессии остальных рецепторов 5НТ1-типа. Количественная ОТ-ПЦР показала высокое содержание мРНК рецепторов 5НТ2А и низкое – 5НТ2В. Подтверждено, что 5НТ вызывает сокращение аорты и брыжеечной арте-

рии крысы, действуя через 5НТ2А-рецепторы. Его констрикторный эффект полностью подавляется блокатором 5НТ2А-рецепторов кетансерином. Обнаружено, что агонисты 5НТ1В, 5НТ1D, 5НТ2В и 5НТ4-рецепторов вызывают расслабление сосудов. Характер действия 5НТ1А-рецепторов оказался более сложным: агонист 5НТ1А-рецепторов 8-ОН-DPAT расслаблял сосуды, предсокращенные норадреналином, и, напротив, вызывал их сокращение в присутствии эндотелина-1. По-видимому, констрикторные 5НТ1А-рецепторы локализованы в гладкомышечных клетках сосудов и являются так называемыми “молчащими” рецепторами, которые демаскируются при активации ЕТА-рецепторов. Из этого следует, что при активации рецепторов других вазоконстрикторных гормонов констрикторные эффекты 5НТ опосредуются не только 5НТ2А-, но и 5НТ1А-рецепторами. Стимуляция потенциалуправляемых кальциевых каналов с помощью 15 мМ КСl усиливала вазоконстрикторное действие 5НТ благодаря восполнению внутриклеточных запасов кальция, но при этом не происходило демаскировки 5НТ1А-рецепторов, и констрикторное действие серотонина было опосредовано 5НТ2А-рецепторами. Предположено, что активация “молчащих” 5НТ1А-рецепторов происходит в результате их непосредственного взаимодействия с рецепторами других вазоконстрикторных гормонов путем гетеродимеризации.

Работа поддержана РФФИ (проект № 07-04-01443) и SCOPES (проект IB74AO-110940).

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК ИЗ АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА

© 2009 г. Д. А. Давыдова

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Известно, что амниотическая жидкость содержит различные типы клеток эмбрионального и фетального происхождения, большинство из которых дифференцированы и обладают низким пролиферативным потенциалом. Однако в последнее время появились данные о присутствии в амниотической жидкости стволовых клеток, способных к длительной пролиферации *in vitro* и

дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Цель работы – выделение клеток из амниотической жидкости человека и выявление их дифференцировочного статуса.

Клетки, выделенные из амниотической жидкости двух пациентов, помещали в условия *in vitro* и охарактеризовывали с помощью методов иммуногистохимии, проточной цитофлуориметрии и

ПЦР. Полученные результаты показали, что клетки от обоих доноров характеризуются экспрессией маркеров мезенхимного (CD90, CD73, CD105, CD13, CD29, CD44, CD146), нейрального (β 3-тубулин, нестин, Pax6), а также эпителиального (K19, P63) типов дифференцировки. Кроме того, показана экспрессия этими клетками маркеров плюрипотентности – *Oct4* и *Nanog*. Трансплантация клеток иммунодефицитным животным не приводит к образованию тератом. При культивировании клеток амниотической жидкости в адипогенной среде в них наблюдается накопление липидных капель, что подтверждается с помощью окраски Oil Red O. Также показана дифференцировка этих клеток в остеогенном направлении: образуются кальцификаты, окраши-

вающиеся красителем Alizarin Red S, появляется активность фермента щелочной фосфатазы и экспрессия раннего маркера остеогенеза – остеоонектина. При культивировании клеток амниотической жидкости в трехмерном коллагеновом матриксе в течение первых 5–7 сут не происходит контракции геля, что отличает эти клетки от мезенхимных стволовых. В то же время клетки в геле пролиферируют и образуют различающиеся по форме многоклеточные структуры.

Полученные данные позволяют предположить, что выделенные клетки обладают широкими дифференцировочными и морфогенетическими потенциями.

ВЛИЯНИЕ НОРАДРЕНАЛИНА НА РАЗВИТИЕ ГИПЕРПРОЛАКТИНЕМИИ ПРИ ДЕГЕНЕРАЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ АРКУАТНОГО ЯДРА У ВЗРОСЛЫХ КРЫС

© 2009 г. Л. К. Дильмухаметова

Лаборатория гормональных регуляций

Дофаминергические нейроны аркуатного ядра оказывают ингибирующее влияние на секрецию пролактина лактотрофами передней доли гипофиза. В свою очередь, дофаминергические нейроны туберо-инфундибулярной системы находятся под ингибиторным контролем норадренергических нейронов ствола мозга. Снижение секреции дофамина приводит к гиперпролактинемии, которая со временем в редких случаях компенсируется. При моделировании гиперпролактинемии используют нейротоксин 6-гидроксидофамин (6-ГДА). Однако 6-ГДА вызывает дегенерацию не только дофаминергических, но и норадренергических нейронов. Для предотвращения гибели последних применяется десметилимипрамин (ДМИ) – ингибитор обратного захвата норадреналина. Цель работы – определить роль норадренергической иннервации дофаминпродуцирующих нейронов в развитии гиперпролактинемии, вызванной дегенерацией дофаминергических нейронов аркуатного ядра.

После введения 6-ГДА с ДМИ определяли концентрацию пролактина в крови и гипофизе, содержание катехоламинов в аркуатном ядре и уровень экспрессии D2-рецепторов в гипофизе. Учитывая, что дофаминергические нейроны аркуатного ядра характеризуются низким уровнем захвата дофамина и 6-ГДА, в качестве контроля

эффективности действия нейротоксина использовали дофаминергические нейроны нигростриатной системы с высоким уровнем захвата дофамина и 6-ГДА. После введения 6-ГДА с ДМИ в аркуатном ядре на 14-е сут наблюдается снижение уровня норадреналина в два, а на 45-е – в четыре раза по сравнению с контролем. Уровень дофамина на 14-е сут снижается в два с половиной, а на 45-е – в десять раз. При этом концентрация пролактина в крови по сравнению с контролем на 14-е сут повышается в 2.3 раза и продолжает расти, увеличиваясь в 2.4 раза на 45-е сут. Уровень диоксифенилаланина в аркуатном ядре на 14-е сут незначительно повышается, а на 45-е наблюдается его снижение в 2.3 раза по сравнению с контролем. Уровень диоксифенилуксусной кислоты в аркуатном ядре на 14-е сут имеет тенденцию к уменьшению, к 45-м сут снижаясь в 4.5 раза. При этом уровень экспрессии D2-рецепторов в передней доле гипофиза в опыте по сравнению с контролем как на 14-е, так и на 45-е сут не меняется. Итак, введение 6-ГДА с ДМИ приводит к снижению уровня дофамина в ткани аркуатного ядра и повышению уровня пролактина в крови. При этом гиперпролактинемия на фоне незначительного снижения норадреналина продолжает усиливаться в течение исследованного периода. Таким образом, норадреналин ингибирует

развитие компенсаторных механизмов, которые активизируются при гиперпролактинемии, возник-

шей вследствие дегенерации дофаминергических нейронов аркуатного ядра.

ВОЗМОЖНЫЕ СЕРОТОНИНАКТИВИРУЕМЫЕ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ РАННЕГО РАЗВИТИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2009 г. Е. Г. Ивашкин

Лаборатория сравнительной физиологии

Участие нейромедиаторов в донервной регуляции раннего развития известно достаточно давно. Присутствие серотонина (5-НТ) уже на стадии оплодотворенной яйцеклетки и далее до стадий гастрюляции и нейруляции показано для целого ряда животных разной систематической принадлежности. 5-НТ-ергическая система задействована в регуляции таких морфогенетических процессов, как межклеточные взаимодействия и подвижность клеток, поляризация клеток, клеточных пластов и эмбриона в целом. Существует гипотеза, согласно которой 5-НТ, являясь нейромедиатором и гуморальным фактором, в обоих случаях выполняет сходную роль – передачу сигнала между близко расположенными клетками, поэтому логично предположить гомологию внутриклеточных регуляторных механизмов, активируемых 5-НТ, в клетках, участвующих в различных физиологических процессах на разных стадиях жизненного цикла животных.

Одним из важных путей реализации ответа клетки на 5-НТ является активация или ингибирование каскадов MAPK (mitogen-activated protein kinase). Для нервных клеток показана непосредственная связь активации 5-НТ-рецепторов с работой каскадов MAPK p38 и ERK1/2. Есть данные о связи 5-НТ и MAPK-каскадов в развитии кардиоваскулярной системы и дифференцировке хрящевой ткани у млекопитающих. Экспериментальных работ, прямо указывающих на связь каскадов MAPK и 5-НТ-ергической системы в раннем развитии, нет. В нашей лаборатории ранее

было обнаружено, что период активации ERK1/2 (MAPK p42 и p44) в дроблении большого прудовика совпадает с периодом чувствительности к предшественнику 5-НТ, вызывающему экзогастрюляцию. У морского ежа блокада ERK-каскада также приводит к экзогастрюляции.

Одной из удобных и сравнительно хорошо изученных модельных систем раннего развития является костистая рыба данио. Блокада экспрессии генов *ERK1* и *ERK2* в зародышах данио показала их важную роль в образовании дорсально-вентральной поляризации и последующей миграции клеток, инициации дифференцировки мезодермы и энтодермы. MAPK p38 у данио появляется еще до начала стадии дробления и диффузно распределена в бластодиске. При этом иммуноцитохимическое окрашивание активной (дифосфорилированной) формы p38 на стадиях 2–4 бластомеров локализуется на одном краю бластодермы, являющемся презумптивной дорсальной стороной зародыша. Блокада активации или трансляции p38 нарушает дробление на том краю бластодиска, где ранее выявлялась активная форма p38. Однако роль 5-НТ в регуляции раннего развития рыб ранее не изучалась. Мы предполагаем изучить паттерны распределения 5-НТ и 5-НТ-рецепторов, их связь с активацией MAPK-каскадов и последующими морфологическими изменениями в дробящихся зародышах данио, используя методы биохимии, фармакологического анализа и иммуноцитохимического маркирования.

АНАЛИЗ АФФЕРЕНТНОЙ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ ИННЕРВАЦИИ СТРИАТУМА НА МОДЕЛИ ДОСИМПТОМНОЙ СТАДИИ ПАРКИНСОНИЗМА У МЫШЕЙ

© 2009 г. Е. А. Козина

Лаборатория гормональных регуляций

Дофаминергическая нигростриатная система является ключевым звеном в регуляции двига-

тельного поведения. Тела дофаминергических (ДА-ергических) нейронов расположены в ком-

пактной части черной субстанции (ЧС), а их аксоны, образующие нигростриатный тракт, иннервируют нейроны стриатума. При дегенерации ДА-ергических нейронов ЧС и возникновении дефицита ДА в стриатуме развивается болезнь Паркинсона (БП). При БП первые клинические симптомы проявляются при дегенерации 70% ДА-ергических нейронов ЧС и падении уровня ДА в стриатуме на 80–90%. Начальные этапы заболевания остаются клинически бессимптомными за счет развития компенсаторных механизмов. Цель исследования – изучение ДА-ергической нигростриатной системы при моделировании начальной фазы до-симптомной стадии БП путем однократного подкожного введения мышам линии C57BL/6 нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) в дозе 12 мг/кг. Контрольным животным подкожно вводили такой же объем физраствора (0.9%-ный NaCl). Для оценки деафферентации стриатума проводили иммуногистохимическое выявление ДА-ергических волокон стриатума по ферментам синтеза ДА – тирозингидроксилазе (ТГ) и декарбоксилазе ароматических аминокислот (ДАА). Анализ проводили в дорсальной области стриатума на всем его протяжении в ростокаудальном направлении. На каждом оптическом срезе

стриатума, полученном с помощью конфокальной микроскопии, оценивали: а) количество биферментных терминалей [ТГ(+)/ДАА(+)]; б) количество моноферментных ТГ-иммунореактивных [ТГ(+)/ДАА(–)] терминалей; в) количество моноферментных ДАА-иммунореактивных [ТГ(–)/ДАА(+)] терминалей; г) суммарную площадь иммунореактивных структур; д) средний размер терминали. Было показано, что у животных на 14-е сут после введения МФТП при отсутствии двигательных изменений наблюдалось достоверное уменьшение (в два раза) количества биферментных [ТГ(+)/ДАА(+)] и моноферментных [ТГ(–)/ДАА(+)] терминалей по сравнению с контролем. Количество моноферментных [ТГ(+)/ДАА(–)] терминалей в опыте практически не отличалось от такового в контроле. Анализ размеров иммунореактивных структур показал, что после введения МФТП происходит уменьшение общей площади биферментных [ТГ(+)/ДАА(+)] и моноферментных [ТГ(–)/ДАА(+)] терминалей по сравнению с контролем. Исходя из общего числа терминалей каждого типа и их суммарной площади рассчитан средний размер терминалей в опыте и в контроле. После введения МФТП средний размер терминалей достоверно не изменился.

МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МИОБЛАСТОВ C2C12 МЫШИ

© 2009 г. А. М. Красный

Лаборатория биофизики развития

Для анализа процессов клеточной дифференцировки удобной моделью являются миобласты, которые после многократных делений начинают сливаться, образуя многоядерные миотубы, превращающиеся впоследствии в миофибриллы. Важная регуляторная роль в этих процессах отводится внутриклеточному кальцию.

В связи с этим был исследован механизм внутриклеточной кальциевой сигнализации в процессе дифференцировки миобластов C2C12 мыши.

Миобласты мыши C2C12, находясь на стадии пролиферации, не имеют ни потенциалозависимых кальциевых каналов, ни выраженного запаса кальция в эндоплазматическом ретикулуме, что подтверждается отсутствием кальциевых ответов на среду с высоким содержанием KCl и на АТФ в бескальциевой среде. Вход кальция в клетку про-

исходит только при активации P2X-рецепторов при воздействии АТФ. Примерно через 6 ч после начала дифференцировки, вызываемой сменой среды культивирования, в клетках синтезируются потенциалозависимые каналы и появляется ответ на KCl.

Через 8 ч после начала дифференцировки полностью формируется механизм накопления и высвобождения кальция из эндоплазматического ретикулума. Об этом свидетельствует выраженный кальциевый ответ на АТФ в бескальциевой среде. Вход кальция через SOC-каналы можно выявить при смене бескальциевой среды на среду, содержащую кальций, при опустошенном при помощи АТФ ретикулуме.

При сравнении скорости удаления кальция из цитоплазмы на разных этапах дифференцировки

можно отметить, что после формирования механизма накопления и высвобождения кальция из эндоплазматического ретикулаума она увеличивается в два раза и остается неизменной в течение последующих этапов дифференцировки. При ингибировании АТФаз эндоплазматического ретикулаума тапсигаргином в наномолярной концентрации кальциевый ответ отсутствует. При этом в одноклеточных клетках, находящихся в стадии

дифференцировки более 8 ч, скорость удаления кальция из цитоплазмы уменьшается в два раза, что свидетельствует о почти полном ингибировании АТФаз эндоплазматического ретикулаума. В миотубах при воздействии тапсигаргином скорость удаления кальция уменьшается в четыре раза. Таким образом, дифференцировка миобластов сопровождается заметным изменением кальциевой сигнализации.

МОДИФИКАЦИЯ КЛЕТОК ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ *in vitro*

© 2009 г. Л. А. Милюшина, Р. А. Полтавцева, О. В. Подгорный, М. А. Александрова

Лаборатория экспериментальной нейробиологии

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.

Цель работы – 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%-ной 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 и N-кадгерин. Клетки фибробластоподобной морфологии отличались наличием более широкого спектра маркерных белков. Некоторые из них давали положительную окраску при использовании маркера нейральной дифференцировки нестина, другие – β -III-тубулина и реверина, однако не было обнаружено реакции на белки Oct4 и Рах6.

В среде DMEM/F12, содержащей факторы FGF, EGF и 1%-ный FBS, клетки ПЭ, выделенные на стадии 11.5 нр вели себя по-разному. Часть клеток прикреплялась ко дну флакона, а другие формировали свободно плавающие 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 β -III-тубулина и реверина. Окраски антителами против Oct4 не наблюдалось. В клетках, растущих в виде сфер, на 2-е сут после прикрепления ко дну культурального флакона выявлялась отчетливая иммуноцитохимическая окраска на Oct4, β -III-тубулин и реверин, а на 9-е сут – и на Рах6. При культивировании в среде с вышеуказанными факторами на 9-е сут сохранялись единичные клетки с окраской на Oct4 в отличие от культур, растущих на среде DMEM/F12 с добавлением 10% FBS.

Результаты показали, что популяция клеток ПЭ, выделенных на стадии 9–11.5 нр гетерогенна. *In vitro* ответ клеток различен: одни продолжают дифференцировку в ПЭ, другие развиваются в нейральном направлении, например фоторецепторном. Факторы FGF и EGF, с одной стороны, способствуют модификации клеток ПЭ глаза человека, что выражается в усилении пролиферации и увеличении числа Рах6-, β -III-тубулин- и реверин-позитивных клеток, с другой – в сохранении немногочисленной популяции клеток ПЭ со свойствами стволовых.

ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЕ ПОТЕНЦИИ НЕАДГЕЗИВНЫХ И АДГЕЗИВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ КОСТНОГО МОЗГА КРЫСЫ

© 2009 г. Е. А. Молчанова

Лаборатория гистогенеза

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) костного мозга привлекают к себе пристальное внимание в связи с их способностью к самоподдержанию и дифференцировке в различные типы клеток соединительной и других тканей. Культуру МСК характеризует способность осуществлять под влиянием индукторов остеогенную, адипогенную, хондрогенную дифференцировки, клеточный иммунотип – экспрессия поверхностных маркеров CD90, CD73, CD105 – и адгезия к поверхности культурального пластика, которая используется для их первоначального выделения из взвеси кроветворных клеток и дальнейшего роста в культуре. Общепринято, что за срок от 90 мин до 72 ч все клетки, обладающие свойствами мезенхимных стромальных предшественников, прикрепляются к пластику. Мы показали, что в культурах МСК из органов миелоидного кроветворения крысы к поверхности культурального флакона прикрепляется только часть МСК (колониеобразующие единицы фибробластов, КОЕ-Ф), а оставшиеся в суспензии клетки не теряют своей клоногенной способности при длительном культивировании. Это позволило нам предложить метод разделения МСК на субпопуляции, основанный на их адгезии к пластику. Неадгезивная популяция является источником последующих адгезивных субпопуляций. Цель работы – охарактеризовать полученные клеточные субпопуляции по потенциям к остеогенной и адипогенной дифференцировкам в сравнении с первичной культурой МСК, а также оценить их антигенный профиль – экспрессию маркера CD90.

Для изучения потенций к остеогенной и адипогенной дифференцировкам были получены четы-

ре адгезивные клеточные субпопуляции различных сроков культивирования. Для дифференцировки *in vitro* использовали стандартные индуктивные среды для реализации остеогенной и адипогенной дифференцировок. Во всех четырех адгезивных клеточных субпопуляциях на 21-е сут культивирования в остеогенной среде были выявлены минерализованные костные узелки, окрашивающиеся алizarинным красным S. Отмечено, что в четвертой адгезивной субпопуляции формирование клеток типа остеобластов полигональной формы начинается на более ранних сроках дифференцировки по сравнению с остальными субпопуляциями. Гистохимическое окрашивание жировым красным О выявило присутствие во всех четырех адгезивных субпопуляциях адипоцитов разных стадий зрелости – одиночных и в виде групповых скоплений. Адипоциты в виде групповых скоплений преобладали в первой и во второй клеточных субпопуляциях. Число жировых клеток снижалось в четвертой адгезивной субпопуляции.

С помощью иммуногистохимического анализа было показано, что МСК всех четырех адгезивных субпопуляций характеризовались высокой экспрессией поверхностного антигена CD90. Таким образом, адгезивные клеточные субпопуляции, прикрепляющиеся к пластику на разных сроках культивирования *in vitro*, обладают способностью к остеогенной и адипогенной дифференцировке и экспрессируют поверхностный антиген CD90, что характеризует их как клетки, соответствующие критериям МСК и сохраняющие в суспензии свои способности в течение длительного культивирования *in vitro*.

3D-ОРГАНОТИПИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *in vitro* ТКАНЕЙ ГЛАЗА ВЗРОСЛЫХ ТРИТОНА И КРЫСЫ КАК СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПОТЕНЦИЙ КЛЕТОК

© 2009 г. Ю. П. Новикова

Лаборатория проблем регенерации

В настоящее время значительный вклад в поиск потенциальных клеточных источников восстановления сетчатки вносят работы с использованием различных способов культивирования

in vitro либо эксперименты *in vivo* с применением различных повреждающих сетчатку факторов. Мы использовали новый подход в попытке индуцировать пролиферацию и изменение фенотипа

клеток в сетчатке взрослых позвоночных. 3D-органотипическое культивирование *in vitro* позволяет сохранять клеточное окружение, сходное с таковым *in vivo*, проводить длительное культивирование и иметь простор для манипуляций. Мы культивировали изолированную сетчатку, (содержащую, в том числе, и клетки краевой зоны), а также ретинальный пигментный эпителий (РПЭ). Для поиска пролиферативных возможностей отдельных популяций клеток сетчатки позвоночных использованы два объекта – взрослые тритон и крыса, обладающие полярным потенциалом к регенерации.

При культивировании сетчатки тритона *Pl. waltl* наблюдается активная миграция клеток из ростовой зоны (*ora serrata*) внутрь сформированных сетчаткой сфероидов. Эти, а также клетки отдельных минорных популяций в ядерных слоях сетчатки обладали митотической активностью. Отметим, что ранее в экспериментах с длительной отслойкой сетчатки *in vivo* и при иных способах культивирования *in vitro* нам не удавалось регистрировать митозы, несмотря на обнаруженные разными методами (с помощью мечення бромдезоксифуридином и PCNA) клетки в S-фазе. В культивируемых сфероидах сетчатки активная пролиферация приводила к образованию большого пула малодифференцированных клеток, способных к дальнейшим делениям, миграции и замещению погибших клеток, в том числе фоторецепторов. Морфологические и иммунохимические исследования позволяют предварительно отнести пролиферирующие клетки в сетчатке тритона как к прогениторным клеткам ростовой зоны, так и к макро- и микроглии. Изменение распределения в сетчатке GFAP⁺-глиальных клеток (они были локализованы в обоих ядерных слоях культивированной сетчатки) в совокупности с данными по пролиферации свидетельствует об умножении числа этих клеток, их миграции, а также участии в реорганизации и регенерации сетчатки *in vitro*.

При органном роллерном культивировании сетчатки взрослой крысы Вистар на фоне активной миграции клеток наружного ядерного слоя во внут-

ренние слои и их частичной гибели были выявлены как минимум две клеточные популяции, обладающие митотической активностью: резидентные макрофаги и клетки внутреннего ядерного слоя. Последние по своей фенотипической принадлежности мы предварительно относим ко глиальным клеткам. Таким образом, впервые разработанный нами подход оказался хорошим инструментом для активации клеток – возможных источников регенерации сетчатки – и для их сравнения у взрослых низших и высших позвоночных.

При культивировании в составе заднего сектора глаза тритона РПЭ не претерпевал заметных морфологических изменений, закрывался наползающими клетками склеры, но в открытых участках мог экспрессировать паннейральный белок NF200. В присутствии цитокина FGF2 клетки открытых областей РПЭ увеличивали свою пролиферативную активность и теряли пигмент (индекс включения бромдезоксифуридина клетками достигал 70%). При культивировании без склеральной оболочки клетки РПЭ также активно включали бромдезоксифуридин, однако при этом одна часть клеток превращалась в меланофаги, а другая формировала структуру, морфологически напоминающую лентоид – аналог хрусталика *in vitro*.

Клетки РПЭ крысы, культивированного в составе задней стенки глаза, имели тенденцию к вымещению из слоя и претерпевали фенотипические изменения – экспрессировали макрофагальный антиген. В редких случаях клетки РПЭ входили в фазу М. Клеточная гибель при культивировании, выявляемая методом TUNEL, могла достигать 20%. Клетки РПЭ крысы, вымещаясь или сохраняясь в слое, проявляли свойства чистильщиков – фагоцитов. Эти события, происходящие с клетками РПЭ крысы в условиях роллерного культивирования *in vitro*, сходны с теми, что наблюдаются при различных патологиях сетчатки *in vivo* у животных и человека. Кроме этого, выявленные особенности поведения клеток РПЭ крысы *in vitro* отчасти повторяют таковые, обнаруженные при культивировании РПЭ тритона.

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ К РАСПОЗНАВАНИЮ “СВОЙ-ЧУЖОЙ” У БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ГЕКСАПЛОИДОВ РОДА *Barbus*

© 2009 г. Е. Ю. Рыбакова, А. М. Куликов

Лаборатория генетики

В работе использованы популяции с неопределенным видовым статусом рода *Barbus*, обитающие в африканском озере Тана. Условия их обитания

идеально соответствуют изучению симпатрического видообразования: все популяции занимают одну и ту же территорию (нет географических барьер-

ров), нерест происходит примерно в одно и то же время, кормовая база одинакова. Важную роль играет высокая замутненность акватории озера, что позволяет предполагать ведущую роль обоняния как основного механизма, участвующего в хемосенсорной детерминации особей (распознавание “свой-чужой”).

Эксперимент представлен несколькими последовательными этапами, включающими индивидуальное тестирование особей разных популяций. В ходе подготовительной стадии каждого этапа в аквариум с чистой отстоянной водой объемом 20 л помещали тестируемых особей и предоставляли время для адаптации в новых условиях, равное 30 мин. Затем через трубки подачи воды в ламинарном режиме подавали чистую отстоянную воду и воду из аквариума, где находилась оставшаяся часть стаи. Уровень воды в аквариуме всегда был постоянным. В ходе опыта индивидуальной особи предлагалось выбрать чистую воду или воду с “запахом” своей стаи.

Вероятность нахождения рыбы в аквариуме в эксперименте с одной особью морфотипа megastoma. Всего было проведено десять тестирований длительностью 30 мин. Половину из них проводили при атмосферном давлении ниже 745 мм рт. ст., половину – при давлении выше 745 мм рт. ст. При низком атмосферном давлении выявлено достоверное предпочтение “своего запаха” “чужому” ($p < 0.0001$). При высоком атмосферном давлении результаты оказались статистически недостоверными.

Вероятность нахождения рыбы в аквариуме в эксперименте с одной особью морфотипа troutlike. Всего проведено пять тестирований длительностью 45 мин. Три из них проводили при атмосферном давлении ниже 745 мм рт. ст., два – выше. При низком и высоком атмосферном давлении выявлено достоверное предпочтение “чужого запаха” “своему” ($p < 0.0001$), однако во втором случае оно было выражено гораздо сильнее.

Вероятность нахождения рыбы в аквариуме в эксперименте с одной особью морфотипа intermed против “запаха” от морфотипов megastoma и troutlike. Было проведено два тестирования длительностью 30 мин при атмосферном давлении 746 мм рт. ст. Получено достоверное предпочтение “запаха” megastoma ($p < 0.0002$).

Вероятность нахождения рыбы в аквариуме в эксперименте с одной особью морфотипа intermed против “запаха” морфотипов intermed и troutlike. Проведено 11 опытов, каждый длительностью 45 мин, из них шесть при давлении 730–745 мм рт. ст., три – выше 745 мм рт. ст. и два – ниже 730 мм рт. ст. При экстремально низком давлении (ниже 730 мм рт. ст.) получено достоверное предпочтение “чужого запаха” ($p < 0.0001$); при низком (730–745 мм рт. ст.) – достоверное предпочтение “своего запаха” ($p < 0.0001$), а при высоком (выше 745 мм рт. ст.) предпочтение “своего запаха” статистически недостоверно. Различия между результатами при низком и высоком атмосферном давлении статистически достоверно ($p < 0.01$, χ^2 -тест).

Анализ выделенной поверхностной слизи взрослых особей показал, что в исследованных пробах содержатся олигопептиды, массы которых по базе данных соответствуют таковым пептидных лигандов белков главного комплекса гистосовместимости (ГКГ). Спектры, полученные для разных морфотипов, принимавших участие в эксперименте, различны, из чего следует, что содержащиеся в пробах молекулы ГКГ могут служить эффективными химическими маркерами для рыб при различении “своих” и “чужих”.

Основываясь на анализе масс-спектров, можно предполагать, что обнаруженные олигопептиды являются основой индивидуального “запаха” особи и используются в реакциях распознавания “свой-чужой”.

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА УРОВНЯ ГОНАДОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ ГОРМОНА В КРОВИ КРЫС КАК ПОКАЗАТЕЛЬ СТАНОВЛЕНИЯ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА

© 2009 г. Ю. Ю. Сайфетярова

Лаборатория гормональных регуляций

В последние пятнадцать лет получены экспериментальные доказательства того, что нейроны начинают синтезировать и выделять физиологически активные вещества (ФАВ) задолго до фор-

мирования межнейронных синаптических связей и гемато-энцефалического барьера (ГЭБ). На основе этих данных была сформулирована гипотеза о том, что развивающийся мозг до формиро-

вания ГЭБ функционирует как эндокринный орган, секретирующий широкий спектр ФАВ в общую систему циркуляции.

Ранее мы показали, что в периферической крови плодов и новорожденных крыс гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ) содержится в концентрации, достаточно высокой для оказания адекватного физиологического воздействия на периферические мишени, тогда как в крови взрослых животных он не обнаруживается.

Учитывая, что вопрос о времени формирования ГЭБ для ГРГ у крыс остается открытым, первой нашей задачей было определение периода, в течение которого концентрация ГРГ в крови снижается и достигает значений, характерных для взрослых животных. С помощью иммуоферментного анализа была измерена концентрация ГРГ в крови у крыс в предполагаемый период формирования ГЭБ – на 5-е сут постнатального развития (П5), а также на П15, П25 и П36. Концентрации ГРГ в крови у крыс в период между П5 и П15 и между П15 и П25 снижались в два раза, а к П36 падала до неопределяемых значений, что является косвенным показателем по-

степенного становления ГЭБ в течение довольно длительного времени.

Учитывая то, что ГРГ синтезируется не только в мозгу, но и на периферии (гонады, тимус, плацента, молочная железа), необходимо было оценить вклад мозга в общее содержание ГРГ в периферической крови. Поэтому второй задачей была разработка специфического метода избирательного подавления экспрессии гена ГРГ в мозгу у крыс с помощью интерферирующих олигонуклеотидов (siRNA), комплементарных матричной РНК гена ГРГ. С целью поиска наиболее эффективных siRNA синтезирована и тестирована физиологическая активность нескольких вариантов siRNA, нацеленных на блокирование различных участков мРНК ГРГ. При введении крысам на П5 в септо-преоптическую область гипоталамуса только неметилированного варианта siRNA в комплексе с липофектаминоном происходило снижение уровня мРНК нейrogормона на 42% по сравнению с контролем. Далее предполагается усовершенствовать модель (усиление ингибирования уровня мРНК ГРГ) и оценить влияние такого избирательного подавления синтеза ГРГ в мозгу на его уровень в крови.

КОМПЕНСАТОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ, ПРОИСХОДЯЩИЕ В ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ, ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ДОСИМПТОМНОЙ СТАДИИ ПАРКИНСОНИЗМА

© 2009 г. В. Г. Хаиндрава

Лаборатория гормональных регуляций

Болезнь Паркинсона (БП) – это хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся нарушениями двигательной активности (тремором, ригидностью, брадикинезией) и когнитивными расстройствами. Высокая распространенность этого заболевания и большие финансовые расходы на реабилитацию и лечение больных делают это заболевание одним из социально-значимых. Дегенерация дофаминергических (ДА-ергических) нейронов черной субстанции (ЧС) приводит к деафферентации стриатума, что является ключевым звеном патогенеза БП. Этот процесс протекает у больных в течение длительного времени без клинических проявлений, что, вероятно, объясняется включением ряда компенсаторных механизмов, поэтому первые клинические симптомы появляются у больных БП только после дегенерации 80% ДА-ергических нейронов в ЧС, т.е. на поздней стадии развития заболевания. Вследствие этого лечение не настолько эф-

фективно, как могло бы быть на ранних этапах развития болезни.

Цель исследования – изучение компенсаторных процессов в нигростриатной системе на экспериментальной модели досимптомной стадии БП, что позволит разработать методы ранней диагностики и превентивного лечения.

Путем различных схем введения 1-1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) у мышей линии C56/BL была вызвана БП различных стадий. При введении однократно МФТП в дозе 12 мг/кг происходит снижение числа ДА-ергических аксонов в стриатуме на 50, а содержания ДА – на 30%. При этом число тел нейронов и содержание ДА в ЧС не изменяются. При двукратном введении МФТП в той же концентрации с двухчасовым интервалом происходит снижение содержания ДА в стриатуме на 60%. При этом уменьшается число тел нейронов в ЧС на 30% и происходит компенсатор-

ное увеличение содержания ДА в ЧС на 20%. При четырехкратном введении МФТП в указанной дозе с тем же интервалом происходит снижение содержания ДА в стриатуме на 75%. При этом происходит уменьшение числа тел нейронов в ЧС на 40%, компенсаторное увеличение содержания ДА в ЧС на 60% и увеличение оптической плотности тел нейронов ЧС на 25%.

Таким образом мы вызвали доклиническую стадию БП в ранней фазе, характеризующуюся дегенерацией ДА-ергических аксонов в стриатуме и от-

сутствием или незначительным снижением числа ДА-ергических нейронов в ЧС. Так же была смоделирована поздняя фаза, когда уже имеет место значительная дегенерация ДА-нейронов в ЧС, и ранняя фаза клинической БП, при которой уже происходит изменение моторного поведения. При этом происходит увеличение оптической плотности ДА-ергических нейронов ЧС (компенсаторное увеличение содержания фермента синтеза ДА), что приводит к увеличению содержания ДА в ЧС.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА АДГЕЗИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ КОСТНОГО МОЗГА И ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

© 2009 г. О. Н. Хныкова

Лаборатория гистогенеза

Белки внеклеточного матрикса повсеместно распространены в тканях всех живых организмов и играют важную роль в клеточной пролиферации, адгезии и дифференцировке. Изучение их влияния на мезенхимные стромальные клетки (МСК) существенно для выяснения механизмов регуляции дифференцировки этих клеток, создания оптимальных условий при их культивировании и успешного применения в клинических целях. Цель работы – исследование клоногенного роста и остеогенных потенциалов МСК, культивируемых на различных матриксных белках: коллагене типа I, ламинине и фибронектине.

МСК получали из костного мозга половозрелых крыс и из печени 16-суточных зародышей крысы. Как известно, в первичной культуре эти клетки могут быть выявлены как колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф). Для изучения эффективности клонирования и остеогенных потенциалов КОЕ-Ф суспензию клеток костного мозга или эмбриональной печени помещали в пластиковые культуральные флаконы, предварительно покрытые различными белками внеклеточного матрикса; контролем служили пластиковые флаконы без белкового покрытия. Через 7 сут среду с не прикрепившимися за этот срок клетками переносили в новые флаконы, покрытые теми же белками. Число КОЕ-Ф, прикрепившихся и не прикрепившихся в течение 7 сут, оценивали по числу образованных ими колоний, потенциалы к остеогенезу – по активности щелочной фосфатазы (ЩФ), являющейся маркером остеогенных клеток. Было установлено, что большинство КОЕ-Ф из печени зародышей прикрепляются ко всем изученным субстратам за 7 сут, тогда как клетки из костного мозга характеризуются

большой долей КОЕ-Ф, остающихся к этому сроку в суспензии. Оценка активности ЩФ показала, что среди КОЕ-Ф костного мозга, культивируемых на пластике, доля остеогенных клеток достаточно высока, тогда как на фибронектине она существенно ниже, чем на пластике. В популяции клеток из печени зародышей остеогенные потенциалы демонстрируют лишь немногие КОЕ-Ф, и их доля не зависит от субстрата, на котором производится культивирование.

В следующей серии экспериментов было изучено влияние тех же белков внеклеточного матрикса на остеогенную дифференцировку МСК из костного мозга половозрелой крысы в индукционной среде. Измерение площади образовавшихся отложений кальция позволило сделать вывод о подавлении остеогенеза фибронектином.

Сравнительный анализ влияния различных фрагментов фибронектина на образование колоний, активность ЩФ и индуцированный остеогенез в культурах МСК костного мозга показал, что основную роль в прикреплении клеток к этому белку, а также в его ингибирующем влиянии на остеогенные потенциалы МСК играет домен, содержащий RGD-последовательность, тогда как гепаринсвязывающий домен стимулирует адгезию лишь в малой степени и не влияет на остеогенез.

Работа поддержана РФФИ (проект № 06-04-48209) и Программой Президента РФ “Ведущие научные школы” (проект НШ-1134.2008.4).

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИИ АЛЬТЕРНАТИВНОГО ТРАНСКРИПТА ИЗ 5'-ОБЛАСТИ ГЕНА *lawc/trf2* У *Drosophila melanogaster*

© 2009 г. Р.О. Черезов

Лаборатория генетических основ морфогенеза

В последнее время было показано, что в геномах эукариотических организмов часто встречается перекрывание транскрипционных единиц (26.2% среди кодирующих белки генов у *Drosophila melanogaster*). Однако эволюционная и биологическая значимость этого явления остается не совсем ясной. Большинство найденных перекрытий возникает между генами, транскрибируемыми с противоположных цепей одного и того же локуса. Часто в перекрытие вовлекается не кодирующий белок транскрипт. Накапливаются данные о том, что эти антисмысловые транскрипты участвуют во множестве клеточных процессов, таких как геномный импринтинг, инактивация X-хромосомы, альтернативный сплайсинг, сайленсинг генов и метилирование, трансляция.

Ранее у *D. melanogaster* был открыт ген *leg-arista-wing complex/TBP-related factor 2* (*lawc/trf2*), кодирующий альтернативный фактор базовой транскрипции. После установления реальных границ этого гена оказалось, что большинство его аллелей, включая исходный *lawc^{pl}*, локализованы в 5'-нетранслируемом районе, который перекрывается с мРНК гена *CG32711*, имеющего противоположное направление транскрипции. Ранее в нашей лаборатории в результате клонирования области локали-

зации мутации *lawc^{pl}* был получен клон кДНК размером 2723 н.п. (GeneBank #DQ296481). Мы сравнили последовательность этого клона с геномной последовательностью и установили экзон-интронную структуру части гена. Оказалось, что найденный клон кДНК полностью совпадает с транскриптом *CG32711*, но на 1638 н.п. длиннее (далее мы называем его *CG32711-long*). Наличие зоны перекрытия размером 408 нуклеотидов у разнонаправленных транскриптов *lawc/trf2* и *CG32711-long* позволяет предположить, что существует способ регуляции уровня экспрессии гена *lawc/trf2* альтернативным транскриптом *CG32711-long*. Для выяснения его функции был применен метод РНК-интерференции, принцип которого заключается в избирательном посттранскрипционном подавлении экспрессии генов. Для этого необходимо создать конструкции, при экспрессии которых образовывалась бы двухцепочечная РНК, состоящая из двух комплементарных цепей, разделенных петлей. Каждая конструкция соответствует одному из районов транскрипта *CG32711-long* из области, не перекрывающейся с открытой рамкой считывания (ОРС) *lawc/trf2*. На данный момент мы получили две конструкции на основе плазмиды рUAST, в каждую из которых встроена часть ОРС *CG32711* под промотором гена теплового шока *hsp70*.

Сдано в набор 13.03.2009 г.

Цифровая печать

Подписано к печати 08.06.2009 г.

Усл. печ. л. 10.0

Усл. кр.-отт. 1.4 тыс.

Тираж 131 экз.

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Уч.-изд. л. 10.0

Бум. л. 5.0

Зак. 456

Учредители: Российская академия наук,
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Издатель: Академиздатцентр "Наука", 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
Оригинал-макет подготовлен МАИК "Наука/Интерпериодика"
Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099 Москва, Шубинский пер., 6