

УДК 591

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН (29–30 НОЯБРЯ 2012 г.)

DOI: 10.7868/S0475145013040101

МУТАГЕНЕЗ И СТАБИЛЬНОСТЬ РАЗВИТИЯ *DROSOPHILA MELANOGASTER*: ПОСЛЕДСТВИЯ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

© 2013 г. Д. В. Анисифоров

Лаборатория генетики

За прошедшие пятьдесят лет освоения космоса было проделано большое количество экспериментов на биологических объектах. Однако известно очень мало работ, в которых проводилась популяционно-генетическая оценка характера воздействия неблагоприятных факторов космического полета. Поэтому нередко на первый план выходят эксперименты с модельными объектами, например, *Drosophila melanogaster*. Важным аргументом в пользу использования дрозофилы является короткий цикл развития (10–14 суток), а также простота содержания и проведения экспериментальных процедур.

Использование дрозофил дает возможность проверить негативное влияние неблагоприятных факторов космического полета на мутагенез и стабильность развития. В качестве меры стабильности развития животных обычно используется флуктуирующая асимметрия (ФА) – параметр, измеряющий ненаправленные случайные отклонения от билатеральной симметрии. Очевидная биологическая интерпретация и легкость измерения делают этот параметр особенно привлекательным для исследования неблагоприятных факторов космического полета. Однако для модельного объекта – дрозофилы, вопрос об эффекте экстремальных условий на ФА остается открытым. Практически все работы, в которых исследовалось влияние экологических стрессов на ФА, проводились в ла-

бораторных условиях. Целями данного исследования являлись: 1) определение степени воздействия ионизирующего излучения во время космического полета на линии *D. melanogaster* различного происхождения; 2) изучение зависимости ФА исследуемых линий *D. melanogaster* от неблагоприятных факторов космического полета (физические перегрузки, ионизирующее излучение, длительное нахождение в условиях невесомости).

В результате проведения многолетнего эксперимента на линиях *Drosophila melanogaster* различного происхождения была выявлена зависимость характера влияния неблагоприятных факторов на мутагенез от происхождения линий. Например, если в линиях лабораторного содержания происходило достоверное увеличение доли доминантных летальных мутаций (ДЛМ) в 1.5–2.5 раза, причем независимо от уровня гетерозиготности по house-keeping генам, то у потомков мух, отловленных в природе, доля ДЛМ осталась на уровне контроля: космос – 0.025, Земля – 0.027. Исследование стабильности развития посредством измерения ФА формы крыла, и использования методов геометрической морфометрии показало, что неблагоприятные факторы космического полета оказали значимое отрицательное влияние на стабильность развития. Методы классической морфометрии такого результата не показали.

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ МОРФОГЕНЕЗА СЕТЧАТКИ

© 2013 г. И. Н. Болмазова

Лаборатория молекулярно-генетических механизмов онтогенеза

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют, что развитие глаза контролируется иерархией генов, регуляция которых осуществляется строго в пространстве и времени. Для правильного формирования глаза необходима согла-

сованная работа селективно экспрессирующихся транскрипционных факторов семейств Pax/Rx, Pax, Six, Otx, Vsx/Chx и др. На стадии поздней гаструлы/ранней нейрулы глазное поле характеризуется активацией этих генов. Ранее получены дан-

ные, указывающие на определяющую роль гена *Raxb* в развитии глаза у представителей всех изученных систематических групп (Gehring, 1996). В настоящее время большой интерес для исследователей глаза представляют гены семейства *Rx*. Показано, что у эмбрионов мышей с нокаутом гена *mRx* не формируется глазной пузырь, хотя у эмбрионов с мутацией *Small eye* (по *Raxb*) он формируется (Grindley et al., 1995). Предполагается, что *Rx* в генетическом каскаде находится выше *Raxb* (Travis et al., 2004).

Целью данного исследования является пространственно-временная характеристика генов семейств *Rax* и *Vsx/Chx* в ходе морфогенеза сетчатки кур. Гены семейств *Rax/Rx* и *Vsx/Chx* играют важную роль в морфогенезе сетчатки. Структура этих генов позвоночных и беспозвоночных довольно консервативна. Количество генов варьирует у разных видов. Паттерн экспрессии *этих генов у разных видов сходен, но не идентичен. С мутациями генов Rax/Rx и Vsx/Chx связывают возникновение микрофтальмии, катаракты и др. аномалий развития глаза. В настоящее время с помощью ПЦР – ана-*

лиза со специфическими праймерами нами идентифицированы транскрипты *sRaxL* в сетчатке эмбрионов кур с 6 по 18 сут развития. Экспрессия *Vsx2* выявляется на 4–18 сут. Уровень экспрессии имеет тенденцию к увеличению с 4 по 8 сут, и сопоставим с таковым гена маркера фоторецепторов родопсином (*RHO*). Методом иммуногистохимии экспрессия другого члена семейства *Rax*, *sRax*, наблюдается на ранних стадиях развития эмбрионов кур: 3–5 сут – во всей не дифференцированной сетчатке, к 7 сут – в основном в ганглиозных клетках, а на 8 сут – в периферической сетчатке. На более поздних стадиях наличие белка *sRax* не выявлено. Полученные данные могут указывать на участие *sRax* в регуляции дифференцировки ганглиозных клеток. Дальнейшие исследования генов семейств *Rax/Rx* и *Vsx/Chx* необходимы для понимания генетического контроля формирования сетчатки позвоночных и причин возникновения аномалий развития глаза.

Программа президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”, РФФИ № 11-04-00728.

ЖАСМОНОВАЯ КИСЛОТА ВЫЗЫВАЕТ УСИЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА И ИНДУКЦИЮ АПОПТОЗА В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЭПИДЕРМОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2013 г. М. С. Вильданова, М. Г. Фомичева, Г. Е. Онищенко, Е. А. Смирнова

МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра клеточной биологии и гистологии

Жасмоновая кислота – растительный гормон, участвующий в ответе растений на повреждение или внедрение патогена и оказывающий физиологическое действие на клетки животных. Известно, что жасмоновая кислота селективно подавляет пролиферацию некоторых типов трансформированных клеток млекопитающих, вызывая их гибель по митохондриальному пути, однако механизмы действия данного агента в клетках эпидермоидного происхождения изучены недостаточно хорошо. В качестве объектов исследования использовались культивируемые клетки эпидермоидной карциномы человека А431 и кератиноциты НаСаТ. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста после 24 ч инкубации клеток в присутствии разных концентраций растительных гормонов. Анализ данных показал, что жасмоновая кислота в концентрации 2 мМ вызывала гибель около 30% популяции клеток А431 и НаСаТ. На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозинном, было установлено, что наблюдаемый тип клеточной гибели – апоптоз. Однако на иммуноцитохимическом уровне показано, что выхода цитохрома С из митохондрий не происходит, и гибель

клеток не сопровождается повышением содержания активных форм кислорода. Эти данные свидетельствуют о том, что апоптоз идет не по митохондриальному пути. Механизм апоптоза может быть обусловлен стрессом вакуолярной системы, на что указывают изменения морфологии ЭПР и комплекса Гольджи, выявленные на иммуноцитохимическом и ультраструктурном уровне. Однако данные, полученные с помощью метода Click-It (Click-It АНА Alexa Fluor 488 Protein Synthesis HCS Assay), показывают, что при действии жасмоновой кислоты в обеих клеточных линиях в 2 раза возрастает интенсивность белкового синтеза, следовательно изменения в морфологии ЭПР могут быть не связаны с его стрессом.

Полученные результаты показывают, что жасмоновая кислота подавляет пролиферацию клеток А431 и НаСаТ и вызывает их гибель, которая сопровождается усилением общего белкового синтеза. При этом наблюдается клеточная гибель по типу апоптоза, который происходит не по митохондриальному пути.

НАРУШЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ ЭЛЕМЕНТОВ ЦИТОСКЕЛЕТА ИНГИБИРУЕТ ПРОЦЕССЫ КЛЕТОЧНОГО КАННИБАЛИЗМА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ A431

© 2013 г. А. С. Гаранина, Г. Е. Онищенко

МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра клеточной биологии и гистологии

В многоклеточных организмах пролиферация и гибель клеток тщательно скоординированы. У человека дисбаланс в этих процессах может привести к различным заболеваниям. Помимо достаточно хорошо охарактеризованного апоптоза, в последние годы внимание ученых привлечено неапоптотический процесс гибели клеток – клеточный каннибализм (КК). Существует гипотеза, что в основе КК лежит активное проникновение одной клетки внутрь другой за счет акто-миозинового сокращения. Однако эти данные получены лишь на клетках, находящихся в суспензии. В связи с этим целью работы было исследовать роль цитоскелета в процессе КК в субстратзависимой культуре клеток эпидермоидной карциномы человека A431. В работе использованы методы световой, флуоресцентной, конфокальной, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии (ТЭМ и СЭМ). При исследовании актинового цитоскелета клеток выявлено, что на ранних стадиях КК в местах контакта поглощенной и поглощающей клеток присутствуют области с высоким содержанием актина. На основании данных, полученных методом СЭМ, предложен гипотетический механизм внедрения одной клетки в другую за счет прикреп-

ления клетки-жертвы к поверхности каннибала и ее погружения в глубокую впадину (кратер) в теле последней. После этого клетка-каннибал формирует псевдоподию, которая закрывает данный кратер сверху. Для установления роли актиновых микрофиламентов и микротрубочек в процессах внедрения одной клетки в другую мы обрабатывали культуру цитохалазином В и нокодазолом, нарушающими сборку этих элементов цитоскелета соответственно. Воздействие каждым из этих агентов привело к полному исчезновению клеток-каннибалов. После отмывки цитохалазина В наблюдалось постепенное увеличение картин КК. Таким образом, можно предположить, что в процессах внедрения одной клетки в другую участвуют как актиновый цитоскелет, так и система микротрубочек. Нами обнаружено, что микротрубочковый цитоскелет также участвует в перераспределении мембранных органелл при КК и, видимо, обеспечивает везикулярный транспорт для увеличения клеточной поверхности, необходимого при внедрении одной клетки в другую.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 11-04-01518-а).

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ IGF1-ЗАВИСИМОГО ПУТИ ПРИ РАЗВИТИИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ

© 2013 г. Л. С. Зиневич

Лаборатория молекулярно-генетических механизмов онтогенеза

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) – широко распространенное онкологическое заболевание, характеризующееся быстрой прогрессией, устойчивостью к терапии и неблагоприятным прогнозом. Исследование молекулярно-генетических механизмов развития ГК имеет большое фундаментальное и практическое значение. Известно, что многие первичные опухоли в разных органах вызывают повышение уровня инсулиноподобного ростового фактора 1 типа (Igf1) в крови больных. Механизм данного явления не ясен, но поскольку печень является одним из основных источников Igf1 в организме, предполагается, что первичные опухоли стимулируют выработку Igf1 печенью (Pollak M., 2012). ГК, напротив, характеризуется пониженным содержанием Igf1 в крови (Wu, Zhu, 2011). Однако нами было показано ранее, что в экспериментальной модели ГК у мышей экспрессия Igf1 в опухо-

ли снижалась, а в окружающей опухоль ткани достоверно возрастала (Зиневич, Микаелян, 2012).

Целью данной работы было изучение паракринной и эндокринной функции Igf1 в развитии химически индуцированной ГК у мышей линии C57B6. Для этого была исследована экспрессия локально-активной и циркулирующей изоформ Igf1 в опухоли печени и окружающей ее ткани методом ОТ-ПЦР. Также методом ОТ-ПЦР в реальном времени измеряли общую экспрессию гена Igf1 при остром повреждении и регенерации печени и экспрессию некоторых других генов-участников сигнального каскада Igf1 при развитии ГК. Исследование экспрессии изоформ Igf1 не выявило явного преобладания эндокринной или паракринной функции Igf1 в регуляции ГК, поскольку было показано одновременное изменение экспрессии обеих изо-

форм. Также было показано, что повышение экспрессии Igf1 в ткани печени специфично для ГК и не связано с регенерацией или эндокринной функцией печени. Кроме того, в ГК возобновляется экспрессия эмбриоспецифического фактора Igf2.

Механизм и функции стимуляции первичной опухолью выработки Igf1 в печени являются темой дальнейших исследований.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных исследований (грант № 10-04-01559a).

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ВЫКЛЮЧЕНИЯ СИНТЕЗА ДОФАМИНА В МОЗГУ НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫС НА УРОВЕНЬ ДОФАМИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И СЕКРЕЦИЮ ПРОЛАКТИНА ГИПОФИЗОМ

© 2013 г. Ю. О. Зубова

Лаборатория гормональных регуляций

Данная работа посвящена проверке нашей гипотезы, согласно которой мозг в онтогенезе до формирования межнейрональных синаптических связей и гематоэнцефалического барьера, функционирует как эндокринный орган, участвующий в регуляции развития и функционирования периферических органов и целостного организма.

Цель данной работы — показать, что длительное выключение дофамина (ДА) в мозгу неонатальных крыс влияет на уровень ДА в периферической крови и секрецию пролактина гипофизом.

Для этого нами была разработана модель длительного фармакологического выключения синтеза ДА в мозгу при сохранении его уровня в периферических источниках с помощью 6-гидроксидофамина (6-ГДА) — специфического нейротоксина дофаминергических нейронов. В предварительных экспериментах по системному введению 6-ГДА нами была выбрана доза 100 мкг, которая позволила исключить влияние ингибитора на метаболизм ДА в периферических органах. В последующих экспериментах крысам на второй день постнатального развития в желудочки мозга стереотаксически вводили 100 мкг 6-ГДА, после чего

уровень катехоламинов оценивали с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией в мозгу, почках, желудке, двенадцатиперстной кишке и плазме крови. Показано, что через 72 ч после введения 6-ГДА происходит снижение уровня ДА в мозгу на 44% и в плазме на 72% при неизменном его уровне в периферических органах.

В следующей серии экспериментов на разработанной модели мы изучали влияние дефицита ДА в мозгу на периферические органы. В качестве мишени был выбран аденогипофиз. Через 72 ч после введения токсина в желудочки мозга оценивали уровень пролактина в гипофизе и плазме крови с помощью иммуноферментного анализа. Предварительные результаты свидетельствуют о повышении уровня пролактина в плазме и гипофизе.

Таким образом, разработанная нами модель позволила показать, что дофамин, поступающий из мозга в периферическую кровь, оказывает влияние на секрецию пролактина гипофизом. Полученные данные так же подтверждают нашу гипотезу о том, что в раннем постнатальном периоде мозг функционирует как эндокринный орган.

ИЗУЧЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ МЕЗЕНОСФЕРОИДОВ ИЗ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. И. М. Зурина¹, Н. В. Кошелева^{1,2}, А. А. Горкун¹, И. Н. Сабурин¹

¹Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАН

²МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет

Исследование мезенхимных стромальных клеток человека и животных в культуре привело к открытию пластичности 3D-сфероидов с автоматической обратимой конверсией стромальных клеток в эпителий и активацией генов плюрипотентности.

В нашей работе впервые показано, что источником сфероидов могут служить диссоциированные соматические клетки из разных тканей и органов взрослого организма — костного мозга, под-

кожной жировой ткани (СКЖТ), кожи, букального эпителия, слизистой оболочки носа, пульпы зуба, ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и др., а также из экстраэмбриональных тканей — пупочного канатика (ММСК ПК) и ворсинок хориона термальной плаценты. Целью нашей работы было сравнительное изучение динамики формирования, роста и компактизации сфероидов из разных соматических клеток.

Сфероиды из СКЖТ, РПЭ, фибробластов, ММСК ПК и цитотрофобластов получали в системе “висячая капля” или с использованием разработанной нами методики масштабирования на планшетах (Microtissues™, США). Методами иммуноцитохимии, гистологии, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии было показано, что сфероиды обладали сходной динамикой формирования как в каплях, так и на планшетах: образование единого рыхлого агрегата в течение 24 часов и постепенное уплотнение к 4–6 суткам с конечной компактизацией к 7 суткам. В процессе формирования сфероида клетки изменяли свою форму и морфологию: наблюдалась ламинация – формирование внешней эпителиоподобной зоны, состоящей из 2–3 слоев плотно упакованных уплощенных клеток, и внутренней зоны, представленной полигональными отростчатыми

клетками. Одновременная экспрессия в сфероидах маркеров как эпителиального (ламнина, коллагена, Е-кадгерина, цитокератина), так и мезенхимного (виментина, актина) ряда, подтвердила обратимую эпителио-мезенхимную пластичность. Многочисленные микровезикулы в клетках свидетельствовали об активном переносе информации путем экзо- и пиноцитоза, а экспрессия генов плюрипотентности (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*) подтвердила проходящий в сфероидах процесс репрограммирования.

Полученные по нашей методике сфероиды со смешанным эпителио-мезенхимным фенотипом могут быть использованы как модель многофункциональных модулей для изучения сигнальных и клеточных механизмов физиологической регенерации и репарации.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГИБРИДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ДВУХ ВИДОВ СУРКОВ *MARMOTA BAIBACINA* И *M. SIBIRICA* В МОНГОЛЬСКОМ АЛТАЕ

© 2013 г. С. Ю. Капустина, О. В. Брандлер

Лаборатория цитогенетики

Для определения видовой принадлежности и выявления особенностей генетического состава популяции сурков в зоне вторичного контакта *Marmota sibirica* и *M. baibacina* в Монгольском Алтае (верховья р. Улагчин-Гол) в рамках работы СРМКБЭ было проведено исследование двух маркерных участков яДНК и одного мтДНК. Места отлова животных фиксировались с помощью GPS-навигаторов.

Видовая специфичность аллелей исследуемых участков генома определялась секвенированием образцов, полученных от животных из удаленных от места контакта частей ареала. Были найдены видоспецифичные замены нуклеотидов, формирующие специфические сайты узнавания для рестриктаз. Генотип каждой особи сурков из зоны контакта был исследован методом рестрикционного анализа.

В выборке из зоны симпатрии были найдены аллели обоих видов каждого из исследуемых маркеров. Большая часть особей (53.45%) имеет в геноме аллели обоих видов в различных комбинациях. Доля генетически “чистых” тарбаганов (41.38%) значительно превышает таковую серых сурков (5.17%).

Гетерозиготность популяции (Ho), рассчитанная для всей выборки в целом, оказалась значительно ниже ожидаемой, что позволяет предположить наличие механизмов, препятствующих взаи-

мопроникновению геномов гибридирующих видов. При этом частота аллелей яДНК *M. sibirica* значительно превосходит *M. baibacina* как в общей выборке, так и в пределах выборки особей с гибридным геномом. В общей выборке количество особей имеющих мтДНК *M. sibirica* вдвое превышает *M. baibacina*. В то же время в выборке особей с гибридным геномом их количество практически равно, что может свидетельствовать о равном участии в гибридизации самок обоих видов и их дочерей.

Анализ видоспецифических акустических (Капустина и др., 2010) и молекулярно-генетических признаков показал, что гибридных особей, выявленных по молекулярно-генетическим признакам значительно больше, чем особей, звуковые сигналы которых имеют гибридные признаки. Сравнение пространственного распределения полученных данных позволяет предположить, что гибридизация чистых форм происходит в ограниченных местах. Гибридные особи не проявляют биотопического предпочтения и успешно участвуют в размножении.

Работа поддержана грантами РФФИ и Подпрограммы “Генофонды и генетическое разнообразие” Программы Президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”.

ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ И КОМПЕНСАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ПО СКОРОСТИ ВЫВЕДЕНИЯ L-ДОФА ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ

© 2013 г. А. Р. Ким

Лаборатория гормональных регуляций

Нарушение метаболизма катехоламинов в результате гибели специфических нейронов мозга приводит к развитию болезни Паркинсона. При этом существует длительный скрытый период нейродегенерации, затрудняющий раннюю диагностику, который является следствием включения различных компенсаторных механизмов.

Развитие дегенеративных и компенсаторных процессов в катехоламинергических системах должно приводить к изменению метаболизма предшественника катехоламинов — L-дигидроксифенилаланин (L-ДОФА). Мы предполагаем, что эти изменения можно попытаться проследить, вводя экзогенный L-ДОФА и оценивая скорость его выведения из крови. Создание подобного метода детекции нейродегенерации и является целью данной работы.

Для скрининга основных параметров эксперимента, мы использовали нейротоксическую модель ранней симптомной стадии паркинсонизма у мышей (введение 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина — МФТП). При внутривенном введении L-ДОФА в дозе 500 и 5000 нг и оценке со-

держания вещества в плазме крови через 2.5 мин после введения не было выявлено значимых различий между опытом и контролем. В случае ингибирования периферической декарбоксилазы ароматических аминокислот (одного из основных ферментов метаболизма L-ДОФА), при сохранении тех же доз и времени, различия между опытными и контрольными животными также отсутствовали.

Учитывая полученные результаты, мы планируем продолжить поиск других временных интервалов, доз и вариантов ингибирования, и после подбора оптимальных условий, перейти к работе с моделями досимптомных стадий паркинсонизма, разработанными в нашей лаборатории.

Разработка метода детекции нейродегенерации с помощью анализа содержания L-ДОФА в крови после экзогенного введения, позволит не только глубже понять механизмы дегенеративных и компенсаторных процессов в катехоламинергических системах при патологии, но и может послужить основой для создания удобных способов досимптомной диагностики болезни Паркинсона.

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СОХРАНИВШИХСЯ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ НИГРОСТРИАТНОЙ СИСТЕМЫ НА МОДЕЛИ РАННЕЙ СИМПТОМНОЙ СТАДИИ ПАРКИНСОНИЗМА У МЫШЕЙ

© 2013 г. А. А. Колачева

Лаборатория гормональных регуляций

Дегенерация дофаминергических (ДА-ергических) нейронов нигростриатной системы приводит к социальнозначимому заболеванию — болезни Паркинсона. Данное заболевание долгое время (20–30 лет) протекает бессимптомно, и лечение начинается только после первых проявлений болезни и сводится к снижению моторных нарушений. Очевидно, что поиск новых лекарственных препаратов должен быть направлен на защиту сохранившихся и замедление темпов дегенерации уже поврежденных нейронов.

В данной работе была использована разработанная нами модель ранней симптомной стадии паркинсонизма у мышей, полученная при четырехкратном введении предшественника нейротоксина — метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП). Такое введение вызывает дегенерацию 43% ДА-ергических нейронов в черной субстанции и снижение уровня дофамина в стри-

атуме на 75% через две недели после введения МФТП. Первая задача состояла в том, чтобы оценить динамику функциональной активности сохранившихся ДА-ергических нейронов в первые сутки после введения МФТП методом иммуногистохимического выявления тирозингидроксилазы, основного фермента синтеза ДА. Показано, что через 3 ч после последнего введения МФТП не происходит изменения количества функционально активных ДА-ергических нейронов в черной субстанции по сравнению с контролем, в то время как через 6, 12 и 24 ч и через 14 сут происходит снижение на 33, 41, 31 и 43% соответственно. В связи с тем, что количество иммуноположительных нейронов после 6 часов не меняется до 14 дня, когда все нейродегенеративные процессы уже завершены, можно заключить, что все нейроны потерявшие иммунореактивность дегенерируют.

Второй задачей была разработка схемы введения нейропротектора с учетом данной динамики. В качестве предполагаемого нейропротектора в данной работе, был выбран аналог адренокортико-тропного гормона – (4-10)-гептапептид семакса, для которого были показаны антиоксидантный эффект и стимуляция экспрессии эндогенных ростовых факторов. Семакс вводили через час после последней дозы МФТП и оценивали содержание дофамина и его метаболитов в стриатуме и черной

субстанции через 12 ч после последнего введения МФТП с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Введение семакса не изменяет содержания дофамина и его метаболитов в нигростриатной системе по сравнению с их содержанием после введения МФТП. Это может быть связано с недостатком времени для осуществления протекторного действия семакса на DA-ергические нейроны.

ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК НЕРВНОГО ГРЕБНЯ ИЗ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

© 2013 г. А. В. Косых

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Область bulge волосяного фолликула – резервуар эпидермальных стволовых клеток волосяного фолликула – расположена рядом с местом прикрепления сальной железы и имеет вид разрастания (бугорка). В течение цикла волосяного фолликула дегенерации области bulge не происходит. Эти клетки мигрируют из ниши, пролиферируют и дифференцируются в различные типы клеток волосяного фолликула. Кроме того, клетки области bulge участвуют в заживлении ран при повреждении эпидермиса. В области bulge, помимо эпителиальных стволовых клеток, были обнаружены клетки, происходящие из нервного гребня и сохраняющие потенции нейральных стволовых. Разработка методов выделения и культивирования клеток с нейральным потенциалом области bulge позволит охарактеризовать их свойства и оценить возможности их практического применения.

В данной работе были исследованы возможности выделения волосяных фолликулов из кожи с разных областей тела человека, а также различные методики выделения. Была выбрана и модифицирована оптимальная методика для кожи с лобной части головы в районе линии роста волос. В ходе эксперимента было отмечено снижение нейраль-

ного потенциала клеток культуры при длительном культивировании, как у человека, так и у мыши. При использовании методов иммуногистохимии было выявлено, что в культурах клеток, полученных из области bulge волосяного фолликула мыши и человека, содержится субпопуляция клеток, обладающая свойствами нейральных стволовых. Сами культуры клеток гетерогенны, содержат несколько клеточных типов: кроме клеток нервного гребня, в них присутствуют эпидермальные и мезенхимные клетки.

Несомненно, требуются дальнейшие работы по совершенствованию культуральных подходов и характеристике функциональной активности нейральных клеток, полученных из кожи и волосяного фолликула. Нам представляется, что такие исследования актуальны, поскольку кожа является самым легкодоступным источником аутологичного материала для коррекции тканевых и функциональных дефектов с использованием методов клеточных технологий. Кроме того, дальнейшее изучение производных нервного гребня в коже позволит прояснить их функцию в норме и патологии.

ПОИСКИ АНТИФИБРОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ. НАЧАЛЬНЫЙ ЭТАП

© 2013 г. К. А. Кулигина, Ю. И. Василегина, Д. С. Налобин, М. Б. Чернышева, Е. А. Супруненко

МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет

По статистике, 30% взрослого населения планеты Земля страдают от заболеваний печени различной этиологии. Ежегодно в России умирает около 4000 человек от таких заболеваний, как гепатит, цирроз, жировой и пигментный гепатоз.

Фибротические процессы в печени являются неотъемлемой стадией каждого из вышеперечисленных заболеваний. Массивный некроз гепатоцитов, в сочетании с отложением соединительной

ткани в образовавшихся пространствах – основные характеристики фиброза. Причиной некроза клеток печени, в большинстве случаев, является повышение уровня окислительного стресса в ткани, что приводит к запуску каскада свободнорадикальных реакций и гибели клеток. С другой стороны, основной источник образования коллагена определенного типа в местах некротических изменений – звездчатые клетки печени (клетки Ито),

которые при повышении уровня окислительного стресса способны изменять свою морфологию на миофибробластоподобную (появляется экспрессия миофибробластного маркера – гладкомышечного актина (α -SMA)), и начинают синтезировать преимущественно коллаген I типа. Поиски агентов, действие которых направлено на подавление различных механизмов (или уровней) развития фибротических изменений в тканях, становятся все более актуальными в последние годы. Одним из таких агентов стал гормон эпифиза мелатонин, который, как известно, является мощным антиоксидантом. Именно это свойство мелатонина становится все более привлекательным с точки зрения возможного его применения в антифибротической терапии.

Задачей данного исследования было поэтапное и всестороннее изучение процесса фиброза в печени мышей, а также влияние гормона мелатонина на процессы развития и регрессии фиброза. Эксперимент проводили на самцах мышей C57BL/6J. Фиброз индуцировали внутрибрюшинным введением четыреххлористого углерода 2 раза в неделю в течение 1 мес., доза составила 1 мкл на 1 г веса мыши в виде 30% маслянного раствора. В одной из экспериментальных групп на

фоне введения CCl₄, мыши получали с питьевой водой мелатонин в концентрации 20 мкг/г. Забой мышей проводили на 3, 5, 7, 14, 21, 30 сут после 1 инъекции и через 2 месяца после последней. Образцы ткани были подвергнуты гистологическому и иммуногистохимическому исследованию. Гистологическое исследование печени мышей показало динамику развития фибротических изменений в ткани: к 14 сут наблюдалось отложение соединительной ткани в перипортальной зоне, далее образование междольковых септ (21 сут), образование сети септ между дольками к 30 сут эксперимента. Показано положительное влияние гормона мелатонина на замедление развития фиброза в печени мышей.

Иммуногистохимическое исследование выявило уменьшение числа клеток, экспрессирующих α -SMA, в группе мышей с индуцированным фиброзом, получавших мелатонин с питьевой водой, в сравнении с экспериментальной группой без мелатонина. Кроме того, нами было отмечено, что после окончания введения четыреххлористого углерода, происходит постепенное снижение степени распространения коллагеновых тяжей, формирующих септы, т.е. происходит регрессия фиброза в печени мышей.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНА *Gypsy* В ГИБРИДАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ СКРЕЩИВАНИЯ ЛИНИЙ *Drosophila melanogaster*, НЕСУЩИХ МУТАЦИИ В ГЕНАХ *flamenco* И *piwi*

© 2013 г. А. Р. Лавренов, Ф. А. Урусов

Лаборатория молекулярной биологии развития ИБР РАН, лаборатория генетики животных, МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра генетики

Мобильный генетический элемент (МГЭ) *gypsy Drosophila melanogaster* является представителем ретротранспозонов с длинными концевыми повторами, имеющих высокую степень сходства с ретровирусами. Транспозиционная активность *gypsy* контролируется геном *flamenco* при помощи механизма РНК-интерференции: предполагается, что ген *flamenco* является источником антисмысловых РНК, взаимодействующих с белком Piwi. Лабораторные изогенные линии MS и SS имеют мутантный фенотип *flamenco*, который характеризуется повышенной частой транспозиции МГЭ *gypsy*. Не исключено, что этот фенотип может быть обусловлен нарушением Piwi-зависимого процессинга РНК-предшественника. Целью данной работы было установить, является ли причиной фенотипа *flamenco* мутация в локусе *flamenco* или же она вызвана мутацией в гене системы РНК интерференции – *piwi*.

Мутации в гене *piwi* в гомозиготном состоянии приводят к резкому снижению жизнеспособности и стерильности таких особей. Чтобы проверить, присутствует ли в наших линиях летальная мута-

ция в гене *piwi*, нами было поставлено 100 индивидуальных скрещиваний самок линии SS (*flamenco*, *w¹*) с самцами линии *piwi*³ (P{PZ}piwi⁰⁶⁸⁴³ cn¹/CyO; *ry*⁵⁰⁶). Ожидалось, что при массовом скрещивании MS или SS с линией *piwi*³ мы можем получить потомство, часть которого унаследует оба нефункциональных гена *piwi* и погибнет. Однако проведенный анализ потомства индивидуальных скрещиваний ♀SS × ♂*piwi*³ опроверг возможность наличия летального аллеля гена *piwi* в исследуемых линиях. Это также было подкреплено тем фактом, что у потомства от данного скрещивания не наблюдалось нарушения морфологии яичников.

Далее для решения поставленной задачи была проанализирована экспрессия *gypsy* у потомков, полученных от скрещиваний линий MS и SS с линией *piwi*³. В результате было обнаружено, что в яичниках гибридов *flamenco/flamenco*+, *piwi*³/*piwi*², полученных как от прямого ♀MS × ♂*piwi*³, так и от обратного скрещивания ♀*piwi*³ × ♂MS наблюдается снижение экспрессии по сравнению с яичника-

ми родительских линий MS и *piwi*³. Аналогичные результаты наблюдались и в скрещиваниях с линией SS. Это позволило сделать вывод, что мутаций в гене *piwi*, приводящих к нарушению его функции, связанных с контролем ретротранспозона *gypsy*, в изогенных линиях MS и SS нет.

Таким образом, причина фенотипа *flamenco* в линиях MS и SS не связана с мутацией в гене *piwi*, а скорее всего, связана либо с нарушением работы самого *flamenco*, либо с мутацией в другом гене, участвующем в процессинге РНК-предшественника.

ОСОБЕННОСТИ ПОСТУПЛЕНИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ЦИТОПЛАЗМУ В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ C2C12

© 2013 г. Э. Р. Муслихов

Лаборатория общей физиологии

В последние несколько лет установлено, что в клетках скелетной мускулатуры, наряду с классическим механизмом выброса кальция из саркоплазматического ретикулума в ответ на деполяризацию сарколеммы, реализуются механизмы входа Ca^{2+} из внеклеточной среды, к числу которых относится депо-зависимый транспорт. Ранее в нашей лаборатории было показано, что в депо-зависимом входе Ca^{2+} в скелетных миотубулах участвуют каналы *Orai1* (Авдонин и др., 2008) Еще один представитель этого семейства кальциевых каналов, *Orai3*, также экспрессируется в скелетных мышцах. Известно, что *Orai3* входит в состав каналов ARC, специфическим активатором которых является арахидоновая кислота. Каналы ARC выявлены в ряде клеток (Shuttleworth, 2009), однако механизм, приводящий к их активации, точно не известен. Кроме того, не ясно, есть ли другие пути воздействия арахидоновой кислоты на внутриклеточный кальциевый обмен.

Целью моей работы было определить возможные пути действия арахидоновой кислоты в скелетных миотубулах.

Исследования проводили на культурах клеток линии C2C12 (скелетные миобласты, полученные из бедра задней конечности мыши, коллекция ATCC). Дифференцировку вызывали заменой среды культивирования (DMEM), содержащей 10%

эмбриональной телячьей сыворотки, на среду, содержащую 2% лошадиной сыворотки. Изменения концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме ($[Ca^{2+}]_{цит}$) отслеживались при помощи флуоресцентного микроскопа с использованием кальциевого зонда Fura-2.

Было показано, что арахидоновая кислота вызывает значительное повышение в миотубулах C2C12. Этот эффект проявляется вне зависимости от содержания ионов Ca^{2+} во внеклеточной среде, т.е. задействованы эндогенные источники — внутриклеточные депо. В недифференцированных миобластах той же линии, повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ при действии арахидоновой кислоты практически незаметно. Для определения мишени, на которую направлено действие арахидоновой кислоты, мы использовали блокаторы ряда каналов, осуществляющих выброс ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо: рианодин-чувствительных каналов, двупоровых каналов (TRP), а также фосфолипазы C, участвующей в активации инозитолтрифосфатных рецепторов. Полученные данные указывают на то, что ключевую роль в повышении $[Ca^{2+}]_{цит}$ при действии арахидоновой кислоты процессе играют рианодин-чувствительные каналы саркоплазматического ретикулума.

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ КЛЕТОК ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ ЧЕЛОВЕКА ДО ПЛЮРИПОТЕНТНОГО СОСТОЯНИЯ

© 2013 г. И. А. Мучкаева, Э. Б. Дашиниаев, А. С. Артюхов, А. В. Васильев

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) представляют интерес главным образом благодаря способности к дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Нами были получены иПСК из культуры клеток дермальной папиллы взрослого человека, а также из линии фибробластов кожи взрослого человека посредством лентивирусной доставки четырех транскрипционных факторов *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4*.

Для повышения эффективности репрограммирования мы использовали 2-пропилвалериановую кислоту. Через 2 нед мы наблюдали появление первых колоний репрограммированных клеток. Нам удалось выделить несколько Tra-1-60-положительных клонов репрограммированных клеток, что предполагает приобретение ими плюрипотентного статуса. С помощью иммуноцитохимического окрашивания было выявлено, что исследуемые

колонии репрограммированных клеток экспресировали транскрипционные факторы плюрипотентности: OCT4, SOX2, NANOG, а также поверхностные антигены SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81. Экспрессия упомянутых поверхностных белков также была подтверждена методом проточной цитофлуориметрии. Все клоны были положительны по экспрессии щелочной фосфатазы – одного из маркеров плюрипотентного статуса клеток, а также по реактивации фермента теломеразы. Методами количественного и качественного ПЦР-анализов нами было показано наличие транскрип-

тов генов, играющих важную роль в раннем эмбриогенезе. Выделенные клоны способны образовывать эмбрионидные тельца, в которых выявляются белки эктодермы (нестин), мезодермы (десмин) и энтодермы (АФП). В культуре показана дифференцировка их в производные трех зародышевых листков. При определенных условиях полученные нами ИПСК человека дифференцируются в нейрональном (PDX1, нестин, бета тубулин III), остеогенном (остеопонтин, остеонектин) и гепатоцитарном (HNF4a, Foxa2, АФП, альбумин) направлениях.

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ

© 2013 г. Е. П. Мягкова

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Дермальная папилла (ДП) – мезенхимное образование волосяного фолликула (ВФ), участвующее в регуляции его развития и цикла физиологической регенерации. Отличительной чертой клеток ДП является способность индуцировать новообразование ВФ при трансплантации в афолликулярные участки кожи. Однако эта способность теряется с увеличением времени культивирования. Проблемы с культивированием клеток ДП ограничивают их изучение и применение в медицине.

Клетки культивировали вплоть до 8 пассажа. Оценивали экспрессию специфических маркеров: версикана, щелочной фосфатазы и wnt5a, снижение экспрессии которых соотносится с потерей индуцирующих свойств. В культуру вносили компоненты ниши клеток ДП: факторы роста, регулирующие цикл ВФ, компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) ДП. Использовали культивирование в сферах для воссоздания структуры ДП *in vivo*. Для усиления влияния аутокринного сигнала использовали вальпроевую кислоту (ВПК), которая, являясь ингибитором деацетилазы гистонов, делает хроматин более “доступным” для транскрипционных факторов.

Наиболее эффективным способом увеличения экспрессии маркеров клеток ДП оказалось использование сферических культур и ВПК. При этом при воздействии на культуру позднего пассажа, в которой специфические маркеры экспрессируются на невыявляемом уровне, ВПК и получение сфер из этой культуры экспрессия маркеров восстанавливалась. При исследовании компонентов ниши клеток ДП компоненты ВКМ оказывали незначительный эффект, среди факторов роста наилучшие результаты были показаны для BMP6 и кальцитриола (аналога витамина D3). Но эффект от них снижался с увеличением времени культивирования и к 6-му пассажу исчезал.

По результатам исследования можно сказать, что для получения долговременной культуры клеток ДП необходимо поддерживать собственный аутокринный сигналинг этих клеток.

Исследование факторов, увеличивающих и поддерживающих индуцирующие свойства клеток ДП в культуре, поможет выяснить, какую именно роль играют клетки ДП в образовании и цикле физиологической регенерации ВФ, а также сделает доступным использование клеток ДП в медицине для получения тканеинженерных конструкций.

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ НА ЦИЛИАРНУЮ ЛОКОМОЦИЮ И РАЗВИТИЕ СВОБОДНОПЛАВАЮЩИХ ЛИЧИНОК МОРСКИХ ЕЖЕЙ

© 2013 г. А. Л. Обухова, Е. Е. Воронежская

Лаборатория сравнительной физиологии

Практически любые изменения во внешней среде воспринимаются сенсорными структурами животных и приводят к изменению уровня соответствующих нейромедиаторов в организме. В зависимости от стимула это приводит к кратковременным изменениям – модуляции поведения, или же долговременным – модификации развития. В

качестве моделей для изучения механизмов, которые обеспечивают весь широкий спектр адаптивных реакций организма, давно и плодотворно используются беспозвоночные животные. В своей работе для исследования влияния уровня моноаминов (серотонина, 5-НТ, и дофамина, DA) на поведение и развитие нами были выбраны свобод-

ноплавающие личинки морского ежа *Strongylocentrotus nudus*.

Личинок *Str. nudus* инкубировали в растворах 5-НТ, DA, их предшественников (5-НТР и L-DOPA) и блокаторе синтеза (PCPA) (10–7 М для всех веществ). Последующее иммунохимическое выявление 5-НТ, DA и ресничных структур с анализом препаратов под конфокальным микроскопом показало изменения в морфологии и содержании медиаторов в 5-НТ- и DA-ергической системах.

Инкубация со стадии бластулы и призмы в PCPA, а также призмы в DA и L-DOPA приводила к блокаде ресничной локомоции и погружению личинок на дно через 8 часов инкубации. Эффект PCPA полностью снимался при помещении личинок в чистую морскую воду и компенсировался добавлением 5-НТР. Эффект от DA и L-DOPA оставался необратимым. Инкубация личинок в 5-НТ и 5-НТР приводила к возрастанию числа активно плавающих особей. Инкубация личинок, как на ранних, так и на более поздних стадиях развития в

DA приводила к замедлению темпов развития вплоть до его полной остановки.

До стадии поздней призмы тело личинок *Str. nudus* равномерно покрыто ресничками, в основании которых выявляются везикулы с высоким содержанием 5-НТ. Дофамин в этих структурах не выявляется. У личинок, упавших на дно, содержание 5-НТ в везикулах значительно ниже, чем у нормально плавающих. Интересно, что аналогичные структуры были выявлены у личинок морского ежа *Hemicentrotus pulcherrimus* (Katow et al., 2010), причем у личинок этого вида, в отличие от изученного нами *Str. nudus*, в подростничных структурах локализован DA, а поведение их в растворе DA аналогично поведению *Str. nudus* в растворе 5-НТ.

Таким образом, 5-НТ и DA оказывают разнонаправленное действие на ресничную локомоцию личинок морских ежей, причем это воздействие различно для личинок разных видов. Дофамин, в отличие от серотонина, замедляет темпы личиночного развития.

Работа поддержана грантами РФФИ № 12-04-01510, № 12-04-10119.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ИММУННЫХ СУБЪЕДИНИЦ И АКТИВАТОРОВ ПРОТЕАСОМ В РАННЕМ РАЗВИТИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

© 2013 г. А. Ш. Орлова

Лаборатория биохимии

Регуляция работы убиквитин-протеасомной системы, участвующей в деградации структурных и функциональных белков синапсов, является актуальным вопросом в изучении пластичности центральной нервной системы позвоночных. Целью настоящей работы было изучить возможную связь между экспрессией иммунных протеасом и активаторов PA700, PA28 и PA200 во фронтальной коре, гиппокампе и стволе мозга крысы в периоды эмбрионального (E19–E21) и раннего постнатального (P0–P15) развития. Методом Вестерн-блоттинга определяли уровень экспрессии иммунных (LMP2, LMP7) и конститутивных (β 1, β 5) субъединиц и регуляторов (PA700, PA28, PA200) протеасом, а также оценивали химотрипсинподобную (ХПА) и каспазоподобную (КПА) активности протеасом по гидролизу флуорогенных субстратов Suc-LLVY-AMC и Z-Leu-Leu-Glu-MCA, соответственно.

Содержание субъединиц β 1, β 5 и регулятора PA28 протеасом в коре головного мозга растет в период от E19 до P4, а затем снижается до P15, а в гиппокампе и стволе резко увеличивается в период до P1 и спадает только после P5. На фоне увеличения тотального пула протеасом количество иммунных субъединиц LMP7 в стволе и гиппокампе растет от E21 к P15, и сопровождается увеличением ХПА и КПА. В коре головного мозга содержа-

ние LMP7 увеличивается в период к от E21 до P5, и от P10 до P15, а снижение наблюдается в период P7. В соответствии с изменениями экспрессии субъединицы LMP7 протеасом в коре головного мозга изменяется ХПА и КПА. Количество другой иммунной субъединицы, LMP2 (встраивается независимо от LMP7), имеет схожие изменения во всех структурах мозга: растет в период от E19 к P3, падает на P4 и P7, увеличивается на P5 и P15. Уровень экспрессии PA200 в коре не изменяется, а в гиппокампе и стволе мозга имеет одинаковую динамику роста в периоды от E21 к P3 и от P8 до P15. Экспрессия регулятора PA700 во всех изученных структурах отличалась от экспрессии других регуляторов и субъединиц протеасом.

Таким образом, нами установлено, что в отдельные периоды раннего развития головного мозга крысы происходит смена активаторов PA28 и PA200 протеасом. В период от E19 до P5 активно нарабатываются все изученные активаторы, PA28, PA200 и PA700, совместно с протеасомами, содержащими иммунные субъединицы LMP2 и LMP7. По-видимому, данные структуры в составе протеасом отражают специфические функции убиквитин-протеасомной системы, связанные с особенностями нейрогенеза в этот период.

Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-00072-а).

АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРЕПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *ras1* У БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ ДРОЗОФИЛ ГРУППЫ *virilis*

© 2013 г. П. А. Прошаков, М. И. Барсуков, А. И. Чекунова

Лаборатория генетики

Исследование полиморфизма регуляторных последовательностей консервативных генов в группах близкородственных видов представляет особый интерес, поскольку позволяет оценить эволюционную динамику изменчивости этих последовательностей.

Мы исследовали предпромоторный район гена *ras1* у дрозофил группы *virilis*, которая является удобной моделью для описания процессов молекулярной эволюции на ранних стадиях дивергенции.

Ген *ras1* является одним из высоко консервативных генов. Продукт его экспрессии — белок Ras1 участвует в регуляции митотической активности клеток. Мутации в этом гене часто приводят к канцерогенезу. Регуляция экспрессии гена *ras1* также эволюционно консервативна.

На данном этапе работы отсеквенированы 3 участка размером 158, 426 и 368 п.о., расположенные сразу перед предполагаемым сайтом начала транскрипции гена (последовательность АТСТСАТСТСА (transcription start site — TSS)) и на расстоянии 160 и 753 нуклеотида соответственно выше него. В эксперименте использовали следующие виды из коллекции лаборатории генетики: *D. montana*, *D. kanekoi*, *D. ezoana*, *D. laticola*, *D. littoralis*, *D. lummei 200*, *D. lummei 1109* и линии *D. virilis*: 2, 9, 12, 103, 113, 119, 135, 149, 151, 175.

Для аналитических работ использовали программное обеспечение Laser Gene, MEGA-5. Последовательности выравнивали методом Clustal-W.

Сравнительный анализ выявил значительный полиморфизм исследуемой области. На отсеквенированном участке были обнаружены нуклеотидные замены, делеции/инсерции различной длины. У вида *D. lummei* обнаружены инсерции в позициях 448 и 480 длиной 22 и 4 нуклеотида соответственно. Также у видов филады *montana* обнаружена общая делеция размером 5 нуклеотидов в позиции 47. Линия *D. virilis 149* отличается от остальных линий этой группы делецией в 4 нуклеотида, находящейся на расстоянии 187 п.о. Отсчет позиций ведется вверх по цепи относительно предполагаемого TSS. По последовательностям участка длиной 426 п.о. была построена дендрограмма филогенетических отношений. В данном участке обнаружен 91 вариабельный сайт, причем 81 из них является филогенетически значимым. 25 полиморфных сайтов позволяют кластеризовать виды филады *montana*. Количество транзиций преобладает на данном участке над количеством трансверсий с соотношением 0.79. Построенная дендрограмма соответствует филогении Трокмортон (Trockmorton, 1982).

РЕГУЛЯЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА ХВОСТА ТРИТОНА В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОЙ ГРАВИТАЦИОННОЙ НАГРУЗКИ

© 2013 г. Е. А. Радугина¹, Э. Н. Григорян¹, Н. Дворочкин², Е. Алмейда²

¹ Лаборатория проблем регенерации

² Эймский центр НАСА, США

Хвостатые амфибии уникальны своей способностью восстанавливать утраченные конечности, хвост, ткани глаза, участки сердца и других органов. До сих пор неясно, является ли их регенерационная способность исключением или базовым свойством позвоночных, частично утраченным другими представителями, в том числе человеком. Изучение регуляторных механизмов регенерации, обнаружение в них универсальных и специфических для тритона компонентов позволит решить этот вопрос. Для этого постоянно привлекаются новые методы и модели, в том числе демонстрирующие влияние на регенерацию внешних условий. Давний интерес представляет регенерация в условиях космического полета. В лаборатории проблем

регенерации ИБР РАН показали влияние факторов космического полета на скорость регенерации, пролиферацию клеток и экспрессию некоторых факторов роста у тритона *Pleurodeles waltl*. В экспериментах на борту российских спутников Фотон М2, М3 (2005, 2007 гг.) было обнаружено неожиданное различие формы регенератов хвоста у животных, регенерировавших на орбите и в лабораторных контролях — аквариальном и синхронном, который содержался на влажном субстрате и в полной мере испытывал действие силы тяжести. В последнем случае регенерат хвоста загибался в вентральную сторону, отклоняясь от нормальной ланцетовидной формы.

Этот эффект был многократно воспроизведен в лаборатории. Морфометрический анализ подтвердил достоверность изменения формы хвоста на субстрате, начиная с III стадии регенерации и далее (Iten, Bryant, 1976). В сотрудничестве с Эймским центром НАСА было показано, что центрифугирование с перегрузкой в 2g приводит к загибу регенерата в той же мере, что и содержание на субстрате. Для проверки обратимости загиба животные содержались на субстрате вплоть до появления достоверных отличий от контроля, после чего их возвращали в аквариум. Было показано, что в течение 11 сут у таких животных уменьшился загиб хвоста, и значимое различие между ними и аквариальном контролем исчезло.

Были обнаружены тканевые и клеточные отличия загнутых регенератов от контроля: загиб эпендимной трубки и хрящевого тяжа, утолщение апикального эпидермиса, ориентированное уплотне-

ние дорсальной бластемы. С помощью предшественника синтеза ДНК БрдУ было показано перераспределение пролиферирующих клеток в эпидермисе с преобладанием их в апикальной части, по-видимому, приводящее к ее утолщению. Наши дальнейшие исследования посвящены механизмам, регулирующим эти изменения. На основании имеющихся в литературе данных мы предполагаем, что эффекты изменения гравитационной нагрузки могут опосредовать белки теплового шока — универсальные кошапероны, участвующие во многих процессах развития и в реакции на различные стрессовые воздействия. Изучение их роли в измененном морфогенезе хвоста тритона может предоставить нам новые данные о способах “распознавания” организмом измененного гравитационного воздействия и регуляторных механизмах регенерации в целом.

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК У МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ С НАРУШЕНИЕМ РАЗВИТИЯ ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ

© 2013 г. А. Л. Риппа

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Развитие кожи и волосяных фолликулов в эмбриогенезе мыши начинается на 12.5 сут. В результате пролиферации, дифференциации и стратификации эпидермальных клеток образуется многослойный эпидермис. Базальный слой кератиноцитов контактирует с базальной мембраной и характеризуется высоким пролиферативным потенциалом. Вышележащие слои образованы кератиноцитами на разных стадиях дифференцировки.

Мутантные мыши, двойные гомозиготы *we/we wal/wal*, являются уникальным объектом для изучения морфогенеза кожи, поскольку к 21-м сут постнатального развития все мыши *we/we wal/wal* имеют четко выраженную алопецию. На 18.5 сут эмбрионального развития нами были обнаружены существенные аномалии в развитии кожи и ее придатков у гомозигот *we/we*, *wal/wal* и двойных гомозигот *we/we wal/wal* в сравнении с контрольной линией C57Bl6. На 18.5 сут в норме в волосяном покрове у мыши наблюдаются генерации всех 4 типов волосяных фолликулов на разных стадиях развития. В волосяном покрове мутантов *we/we wal/wal* в это время волосяных фолликулов было значительно меньше, и они запаздывали в развитии.

Исследовав экспрессию маркера базальных кератиноцитов цитокератина 5, мы выявили у мутантов *we/we*, *wal/wal* и *we/we wal/wal* зоны мультипликации базального слоя, которые были наиболее ярко выражены у мутантов генотипа *we/we* и *we/we*

wal/wal. Утолщения базального слоя отчетливо распознавались по нарушению экспрессии Р-кадгерина. В норме Р-кадгерин экспрессируется в базальном слое межфолликулярного эпидермиса и усиленно в краниальной части волосяных фолликулов. У мутантов данный паттерн был нарушен, Р-кадгерин экспрессировался в фолликулоподобных структурах. Наиболее сильные нарушения наблюдали у мутантов *we/we* и *we/we wal/wal*. Анализ экспрессии маркера пролиферирующих клеток Ki-67 показал, что клетки в зонах мультипликации базального слоя пролиферируют без инвагинации в дерму. Данные по экспрессии маркера кератиноцитов зернистого слоя, лорикрина, у всех исследуемых мутантов выявили зоны уменьшения или отсутствия клеток шиповатого слоя, что свидетельствует об их преждевременной дифференциации в кератиноциты зернистого слоя. В очагах скопления пролиферирующих базальных кератиноцитов, эпидермальные клетки синтезировали ламинин 5, перлекан и $\beta 1$ интегрин по всему периметру.

Мы полагаем, что выявленные нарушения являются проявлением мутаций гена *we* и *wal* в эмбриогенезе кожи. Морфологические признаки обеих мутаций на 18.5 сут одинаковы и отличаются лишь по степени выраженности. У двойных гомозигот нарушения морфогенеза кожи усиливаются и возможно являются причиной дальнейшей почти полной потери волос.

МЕХАНИЗМЫ ПОРТАЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ: ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ПРОТЕАСОМ

© 2013 г. А. А. Степанова

Лаборатория биохимии

Портальная толерантность – феномен развития иммунологической толерантности после введения антигенов в воротную вену печени. Начиная с 1990-х годов, в ряде работ было показано увеличение приживаемости и срока жизни тканевых трансплантатов у животных, которым за 7–14 сут до трансплантации в воротную вену печени вводили донорские клетки. Возникает вопрос, как печень может влиять на процесс активного подавления иммунного ответа на пересаженную ткань? В печени эволюционно сформировался свой особенный локальный контроль иммунного ответа, так как к множеству антигенов, поступающих из желудочно-кишечного тракта, организм должен быть толерантен. В роли антиген-презентирующих клеток синусоида могут выступать Купферовские клетки, эндотелиальные клетки синусоида печени (LSEC) и дендритные клетки. Первые два типа клеток тормозят активацию CD8⁺ Т-лимфоцитов (LSEC осуществляют кросс-презентацию антигена), а CD4⁺ Т-лимфоциты после контакта с LSEC приобретают фенотип регуляторных CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т-лимфоцитов, которые поддерживают развитие иммунологической толерантности. За счет особого профиля цитокинов (ИЛ-10, TGF-β1), обусловленного работой Купфе-

ровских клеток и LSEC, дендритные клетки также начинают проявлять толерогенные свойства.

Гораздо меньше известно про молекулярные механизмы развития толерантности. Известно, что ключевые события, определяющие судьбу трансплантата, решаются в момент презентации антигена. Основными участниками образования антигенных эпитопов для молекул главного комплекса гистосовместимости I класса являются иммунные протеасомы. При приживлении трансплантата протеасомы могут выполнять функции, не связанные с иммунным ответом. Иммунные протеасомы, содержащие субъединицу LMP2, вовлечены в борьбу с последствиями окислительного стресса, который часто является началом запуска процесса отторжения трансплантата.

Мы предполагаем, что развитие толерантности связано со сдвигом баланса между различными формами иммунных протеасом (содержащими субъединицу LMP2 и содержащими субъединицу LMP7), а также баланса между регуляторами активностей протеасом, 19S, служащим для деградации убиквитинилированных белков, и 11S, вовлеченным, в частности, в активацию иммунного ответа.

Работа поддержана РФФИ (гранты № 12-04-90914-мол_снг_нр и № 12-04-31621-мол-а).

ВВЕДЕНИЕ СИНТЕЗИРОВАННОЙ *IN VITRO* МОДИФИЦИРОВАННОЙ мРНК ГЕНА hTERT, ВЫЗЫВАЕТ КРАТКОВРЕМЕННУЮ ТЕЛОМЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ, В ФИБРОБЛАСТАХ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. Р. Р. Файзуллин

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Технологии репрограммирования клеток человека без использования генетического модифицирования находят все большее применение в экспериментальной клеточной биологии. Одним из таких перспективных методов является введение синтезированной *in vitro* мРНК генов транскрипционных репрессирующих факторов (Yakubov et al., 2010; Warren et al., 2010). Данный подход исключает использование молекул ДНК при репрограммировании, что позволяет избежать риска генетического модифицирования, а также позволяет управлять экспрессией вводимого гена, т.к. время жизни введенной мРНК в клетке обычно составляет 24–48 ч. Использование модифицированных нуклеотидов (5-метилцитидин и псевдо-уридин) в

составе синтезированной мРНК, позволяет увеличить эффективность трансляции, за счет увеличения времени жизни введенной мРНК в клетке и уменьшения цитотоксического эффекта.

Каталитический компонент теломеразы (hTERT) является перспективным фактором репрограммирования клеток человека, учитывая функцию теломеразы по регулированию эпигенетического профиля субтеломерных областей генома (Mathew et al., 2010). Также hTERT может быть рассмотрен как потенциальный ген для генной терапии, ввиду достигнутых положительных результатов по увеличению средней продолжительности жизни мышей, при помощи генной терапии TERT (Bernardes de Jesus et al., 2012).

Целью данной исследования являлась разработка метода индукции управляемой теломеразной активности на основе введения синтезированной *in vitro* модифицированной мРНК гена hTERT. В данной работе нами была синтезирована модифицированная мРНК гена hTERT и было показано, что ее введение в фибробласты кожи человека

индуцирует кратковременную теломеразную активность. По нашему мнению, данный подход может быть использован в будущем для различных приложений в экспериментальной клеточной биологии, в том числе для безопасного увеличения пролиферативного потенциала культур клеток человека.

ДВУПОРОВЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ КИСЛЫХ ЭНДО/ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ВЕЗИКУЛ ПОДДЕРЖИВАЮТ СПОНТАННЫЙ РИТМ СОКРАЩЕНИЯ СЕРДЦА

© 2013 г. Е. С. Фёдорова

Лаборатория общей физиологии

Частота и сила сердечных сокращений определяется внешней нейроэндокринной регуляцией и спонтанной активностью пейсмэйкерных клеток самого сердца. Внутриклеточным мессенджером, активирующим сокращение кардиомиоцитов в ответ на нейроэндокринные факторы, является кальций. Ионы кальция поступают в цитоплазму мышечных клеток сердца из внешней среды через потенциалуправляемые каналы и из саркоплазматического ретикулума через рианодинчувствительные каналы и через каналы, активируемые инозитолтрифосфатом. В 2002 г. был открыт новый внутриклеточный источник ионов кальция — кислые эндо/лизосомальные везикулы (Churchill, Okada et al., 2002). Выброс Ca^{2+} из эндо/лизосомальных везикул осуществляется через особый тип каналов — двупоровые каналы (two-pore channels — TPC), открываемые NAADP (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) (Brailoiu, Churamani et al., 2009). Чувствительные к NAADP каналы TPC эволюционно консервативны и выявлены в трех биологических царствах (Lee, 2011), однако их физиологические функции практически не изучены.

Целью нашей работы было выяснение возможного участия активируемых NAADP кальциевых каналов эндо/лизосомальных везикул в регуляции

сократимости сердца. Для экспериментов было использовано изолированное сердце виноградной улитки *H. pomatia* как исключительно удобный объект, пригодный для длительной многочасовой регистрации сердечных сокращений в процессе разного рода воздействий. Мы показали, что проникающий через клеточные мембраны предшественник NAADP (NAADP-AM) в наномолярных концентрациях увеличивает частоту и амплитуду сокращений изолированного сердца виноградной улитки и обеспечивает его спонтанную сократительную активность. Блокатор рецепторов NAADP transNED-19 обратимо устраняет этот эффект и полностью подавляет спонтанную активность сердца. Аналогичное действие оказывает бафиломицин A1, ингибитор протонной АТФазы кислых эндо/лизосомальных везикул, вызывающий потерю этими органеллами ионов кальция. В отличие от спонтанных, индуцируемые серотонином сокращения сердца *H. pomatia* не блокируются при воздействии антагониста NAADP transNED-19. Проведенные исследования впервые продемонстрировали роль NAADP-зависимого выброса кальция через двупоровые каналы эндо/лизосомальных везикул как механизма, обеспечивающего спонтанную работу сердца.

СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА В РЕГУЛЯЦИИ РЕСНИЧНОЙ ЛОКОМОЦИИ ЮВЕНИЛЬНЫХ И ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ АРХИААННЕЛИД: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕПЛОВОДНОГО И ХОЛОДОВОДНОГО ВИДОВ

© 2013 г. Е. Г. Фофанова, Е. Е. Воронежская

Лаборатория сравнительной физиологии

У всех изученных на настоящий момент беспозвоночных животных серотонин (5-НТ) стимулирует биения ресничек, в какой бы области тела они не находились. Данная реакция наблюдается как у

взрослых форм, так и у личинок. Мы исследовали эффект аппликации низких доз 5-НТ на ресничную локомоцию ювенильных и взрослых особей архиааннелид, а также морфологию 5-НТ-ергиче-

ской нервной системы, вовлеченной в контроль локомоции, у двух близких видов: *Dinophilus gyrociliatus* (тепловодный) и *Dinophilus taeniatus* (холодноводный).

Представители обоих видов обладают сходным механизмом движения преимущественно за счет биения ресничек вентральной ресничной полоски и кольцевых ресничных шнуров, строение которых у *D. gyrociliatus* и *D. taeniatus* не имеет сильных различий. Однако топология 5-НТ-ергических элементов ноги и вентральных стволов у них принципиально различна. У *D. gyrociliatus* неравномерно распределенные тела нейронов и нейропилы располагаются непосредственно под вентральной ресничной полоской. У *D. taeniatus* тела нейронов расположены в передней трети туловища, вдоль вентральных нервных стволов. Отростки этих нейронов идут к ресничной полоске, где активно ветвятся.

Изменения в локомоции оценивали, измеряя длину пути, пройденного животным за определенный промежуток времени (треки). Добавление

5-НТ в морскую воду (10^{-12} – 10^{-6} М) вызывало концентрационно-зависимое удлинение треков у ювенильных особей обоих видов. Добавление тех же доз серотонина взрослым особям вызывало существенное укорочение треков, вплоть до полной остановки. Добавление агонистов 5-НТ рецепторов 1, 2 и 7 типов (5-СТ, 8-ОН-ДРАТ, α Met-НТ, каждый 10^{-12} – 10^{-7} М) также вызывало укорочение треков у взрослых особей архианнелид.

Таким образом, у двух близкородственных видов архианнелид 5-НТ-иннервация сходных локомоторных ресничных структур существенно различается. Ювенильные и взрослые особи реагируют на аппликацию 5-НТ противоположным образом. Дальнейший фармакологический анализ необходим для определения типа 5-НТ рецепторов, вовлеченных в процесс обнаруженной регуляции.

Работа поддержана грантами РФФИ № 12-04-01510, № 12-04-10119.

ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПРЕНАТАЛЬНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ НА ГРГ-СИСТЕМУ

© 2013 г. В. С. Шарова

Лаборатория гистогенеза

В пренатальном онтогенезе воздействие бактериальной или вирусной инфекции на организм матери может оказывать влияние на развитие нейроэндокринной, в том числе репродуктивной системы плода. Ключевая роль в этом процессе принадлежит гонадотропин релизинг-гормон (ГРГ)-продуцирующей системе. Ранее нами было показано, что бактериальное инфицирование ЛПС *E. coli* на ранних сроках беременности подавляет миграцию ГРГ-нейронов из назальной мезенхимы в мозг и выход их предшественников в дифференцировку. Возможным механизмом регуляции интраназальной миграции ГРГ-нейронов является усиление синтеза цитокинов воспаления: интерлейкина (ИЛ)-6, лейкоингибирующего фактора (ЛИФ), белка хемотаксиса моноцитов (МСР)-1 и фактора некроза опухоли (ФНО α) сначала у матери, а затем в организме плода.

Целью данной работы явилось оценить уровень цитокинов воспаления во временной динамике после активации иммунной системы ЛПС в биологических жидкостях матери и плода и экспрессию рецепторов к этим цитокинам, влияющих на развитие ГРГ-нейронов. Содержание цитокинов измеряли с помощью ИФА и проточной цитометрии в сыворотке крови матери и плода, а также в

амниотической и цереброспинальной жидкостях плода через 1,5, 3, 6, 24 ч после внутрибрюшинного введения ЛПС (0,9 мкг/мышь) беременной самке. Для выявления рецепторов к цитокинам использовали двойное иммуногистохимическое мечение на ГРГ и рецепторы к ИЛ-6 и ЛИФ на сагиттальных срезах мозга у 12–13-дневных плодов мышей. Уровень цитокинов ИЛ-6, МСР-1, ФНО α и ЛИФ был значительно повышен в сыворотке крови матери и плода через 1,5 и 3 ч после введения ЛПС. Повышенный уровень этих цитокинов наблюдался в течение 6 часов после инъекции ЛПС в амниотической жидкости. Возрастание уровня цитокинов МСР-1, ИЛ-6 и ЛИФ наблюдалось также в цереброспинальной жидкости плода. Нами было обнаружено наличие рецепторов к ИЛ-6 в назальной области на вомероназальных и обонятельных нервах, по ходу которых также мигрируют ГРГ-нейроны. Кроме того, было показано наличие рецепторов к ЛИФ в назальной мезенхиме плода. Установлено также снижение репродуктивной функции у половозрелых особей, перенесших нарушение миграции ГРГ-нейронов в пренатальный период.

ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МАРКЕРА *CytB* (ГЕН ЦИТОХРОМ Б) У КОСМОПОЛИТИЧЕСКОГО “ВИДА” НАНОПУС (*NANNOPUS PALUSTRIS*)

© 2013 г. Д. М. Щепетов

Лаборатория экспериментальной эмбриологии

Попытки построения филогенетических реконструкций на основании анализа митохондриальных маркеров, особенно при использовании универсальных праймеров, часто приводят к ошибкам, связанным с существованием ядерных псевдогенов митохондриальных генов. Особенно выражено это правило при изучении групп животных, для которых полученная ложная филогения не противоречит явно ранее известным данным. При детальной проработке одного из случаев, где следовало бы подозревать невалидность полученных последовательностей, нами была обнаружена крайне любопытная картина. *Nannopus palustris* – мейобентосный вид копепод, распространенный по всему земному шару. Образцы из Северного, Черного и Белого морей, а также из Индийского океана и из Атлантического океана с побережья Северной Каролины (США), оказались морфологически и генетически полиморфны. При этом по ядерному маркеру 28S наблюдаются различия в 2–4%, в то время как по участку митохондриального гена *CytB* они достигают 66%. Логичным объясне-

нием наблюдаемого могла бы быть ошибочная амплификация ядерного псевдогена изучаемого митохондриального маркера. Однако все усилия по выявлению такой ошибки оказались тщетными. Сходные результаты получены разными исследователями в разных лабораториях. Рамка считывания в получаемых последовательностях не нарушена, и значительная часть замен находится в третьей позиции кодона. При этом предсказанная последовательность белка имеет все домены, характерные для выбранного участка. Филогенетическая реконструкция на основе предсказанных белковых последовательностей всех копепод (для которых имеются данные) группирует вместе все известные образцы наннопусов. Немногие известные последовательности митохондриального гена *COI*, также необычайно далеки друг от друга, что подтверждает необходимость искать причины вероятно высокой наблюдаемой изменчивости Цитохрома Б и всего митохондриального генома в образе жизни или особенностях функционирования митохондрий в роде *Nannopus*.