

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ,  
ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА ВСЕРОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ  
«БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ В КУЛЬТУРЕ»

(Санкт-Петербург, 17—19 октября 2006 г.)

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБОВ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ, КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ И СРОКОВ ХРАНЕНИЯ. © К. М. Абдулкадыров, Н. С. Карпова. Российский НИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург.

В настоящее время трансплантации стволовых клеток пуповинной крови (ПК) стали более широко использоваться в клинической практике как альтернатива трансплантациям стволовых клеток костного мозга и мобилизованной периферической крови. Применение гемопоэтических стволовых клеток ПК для пересадок имеет целый ряд преимуществ: не требуется общей анестезии, процедура сбора безболезненна и безвредна как для матери, так и для новорожденного, ниже риск передачи латентных инфекций, имеется возможность накапливать и сохранять различные НЛА-типы клеток, что облегчает поиск материала для трансплантации. Главным недостатком трансплантатов ПК являются невозможность повторного сбора и малое количество гемопоэтических стволовых клеток в одном образце. Успешность трансплантации зависит главным образом от достаточного количества клеток CD34<sup>+</sup> на 1 кг массы тела реципиента и их пролиферативного потенциала. Объем собранной крови, абсолютный лейкоцитоз и время, прошедшее от момента сбора до начала процессинга, могут также являться важными прогностическими критериями качества заготавливаемого образца. Изучение пролиферативного потенциала гемопоэтических стволовых клеток ПК может быть высокоинформативным прогностическим критерием, а также критерием контроля качества всего технологического процесса, включающего в себя сбор, фракционирование, криоконсервирование и хранение. Объектом исследования служили образцы ПК ( $n = 16$ ). Объем собираемой крови варьировал от 56 до 105 мл (средний объем —  $79.2 \pm 17.8$  мл). Общее количество ЯСК равнялось  $102 \cdot 10^9 \pm 0.29 \cdot 10^9$ . В некоторых случаях проводили перфузию плаценты антикоагулянтами CPDA и CPD. Объем перфузата варьировал от 10 до 25 мл и в среднем равнялся  $18.0 \pm 4.9$  мл. Общее количество ЯСК равнялось  $0.28 \cdot 10^9 \pm 0.07 \cdot 10^9$ . Для изучения гемопоэтического потенциала образцов ПК проводили подсчет клеток с иммунофенотипом CD34<sup>+</sup>. Общее количество CD34<sup>+</sup>-клеток составило  $2.04 \cdot 10^6 \pm 0.58 \cdot 10^6$ . Нами ис-

следуются теломеры, позволяющие оценить пролиферативную способность клеток после криоконсервации. Для оценки гидроксипроцерамала и полиглобулина как седиментирующего вещества было выполнено по 8 опытов. Для осаждения эритроцитов производили смешивание с ПК в соотношении 1 : 1. Осаждение длилось от 30 до 90 мин до появления четкой границы раздела сред. Затем плазмэкстратом отделяли надосадок, содержащий ЯСК и плазму. При сепарации с использованием HES (6 %) ЯСК содержалось меньше ( $0.84 \cdot 10^9 \pm 0.17 \cdot 10^9$ ), чем при использовании полиглобулина ( $124 \cdot 10^9 \pm 0.14 \cdot 10^9$ ). Добавление ДМСО проводили по стандартным протоколам в конечной концентрации 5 %. Замораживание образцов проводили двумя способами: 1) со скоростью 1 °С/мин — до -20 °С, со скоростью 2 °С/мин — до -40 °С, со скоростью 4 °С/мин — до 80 °С, со скоростью 20 °С/мин — до -140 °С, после чего образцы помещали в пары жидкого азота (от -150 до -196 °С); температура кристаллизации отмечалась при этом на уровне  $-8.8 \pm 2.7$  °С, фаза кристаллизации длилась от 45 с до 2 мин 40 с; 2) образцы помещали в криобокс и в морозильник при -80 °С, после чего переносили в пары жидкого азота. После размораживания оценку сохранности клеток проводили, определяя жизнеспособность клеток с 7-AAD. В образцах, замороженных первым способом, сохранялось  $89.5 \pm 2.1$  % клеток, а при спонтанной заморозке в морозильнике —  $62.3 \pm 5.6$  %. Проведенная работа показала, что при решении вопроса о возможности криоконсервирования ПК следует ориентироваться не на объем, а на абсолютное количество ядросодержащих клеток в эксфузате. Для эффективного выделения ядросодержащих клеток и осаждения эритроцитов целесообразно использовать полиглобулин. Ведутся работы по изучению пролиферативного потенциала гемопоэтических стволовых клеток, определяемого по длине теломер, в нативных и криоконсервированных образцах.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕДШЕСТВЕННИКА НЕЙРОТРОФИНА-3 (proNT-3) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ФЕОХРОМОЦИТОМЫ КРЫСЫ PC12. © Я. В. Агниуллин, Л. В. Ефремова, Д. Р. Сафина, С. И. Шрам, С. В. Костров, Н. Ф. Мясоедов. Институт молекулярной генетики РАН, Москва, yanletters@mail.ru.

Нейротрофины являются важными факторами, определяющими рост, развитие и дифференцировку нейронов. Они также участвуют в регуляции процессов, связанных с выживанием и гибелью клеток. Все нейтрофины синтезируются в виде предшественников, которые превращаются в зрелые белки путем процессинга. В настоящее время считается, что предшественники нейтрофинов могут обладать биологической активностью, при этом в определенных условиях их действие может быть противоположным действию зрелых белков. Поэтому нарушение процессинга нейтрофинов может играть важную патогенетическую роль. Целью настоящей работы было исследование цитотоксического и цитопротекторного действия предшественника одного из основных нейротрофических факторов мозга — нейротрофина-3. Эксперименты проводили на культуре клеток феохромоцитомы крысы PC12, имеющих два типа рецепторов нейротрофинов, один из которых, р75, является проапоптотическим, а второй, TrkA, активирует сигнальные пути, связанные с поддержанием жизнеспособности клеток и дифференцировкой. Известно, что proNT-3 способен связываться с обоими типами рецепторов. Реконструированный proNT-3 человека был получен с использованием бактериальной экспрессирующей системы на основе штамма *E. coli* BL-21 и коммерческого вектора pET 23-b. Цитопротекторную и цитотоксическую активности proNT-3 оценивали по выживаемости клеток в норме и в условиях депривации ростовых факторов (инкубация 24 ч в среде без сыворотки). Жизнеспособность клеток определяли с использованием МТТ-теста, а количество апоптотических клеток — окрашиванием клеток флуоресцентным красителем Хёхстом 33258. Показано, что длительная инкубация клеток PC12 с proNT-3 (50 нг/мл) не влияла на жизнеспособность клеток и не приводила к увеличению количества апоптотических клеток. Депривация ростовых факторов приводила к снижению жизнеспособности клеток и к увеличению процентного содержания апоптотических клеток. Культивирование клеток во время депривации с proNT-3 не приводило к изменению жизнеспособности клеток, но несколько снижало содержание апоптотических клеток. Таким образом, реконструированный proNT-3 человека не оказывал цитотоксического и проапоптотического действия на культуру клеток PC12. В дальнейшем планируется проведение аналогичных исследований с предшественниками других нейтрофинов — BDNF и NGF.

**БИОЛОГИЯ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ПРИМАТОВ В КУЛЬТУРЕ.** © В. З. Азрба, Л. А. Яковлева, Б. А. Лапин. ГУ Институт медицинской приматологии РАМН, Сочи.

Авторская коллекция постоянных культур лимфоидных клеток приматов (павианов, макаков и зеленых мартышек) нашего института включает в себя культуры, полученные из клеток злокачественных лимфом павианов и периферической крови клинически здоровых макаков и зеленых мартышек. Для сравнения характеристик культивируемых клеток обезьян и человека были использованы также широко распространенные культуры лимфоидных клеток человека Raji и P3HR-1. Морфологическая характеристика культур клеток человека и обезьян, изученная на препаратах, окрашенных по Романовскому—Гимза, различалась незначительно. Все культуры независимо от происхождения были представлены лим-

фобластами, характеризовались морфоструктурным разнообразием, размеры клеток варьировали от 10 до 32 мкм. При электронно-микроскопическом изучении клеток культур выявлялись клеточные элементы, которые по характеру ядра можно было разделить на два типа: элементы с округлым неразделенным ядром и клетки, имеющие расщепленные ядра. В части культур электронно-микроскопически определялись вирусные частицы двух типов. Первый тип вирусов по морфологической характеристике можно было отнести к вирусам герпеса. Популяция герпес-вирусов состояла из зрелых и незрелых вирусных частиц, локализующихся в ядре (нуклеокапсид) и цитоплазме клеток (зрелые вирусные частицы). Эти вирусные частицы были идентифицированы как подобные вирусу Эпштейна—Барр приматов. Второй тип вирусов представляли ретровирусы обезьян (STLV-1) из семейства ретровирусов человека HTLV-1. Были изучены адгезивные свойства поверхностных клеточных мембран культивируемых клеток, оцениваемые по количеству физических частиц латекса, прилипших к 1 мкм<sup>2</sup> поверхности клетки. Наименьшей адгезивностью характеризовались клетки культур, полученных из злокачественных лимфом, наибольшей — клетки культур неопухолевого происхождения. При культивировании клеток в полужидком агаре выявились их различия в способности образовывать колонии. Отмечалась существенная разница в количестве и форме колоний культур опухолевого происхождения (лимфомные культуры) по сравнению с клетками лимфобластоидных культур. Доля колониеобразующих клеток и размеры колоний в культурах опухолевого происхождения и в культурах, обладающих опухолевыми потенциями, существенно выше, чем в культурах неопухолевого характера. Иммунофенотипическое изучение культивируемых клеток осуществляли с помощью проточной двухцветной цитофлуориметрии на автоматическом цитофлуориметре FAC-Scan (Becton Dickinson MV, CA) с панелью МКАТ к 14 кластерам лейкоцитарных дифференцировочных антигенов человека. Наряду с культурами клеток с преимущественно либо В-, либо Т-клеточной специфичностью имелись культуры, клетки которых экспрессировали и В-, и Т-клеточные маркеры одновременно. Нельзя исключить также экспрессию маркеров различной клеточной специфичности на одних и тех же клеточных элементах, как это уже было описано при иммунофенотипировании клеток злокачественных лимфом павианов, когда на Т-клетках определялись маркеры В-клеточной специфичности (CD40 и Bgp95; Indghii et al., 1992). Иммунологическое изучение такой широко распространенной в лабораторной практике культуры клеток человека, как культура P3HR-1, позволило выявить моноклональный характер этой культуры, элементы которой представляют активированные В-лимфоциты CD23+, имеющие k-фенотип. Клетки другой известной лимфоидной культуры человека, Raji, имеют также k-фенотип и экспрессируют В-клеточные маркеры CD10, Cd19 и CD24; Т-клеточных маркеров в обеих культурах выявлено не было. Описанные биологические характеристики лимфоидных культур приматов важны для адекватного использования их в медико-биологической практике.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 02-04-49671).

ВЕДУЩАЯ РОЛЬ ARP2/3-ЗАВИСИМОЙ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ АКТИНА И ФОРМИРОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ АДГЕЗИОННЫХ СТРУКТУР В ПЕРЕСТРОЙКАХ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ДВИЖЕНИЕ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ. © А. Ю. Александрова, М. С. Шутова. НИИ канцерогенеза РОНЦ РАМН, Москва.

В основе движения клеток лежат перестройки активного цитоскелета. Инициальным шагом является формирование так называемого ведущего края, на котором происходят выбрасывание отростков и образование контактов с внеклеточным матриксом. Именно образование первичных фокальных комплексов в узкой периферической зоне — ламеллиподии — приводит к перестройке актиновой сети из густой сети однонаправленных филаментов к формированию пучков, в состав которых входят филаменты с разной направленностью плюс- и минус-концов. В дальнейшем за счет сокращения образовавшихся актин-миозиновых пучков, прикрепленных к фокальным контактам, клетка подтягивается и перемещается по субстрату. Таким образом, принято считать, что направленное клеточное движение обеспечивается двумя основными составляющими: *Arp 2/3*-зависимой полимеризацией актиновой сети на краю клетки, которая приводит к формированию новых отростков, и реорганизацией цитоскелета в результате актин-миозиновых взаимодействий. С помощью различных ингибиторов мы выясняли роль каждой из этих составляющих. Мы показали, что подавление сократимости клеток с помощью ингибитора Rho-киназы Y27632, так же как и блебистатина (специфичного ингибитора АТФазы миозина II), приводит к увеличению эффективности миграции клеток в рану, т. е. как количество выползающих клеток, так и расстояние, которое клетки проползли за 1 сут, увеличивается в 1.5 раза. При этом у клеток, обработанных этими ингибиторами, хорошо выражена периферическая сеть актина (ламеллиподия), но практически не образуется нормальных пучков микрофиламентов, возникают только инициальные фокальные комплексы, которые не созревают в фокальные контакты, и остаются длинные хвосты, которые не могут сократиться. При миграции таких клеток в рану не происходит аккуратного формирования клеточного слоя, отдельные клетки перекрываются хвостовыми отростками и часто наползают друг на друга. При подавлении полимеризации актина на краю клетки низкими дозами цитохалазина Д (0.2—0.4 мкг/мл) или латрункулина (2—4 мкг/мл) ламеллиподия пропадает, исчезают мелкие фокальные комплексы на краю клеток. Пучки микрофиламентов, содержащие миозин II, частично остаются в центральной части клетки, хотя существенно уменьшаются в размерах, и остаются фокальные контакты на концах этих пучков. При этом эффективность миграции клеток в рану существенно снижается. Таким образом, мы показали, что наиболее существенным этапом в направленном движении фибробластов является формирование ламеллиподии, осуществляющееся за счет полимеризации актиновой сети на краю клетки. Дальнейшие перестройки актинового цитоскелета за счет актомиозиновой сократимости скорее нужны для поддержания формы клеток и правильного формирования клеточных пластов, чем непосредственно для направленного движения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48146а).

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ. © М. А. Александрова,<sup>1</sup> М. В. Марей,<sup>2</sup> О. В. Подгорный,<sup>1</sup> Р. А. Полтавцева,<sup>1</sup> Б. А. Вердиев,<sup>1</sup> Р. Д. Зиновьева,<sup>1</sup> Г. Т. Сухих.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Институт биологии развития РАН, alexandrova@vigg.ru, и <sup>2</sup> Центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, Москва.

Одним из определяющих свойств нейральных стволовых клеток помимо самоподдержания и мультипотентности является их способность формировать нейросферы в культуре ткани. Нейросферы используют для анализа клеточных фенотипов и генетических маркеров, геной инженерии и для трансплантации в ЦНС. Для целей клеточной терапии чрезвычайно важен состав нейросфер, поэтому в нашем исследовании мы проводили количественный анализ фенотипов клеток, составляющих нейросферы, в процессе культивирования. В работе применяли методы иммуногистохимии, ПЦР-анализа и проточной цитофлуориметрии. Клетки для культивирования были выделены из закладки неокортекса мозга плода человека 9.5 нед развития. Иммуногистохимический анализ клеток эмбрионального переднего мозга свидетельствовал о том, что в вентрикулярной зоне идет активная пролиферация и здесь располагаются стволовые клетки, окрашенные позитивно на нестин и виментин, а далее, в субвентрикулярной зоне, находятся нейробласты с окраской на бета-III-тубулин. Астроцитарных клеток с окраской на глиальный кислый фибриллярный белок (ГКФБ) не было выявлено. ПЦР-исследование подтвердило экспрессию указанных маркеров и выявило высокий уровень экспрессии регуляторных генов *Pax 6* и *PROX 1*. Эта популяция клеток была помещена в бессывороточную среду с добавками фактора роста фибробластов и эпидермального фактора роста. Через 5—7 сут в культуре формировались нейросферы, которые по мере роста пипетировали с одновременной сменной среды через каждые 7 сут. Фенотипы клеток исследовали иммуногистохимически в свободноплавающих и прикрепленных нейросферах. Нейросферы имели размеры от 50 до 200 мкм и очень различались по клеточному составу. Однако во всех наблюдалась тенденция к уменьшению количества нестин-позитивных клеток с увеличением размера нейросфер. С ростом клеточной массы в нейросферах в прогениторных клетках начинается дифференцировка и нейрональная опережает глиальную. Обычно в мелких нейросферах присутствуют нейробласты, а в крупных — астроциты или оба типа клеток. При цитофлуориметрическом анализе клеток нейросфер (12 сут культивирования) в них было обнаружено 15 % виментина, 27 % бета-III-тубулина, 18 % ГКФБ и 18 % маркера дифференцированных нейронов (NeuN), что соответствовало морфологическим данным. По мере роста культуры соотношение клеток в нейросферах значительно изменялось, и к 28 сут содержание компонентов было следующим: виментина — 35 %, бета-III-тубулина — 42, ГКФБ — 40 и NeuN — 34 %. При морфологическом исследовании прослеживалось такое же увеличение прогениторов и дифференцирующихся клеток в нейросферах. Нейробласты приобретали четкие формы уни-, би- и мультиполярных нейронов с выраженными конусами роста, а астроциты подразделялись на два типа. Через 42 сут, по данным цитофлуориметрии, состав нейросфер изменялся следующим образом: виментина — 6 %, бета-III-тубулина — 4, ГКФБ — 015 и NeuN — 7 %.

А морфологический анализ свидетельствовал о дегенерации нейробластов в значительной части глиальных клеток. Исследование показало, что нейросферы представляют собой клеточную микросистему, в которой рекапитулируется программа дифференцировки, сходная с нормальной. Сначала доминируют нейробласты, затем формируются глиобласты, далее их численный состав практически выравнивается и достигает максимума к 1-месячному сроку культивирования. В дальнейшем начинается дегенерация клеток, которая затрагивает и нейрональную, и глиальную популяции. В данных условиях культивирования стволовые клетки не способны к длительному самоподдержанию и мультипотентности, а дифференцированные клетки дегенерируют, и из них остаются практически только глиальные клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-48031) и по программе «Молекулярная и клеточная биология».

**КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ГИБРИДНЫХ ФОРМ ТЮЛЬПАНА.** © А. Ш. Ахметова, Р. К. Байбурина, Л. Н. Миронова. Ботанический сад-институт Уфимского научного центра РАН.

В преодолении трудностей, связанных с получением устойчивых гибридных форм при отдаленной гибридизации тюльпанов (зародыш часто развивается до определенной стадии, а затем дегенерирует), а также в связи с длительным ювенильным периодом, затягивающим получение сорта до 20—25 лет, существенную помощь может оказать метод культуры изолированных зародышей. Культура зародышей *in vitro* является одним из методов, которые позволяют получить гибриды с жизнеспособным потомством. Возможность получения полноценных растений из изолированных зародышей на искусственной питательной среде зависит от многих факторов, в том числе и от фазы их развития и сроков изоляции. Показано, что эмбриокультура является перспективным способом получения межсортовых гибридов тюльпана. Оптимальный срок изоляции зародышей семян тюльпана — 53—56 сут после опыления. Для получения жизнеспособных эксплантов и увеличения их приживаемости в культуре *in vitro* рекомендуется использовать дифференцированные торпедовидные зародыши размером 1.5—3.0 мм. Для формирования микролуковичек *in vitro* необходимо 30—120 сут. Продолжительность периода получения микролуковиц из изолированных зародышей тюльпана составляет 17—19 мес и зависит от сортовых особенностей родительских форм и условий культивирования *in vitro*.

**ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ ТРАНСПОРТ ЭЗРИНА В КЛЕТКАХ A431.** © В. Бабаков,<sup>1</sup> А. Большакова,<sup>1</sup> О. Петухова,<sup>1</sup> Л. Туроверова,<sup>1</sup> Д. Тентлер,<sup>1</sup> К.-Э. Магнуссон,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup> Университет г. Линчепинг, Швеция.

Эзрин и другие члены ERM-семейства — моззин и радиксин — являются важными компонентами подмембранного цитоскелета, обеспечивающими взаимодействие актиновых филаментов с рецепторами. Только часть ERM локализуется в подмембранном пространстве, где

они функционируют как актинсвязывающие белки. Другая часть растворена в цитоплазме и слабо взаимодействует с актином. Это предполагает наличие сложного механизма в регуляции связывающей активности ERM-белков. Хотя ранее было отмечено накопление эзрина и членов ERM-семейства в ядре, процессы транспорта этих белков в ядро и условия их накопления в ядре все еще плохо изучены. Кроме того, было неизвестно, происходит ли накопление эзрина в ядре при стимуляции клеток. Для проверки этого предположения были выбраны клетки линии A431 при действии ЭФР. Эзрин является одной из главных мишеней тирозинкиназы рецептора ЭФР. Кроме того, динамика эзрина в этих клетках при действии ЭФР уже исследовалась ранее. Нами установлено, что при действии на клетки ЭФР эзрин перераспределяется из ламеллы в область дорсального рафплинга и затем в ядро в течение 5—10 мин. Данные по транспорту эзрина в ядро получены методами иммунофлуоресценции и иммуноблотинга ядерных экстрактов. Транспорт в ядро является высокодинамичным, и так же высокодинамичен выход эзрина из ядра: так, через 0.5—1.0 ч действия ЭФР эзрин обнаружен в ядрах отдельных клеток. Существуют более ранние работы по перераспределению эзрина в клетках A431, однако в этих работах не показывалась ядерная локализация эзрина при действии ЭФР. При изучении динамики ERM-белков часто используют поляризованные или конфлюэнтные клетки, в которых не выявляется ядерный эзрин. Более того, обычно основное внимание при изучении эзрина уделяют специальным клеточным структурам, таким как микроворсинки, и вполне возможно, что оптимизация изображений этих структур приводит к потерям изображений, указывающих на возможную ядерную локализацию. Эзрин также имеет последовательности, похожие на сигнал ядерного экспорта NES. Действие лептомицина В, специфического ингибитора CRM-1-опосредованного ядерного экспорта, приводит к накоплению эзрина в ядре через 30 мин действия. Ядерные функции эзрина еще не определены, но можно предположить его участие в нескольких ядерных процессах. Наиболее вероятной функцией эзрина в ядре, на наш взгляд, является участие в процессах сплайсинга и транспорта мРНК. В пользу этого предположения говорят данные о взаимодействии близкородственного белка мерлина с РНК-связывающим белком. Кроме того, ERM-семейство белков входит в состав суперсемейства белка полосы 4.1, ядерной функцией которого является участие в сплайсинге РНК.

**ОСОБЕННОСТИ РОСТА МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ ИЗ ЗОНЫ ОТЧУЖДЕНИЯ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ.** © Т. А. Белозерская,<sup>1</sup> К. Б. Асланиди,<sup>2</sup> М. А. Цыганов,<sup>2</sup> А. Е. Иванова,<sup>3</sup> Ю. В. Карпенко,<sup>4</sup> Н. Н. Жданова.<sup>4</sup> <sup>1</sup> Институт биохимии РАН, Москва, tab@inbi.gas.ru, <sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, <sup>3</sup> Московский государственный университет и <sup>4</sup> Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев.

В условиях радиоактивного загрязнения мицелиальные грибы по своей жизнеспособности и активной иммобилизации радионуклидов не имеют конкурентов среди бактерий, растений и животных. Известно, что низкая скорость роста и содержание меланинов в клетках мик-

ромицетов обуславливают их повышенную выживаемость в экстремальных условиях (Hanover et al. *Mycol. Res.*, 2000, **104**: 1421—1426). Задачей исследования было выявление фенотипических особенностей грибов-экстремофилов при культивировании в лабораторных условиях, а также при нагрузке  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  представляют большой интерес для моделирования влияния радиации на живые объекты, так как повреждения клетки продуктами радиационного разложения воды составляют до 90 % всех повреждений, обусловленных ионизирующим излучением (Korystov. *Radiat. Res.*, 1992, **129**: 228—234). В качестве объектов исследования были отобраны два вида мицелиальных микроскопических грибов, содержащих меланины, — *Cladosporium cladosporioides* и *Alternaria alternata* — и гриб *Paecilomyces lilacinus*, не содержащий меланиновых пигментов. Колонии микроскопических грибов выращивали при 25 °С в течение 2 сут на целлофане в чашке Петри с агаризованной средой Чапека. Далее от краевой зоны колонии отделяли кусочек целлофана с растущими гифами и переносили на предметное стекло, покрытое средой Чапека с заданной концентрацией  $H_2O_2$  ( $10^{-7}$ — $10^{-1}$  М). Препарат помещали на столик микроскопа, находящегося во влажной термостатируемой камере (25 °С). Изображение растущих гиф поступало на плату Pixel View Station с помощью CCD-камеры, установленной на микроскопе. Контролем служили грибы, культивируемые на среде Чапека, не содержащей  $H_2O_2$ . Впервые показана связь скорости роста и морфологических особенностей грибов из зон с разным уровнем радиоактивного загрязнения. Одним из видов приспособительной ростовой стратегии, способствующей увеличению скорости роста в условиях радиоактивного загрязнения, является способность к агрегации гиф (*A. alternata* и *P. lilacinus*). Штаммы грибов, обладающие повышенной способностью к агрегации (*C. cladosporioides*), в условиях фоновой радиоактивности реагируют на загрязнение среды радионуклидами понижением скорости роста. Выявлены три типа ростовых реакций грибов при инкубации с  $H_2O_2$ : 1) отсутствие изменения скорости удлинения гиф в диапазоне концентраций от  $10^{-7}$  до  $10^{-4}$  М и уменьшение скорости при концентрации  $10^{-3}$  М, 2) постепенное замедление роста при возрастании концентраций  $H_2O_2$  и 3) увеличение скорости удлинения гиф при малых концентрациях  $H_2O_2$  ( $10^{-7}$ — $10^{-5}$  М). «Фоновые» штаммы отличались разнообразием ростовых реакций на действие  $H_2O_2$ . Штаммы грибов, выделенные из радиоактивно загрязненных местообитаний, обладали большей резистентностью к действию  $H_2O_2$  наряду с ограничением в разнообразии ростовых реакций. Интересно, что эти свойства грибов, выделенных из зоны отчуждения ЧАЭС, сохраняются в течение длительного времени (до 30 пассажей, в течение 15 лет). При действии  $H_2O_2$  на клетки микроскопических грибов было обнаружено временное замедление скорости удлинения гиф и их последующая стабилизация на новом уровне. Эта реакция гиф определялась концентрацией  $H_2O_2$ . Концентрация  $10^{-3}$  М вызывала торможение роста гиф всех исследованных штаммов. Концентрация  $10^{-1}$  М была для грибов летальной. Представлена математическая модель, описывающая рост микроскопических грибов в градиенте концентрации  $H_2O_2$ .

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ В КУЛЬТУРЕ. © Г. Б. Белостоц-

кая, Е. А. Захаров, Т. А. Голованова. Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, Санкт-Петербург.

Работа посвящена изучению дифференцировки сердечных миоцитов крысы в процессе их роста и развития в культуре на протяжении 12 сут наблюдения. Сердечные клетки выделяли с помощью коллагеназы I (1 мг/мл) и трипсина (0.25 %) в растворе Рингера для грызунов (146 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ  $CaCl_2$ , 1 мМ  $MgCl_2$ , 11 мМ глюкозы и 10 мМ HEPES, pH 7.4) в течение 20 мин при 37 °С. Клетки культивировали в среде DMEM с 10 % сыворотки плодов коров и антибиотиками. Для оценки степени зрелости (дифференцировки) пролиферирующих мышечных клеток изучали  $Ca^{2+}$ -ответы на ряд агонистов рецепторов наружной мембраны и рецепторов мембраны саркоплазматического ретикулума. Были использованы: ацетилхолин (АХ, 20 мкМ) как агонист мускариновых рецепторов; KCl (120 мМ) — агонист  $Ca^{2+}$ -каналов наружной мембраны; кофеин (Кф, 5—10 мМ), взаимодействующий с рианодиновыми рецепторами саркоплазматического ретикулума (СР); АТФ (180 мкМ) — агонист пуриnergических рецепторов; мезатон (фенилэфрин, 0.01 %) — агонист адренорецепторов. Концентрацию внутриклеточного содержания свободных ионов кальция [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> — измеряли с помощью флуоресцентного зонда Фура-2АМ (10 мкМ) как соотношение интенсивностей флуоресценции при 340 и 380 нм с использованием компьютерной системы анализа внутриклеточного содержания ионов (Intracellular Imaging & Photometry System, США). Проведенные исследования показали, что популяция кардиомиоцитов новорожденных крыс в культуре состоит из двух субпопуляций. Большая часть сердечных клеток не делится, образуя группу дифференцированных кардиомиоцитов, часть из которых сохраняет способность к сокращению. Через 1 сут после посева в пролиферацию вступает не более 25 % исходного количества клеток. Доля митозных клеток со временем снижается, доходя через 7—8 сут до 7 %. Клетки, сохраняющие пролиферативную активность, образуют зоны роста, в которых через 11—12 сут культивирования формируются пульсирующие колонии. Параллельно пролиферации наблюдаются гипертрофия и полиплоидизация кардиомиоцитов с образованием многоядерных, в основном двуядерных, клеток. В первые 2 сут кардиомиоциты отвечают кратковременным увеличением [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> только на АХ и мезатон. Спустя 3—4 сут появляется  $Ca^{2+}$ -ответ на KCl, и только сокращающиеся кардиомиоциты (на 11-е сут развития) способны давать кратковременный выброс  $Ca^{2+}$  при воздействии Кф. АТФ вызывает  $Ca^{2+}$ -ответ на всех сроках культивирования. Зрелые сокращающиеся кардиомиоциты отвечали кратковременным выбросом  $Ca^{2+}$  на все примененные воздействия. Однако стоит отметить, что доля клеток, отвечающих на мезатон, была незначительной. Полученные данные позволяют утверждать, что в популяции делящихся кардиомиоцитов созревание рецепторов наружной мембраны начинается через 4 сут культивирования, а рианодиновые рецепторы СР приобретают способность реагировать на действие кофеина только через 11 сут, что является завершающим этапом дифференциации сердечных клеток и обеспечивает их способность к сокращению. Однако на ранних сроках наблюдался кратковременный выброс  $Ca^{2+}$  в ответ на действие 4-хлоро-м-крезола (Кз) в концентрации 1—2 мМ. Поскольку и Кф, и Кз взаимодействуют с рианодиновыми рецепторами СР, а кардиомиоци-

ты по-разному реагируют на действие этих агонистов, в дальнейшем представляется интересным выявить природу этого различия. При устранении  $\text{Ca}^{2+}$  из наружной среды у развивающихся и зрелых кардиомиоцитов воздействие КС1 вызывает кратковременный  $\text{Ca}^{2+}$ -ответ, тогда как ответ на Кф значительно снижен по амплитуде по сравнению с контролем, что демонстрирует разницу между кардиомиоцитами в культуре и сердечными клетками *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49833).

**ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ САТЕЛЛИТНЫХ КЛЕТОК.**  
© Г. Б. Белостоцкая, Е. А. Захаров, И. В. Дарашина. Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, Санкт-Петербург.

Задачей работы было изучение  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов на ряд воздействий у скелетных мышечных клеток в процессе их развития *in vitro* от одноядерных миоцитов до многоядерных сокращающихся миотрубок. Сателлитные клетки мышц лапок новорожденной крысы получали с помощью коллагеназы I (2 мг/мл) в растворе Рингера для грызунов (146 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 11 мМ глюкозы и 10 мМ HEPES, pH 7.4) в течение 40 мин при 37 °С. Клетки культивировали в среде DMEM с 10 или с 2 % сыворотки плодов коров (ЭС), 10 % инактивированной лошадиной сыворотки (ЛС) и антибиотиками. В обоих случаях на 4-е сут культивирования производили смену среды на среду DMEM с 10 % ЛС и антибиотиками. Снижение содержания в первоначальной среде ЭС позволяло сократить период активной пролиферации миоцитов и ускорить процесс слияния и дифференцировки миотрубок. Для оценки степени дифференцировки скелетных мышечных клеток изучали  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы на ряд агонистов рецепторов наружной мембраны — ацетилхолина (АХ, 20 мкМ), КС1 (120 мМ), АТФ (180 мкМ), мезатона (фенилэфрина, 0.01 %) — и агониста рецепторов мембраны саркоплазматического ретикулума кофеина (Кф, 5 мМ). Концентрацию внутриклеточного содержания свободных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  —  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  — изучали с помощью флуоресцентного зонда Фура-2АМ (10 мкМ) как соотношение интенсивностей флуоресценции при 340 и 380 нм с использованием компьютерной системы анализа внутриклеточного содержания ионов (Intracellular Imaging & Photometry System, США). Показано, что миоциты начинают пролиферировать через 1 сут после посева сателлитных клеток. Доля клеток, вступающих в митоз в первые 2—3 сут культивирования, держится на уровне 90 %. Слияние миоцитов наблюдается на 3—4-е или 5—6-е сут, а образование сокращающихся миотрубок происходит на 7-е или 11-е сут культивирования при посеве на среды с 2 или 10 % ЭС соответственно. В период активной пролиферации (1—3 или 1—5 сут в зависимости от условий культивирования) клетки не дают ощутимого  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа на действие агентов, запускающих цепь электромеханического сопряжения в зрелой клетке, — АХ, КС1 и Кф. Это говорит о незрелости  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в случае действия КС1 и рианодиновых рецепторов при воздействии Кф. Незначительно выраженный ответ на АХ свидетельствует

о незрелости или малочисленности АХ-рецепторов. Увеличение доли клеток, отвечающих повышением  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в ответ на действие АХ, КС1 и Кф, совпадает с началом слияния миоцитов и прекращением их пролиферации и достигает 100 % при образовании многоядерных сокращающихся миотрубок, что свидетельствует о полном созревании мышечных клеток через 7 или 11 сут при двух вариантах культивирования. Действие АТФ вызывает кратковременное повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на протяжении всего периода наблюдения. Мезатон — агонист адренорецепторов — стимулирует  $\text{Ca}^{2+}$ -ответ только в период активного деления миоцитов, которые находятся в это время в недифференцированном состоянии. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в первичной культуре сателлитных мышечных клеток крысы пролиферация предшествует дифференцировке, а не происходит одновременно с ней, как предполагалось Рантаненом и соавторами (Rantanen et al., 1995). Начало дифференцировки сопровождается формированием  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов наружной мембраны, созреванием рианодиновых и АХ-рецепторов, что обеспечивает работу всех структурно-функциональных элементов цепи ЭМС. Наличие  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов при действии КС1 и Кф в бескальциевой среде показывает, что развивающиеся миоциты и миотрубки — потомки сателлитных клеток — демонстрируют в культуре типичный для скелетных мышц вариант ЭМС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49833).

**ИЗУЧЕНИЕ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОГО КОММУНАЛЬНОГО ЭФФЕКТА В РЕЗУЛЬТАТЕ МИКРОПУЧКОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР, ЭКСПЛАНТОВ И ИСКУССТВЕННЫХ ТКАНЕВЫХ МОДЕЛЕЙ.** © О. В. Беляков. Центр ядерной и радиационной безопасности, Хельсинки, Финляндия, oleg.belyakov@stuk.fi.

Настоящее сообщение является обзором десятилетней серии экспериментов по изучению немишенного эффекта в различных биологических системах, индуцированного облучением малыми и сверхмалыми дозами ионизирующей радиации. Теория мишени, доминирующая в радиобиологии, предполагает, что биологический эффект ионизирующей радиации обусловлен повреждением ДНК, которое происходит во время облучения или непосредственно после него. С другой стороны, принято считать, что потенциальные последствия облучения могут проявиться в течение одного или двух клеточных поколений. Тем не менее исследования последних лет продемонстрировали, что классическая парадигма радиобиологии, кратко описанная выше, является неверной или по крайней мере неполной. Ряд данных, полученных многими независимыми исследователями, указывает на факты существования «немишенного» эффекта, которые не согласуются с классическими представлениями в радиобиологии. Подобные феномены включают в себя коммунальный эффект, генетическую нестабильность, адаптивный ответ, эффект гиперчувствительности в области малых доз, абскопальный эффект в радиотерапии, существование кластогенных факторов, длительно сохраняющуюся повышенную гибель потомков облученной клетки и немишенную активацию экспрессии генов

радиацией. Две основные особенности немитических эффектов состоят в том, что для их индукции не требуется непосредственного облучения ядра клетки и они наиболее полно проявляются в случае малых доз (менее 0.2 Гр). Совокупность этих данных позволяет говорить о появлении новой парадигмы (Baverstock, Belyakov. Hum. Exp. Toxicol. 2005, 24: 537—542) радиационной биологии, которая ставит под сомнение универсальность теории мишеней. В настоящем сообщении мы сконцентрируем на одном из немитических эффектов — коммунальном феномене. Радиационно-индуцированный коммунальный эффект проявляется в форме сестринских хроматидных обменов, хромосомных aberrаций, апоптоза, появления микроядер, трансформации, преждевременной дифференциации и в изменении экспрессии различных генов в необлученных клетках, которые находятся рядом с облученными. Большинство наших экспериментов было проделано с использованием микропучков заряженных частиц. Важная особенность такого подхода состоит в том, что микропучок способен облучать ядра (или другие части) индивидуальных клеток определенным количеством протонов или ионов с микронной или субмикронной точностью. Такой подход позволяет подвергать действию радиации отдельные клетки, которые окружены необлученными культурами, а также точно рассчитывать ядерную дозу пораженной клетки. Мы были первой группой, которая представила прямое доказательство существования коммунального феномена после облучения индивидуальных клеток нормальных фибробластов человека AG01522 микропучком  $^3\text{He}^{2+}$ -ионов в форме увеличения фракции апоптоза и клеток с микроядрами (Prise et al. Int. J. Radiat. Biol., 1998, 74: 793—798; Belyakov et al. Brit. J. Cancer, 2001, 84: 674—679). Следующий этап наших исследований заключался в переходе от клеточных культур к технике эксплантов. Опыт радиационной биологии подсказывает, что эффекты облучения многоклеточных организмов проявляются на уровне тканей и индивидуальные клетки не могут рассматриваться как изолированные функциональные единицы в этом процессе. По этой причине необходимы экспериментальные модели, в которых присутствуют межклеточные коммуникации тканевого типа, есть пролиферирующие и дифференцирующиеся клетки. В качестве такой модели мы использовали уротелиальные экспланты. Значительный пролиферативно-зависимый коммунальный эффект был продемонстрирован для человека и свиньи после микропучкового облучения (Belyakov et al. Brit. J. Cancer, 2003, 88: 5767—5774). Эти результаты навели нас на мысль о возможной роли клеточной дифференциации. Используя ту же экспериментальную модель, мы впервые продемонстрировали значительное увеличение преждевременной дифференциации в результате коммунального эффекта после микропучкового облучения (Belyakov et al. Mutat. Res., 2006, 597: 43—49). Основная идея наших последующих экспериментов состояла в том, что коммунальный эффект может являться существенным механизмом тканевой защиты от последствий облучения. Такая постановка вопроса потребовала найти новую *in vivo*-подобную многоклеточную модель с интактной трехмерной тканевой микроархитектурой и микросредой. С другой стороны, данная система должна была подходить по техническим требованиям для облучения микропучком, быть достаточно стабильной и воспроизводимой. Всем этим качествам удовлетворяли Искусственные человеческие тканевые

системы (MatTek, Boston, США). С помощью специально разработанного метода мы продемонстрировали, что коммунальный эффект после облучения микропучком  $\alpha$ -частиц может распространяться на расстояние до 1 мм в ткани. Статистически достоверное увеличение количества клеток с микроядрами и апоптоза было обнаружено (Belyakov et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 2005, 102: 14 203—14 208). На основании полученных экспериментальных данных мы выдвигаем гипотезу, согласно которой главная функция коммунального эффекта на уровне ткани и в конечном счете организма — уменьшение риска канцерогенеза в результате действия малых доз ионизирующей радиации. Можно предположить, что индивидуальные клетки в составе ткани не могут непосредственно регистрировать облучение как таковое и, таким образом, реакция на индивидуальном уровне не выражается. С другой стороны, многоклеточный организм как интегрированная система имеет возможность определить локальные радиационные повреждения и компенсировать их путем удаления потенциально поврежденной функциональной группы клеток из пролиферативного пула, например с помощью апоптоза или преждевременной дифференциации. Исследования показывают, что не все клетки могут быть индуцированы гипотетическим коммунальным фактором, выделяемым облученной клеткой. Скорее всего, существует группа чувствительных клеток по причине нахождения их в определенной стадии клеточного цикла. Таким образом, коммунальный эффект делает тканевые системы более устойчивыми к действию малых доз радиации. Коммунальный эффект может играть серьезную роль в нескольких областях, имеющих отношение к радиации: 1) оценка риска канцерогенеза в результате вдыхания обогащенного радоном воздуха и поглощения пищи или воды с естественным высоким содержанием радионуклидов; 2) оценка радиобиологических эффектов высокоэнергичных ионов с высокими зарядами во время космических миссий; 3) отдаленные последствия высокоэнергичной радиотерапии; 4) влияние малых доз облучения на здоровье работников атомного промышленного комплекса и экипажей самолетов дальнего следования; 5) коммунальный эффект может оказать серьезное влияние на стратегию радиационной защиты и выработку более эффективных радиационно-гигиенических мер; 6) в особенности коммунальный эффект может быть серьезным аргументом для ревизии линейной беспороговой концепции (ЛБК) в области малых доз.

**ФУАЗОЛИДОНЗАВИСИМАЯ СПОСОБНОСТЬ НЕПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ К ИНВАЗИИ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ.** © Е. С. Божокина, Т. Н. Ефремова, С. Ю. Хайтлина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, skh@mail.cytspb.rssi.ru.

Инвазия патогенных бактерий в эукариотические клетки является существенной частью механизма распространения инфекции. Во взаимодействии бактерий с клеткой участвуют белки и токсины бактерий, с одной стороны, и сигнальная система клетки и актиновый цитоскелет — с другой. При этом характер процесса инвазии в первую очередь определяется бактериальными факторами. Ранее мы обнаружили инвазивные свойства непатогенных бактерий — продуцентов актин-специфической протеазы ECP 32. Методами флуоресцентной и

электронной микроскопии было показано, что бактерии *E. coli* штамма A2 проникают в клетки и вызывают разборку актиновых элементов цитоскелета (Efremova et al., 2001). Аналогичная протеолитическая активность и способность к инвазии были обнаружены в непатогенных бактериях *Shigella flexneri* штамма 5a2c, потерявших вирулентную плазмиду в результате обработки фуразолидоном (Федорова, Хайтлина, 1990; Ефремова и др., 2004), а также в непатогенных бактериях других видов, выделенных от пациентов, длительно принимавших фуразолидон. Эти результаты позволяют предположить, что синтез актин-специфической протеазы и способность бактерий к инвазии индуцируются действием фуразолидона. Известно, что фуразолидон — препарат нитрофуранового ряда, который широко применяется в медицинской практике для лечения кишечных и почечных инфекций, — является мутагеном. Поэтому задачей настоящей работы была попытка использования фуразолидона *in vitro* для получения бактерий, синтезирующих актин-специфическую протеазу, и исследование взаимодействия этих бактерий с эукариотическими клетками в культуре. Обработке подвергались бактерии референтного штамма *E. coli* ССМ 5172, использованные нами ранее в качестве контроля, поскольку они не проникали в клетки и не вызывали изменений цитоскелета (Efremova et al., 2001). Для получения мутантов 1-суточную культуру бактерий *E. coli* ССМ 5172 инкубировали в агаризованной среде, содержащей фуразолидон (1 мг/мл), при температуре 28 °С в течение 5 сут (Федорова, 1982). Для определения активности бактерии выдерживали в жидкой среде LB без фуразолидона при 37 °С без аэрации в течение 1 сут и инкубировали с клетками эпидермоидной карциномы гортани Нер-2 или разрушали многократным замораживанием—размораживанием. Протеолитическую активность бактериальных экстрактов определяли по их способности расщеплять экстракты (Khaitlina et al., 1991). При этом оказалось, что экстракты бактерий, подвергшихся действию фуразолидона, обладают протеолитической активностью, сходной с активностью протеазы ЕСР 32 как по характеру расщепления актина, так и по зависимости эффекта от возраста бактериальной культуры. Обнаруженная активность сохранялась при пассировании бактерий. По данным конфокальной микроскопии, бактерии нового штамма проникали в клетки Нер-2 и вызывали разборку актиновых элементов цитоскелета. Полученные данные свидетельствуют о том, что фуразолидон индуцирует новый механизм инвазии бактерий в эукариотические клетки, что может приводить к проявлению «вторичной» инвазионной активности патогенных бактерий и вызывать повреждение клеток исходно непатогенными бактериями, которые приобрели способность к инвазии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49604).

**ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ Р65-СУБЪЕДИНИЦЫ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-KB В КЛЕТКАХ А431 ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И СТИМУЛЯЦИИ ЭФР.** © А. Большакова,<sup>1</sup> А. Емельянов,<sup>1</sup> О. Петухова,<sup>1</sup> В. Бабаков,<sup>1</sup> Л. Туроверова,<sup>1</sup> Д. Тентлер,<sup>1</sup> К.-Е. Магнуссон,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup> Университет г. Линчепинг, Швеция.

Транскрипционный фактор NF-kB активируется в цитоплазме при действии различных стимулов, после чего транспортируется в ядро, где моделирует активность большого числа генов. Исследования последних лет показали, что NF-kB обладает способностью к челночному перемещению между ядром и цитоплазмой в покоящихся клетках и при стимуляции TNF. Функции NF-kB в цитоплазме пока неизвестны. Полученные нами ранее данные показывают, что р65-субъединица NF-kB солокализуется с актиновым цитоскелетом, причем после обработки цитохалазином Д также обнаруживается в актинсодержащих структурах. Для дальнейшего изучения роли актинового цитоскелета в позиционировании NF-kB мы исследовали перераспределение р65-субъединицы NF-kB в клетках А431 после разборки актинового цитоскелета цитохалазином Д методом иммунофлуоресценции и иммуноблотинга. Задача заключалась в определении того, связаны ли перемещения р65-субъединицы с перестройкой цитоскелета в результате восстановления актиновых структур или же для этого требуются дополнительные стимулы. Клетки обрабатывали цитохалазином Д и через 30 мин заменяли среду с цитохалазином Д на среду ДМЕМ (1), среду ДМЕМ, содержащую ЭФР (2), или среду ДМЕМ с цитохалазином Д и ЭФР (3). Через 5 и 30 мин стимуляции клетки фиксировали и инкубировали с антителами к р65-субъединице и окрашивали актиновый цитоскелет. Методом Вестерн-блотинга анализировали цитоплазматическую фракцию, фракцию, содержащую транскрипционные факторы и хроматин. После обработки клеток А431, распластанных на фибронектине, цитохалазином Д — агентом, разрушающим актиновые структуры, в течение 30 мин и последующей замены среды с цитохалазином на среду ДМЕМ в клетках происходило постепенное восстановление структур микрофиламентов. Р65 при этом обнаруживался по всей цитоплазме, а также в мелких агрегатах, содержащих актин. Инкубация в присутствии ЭФР приводила к образованию крупных агрегатов по краю клетки, в которых отчетливо солокализируются р65 и актиновые структуры. Инкубация с ЭФР в присутствии цитохалазина Д приводила к образованию множественных мелких агрегатов, в которых солокализируются актин и р65. В каждом исследуемом случае р65 обнаруживался в том числе и в ядре. Вестерн-блотинг показал, что при замене среды с цитохалазином Д на среду ДМЕМ не наблюдается накопления р65 в ядерных экстрактах. Только стимуляция ЭФР клеток с разрушенным цитоскелетом приводит к увеличению количества р65 в ядерной фракции, содержащей транскрипционные факторы. Инкубация клеток в среде с ЭФР в присутствии цитохалазина Д приводит к такому же результату, как в предыдущем случае. Значительная доля р65 обнаруживается во фракции белков, прочно связанных с хроматином после исчерпывающей экстракции ядерных белков 0.4 М NaCl. Полученные данные позволяют заключить, что для транспорта р65 в ядро недостаточно только восстановления актиновых структур, а требуется дополнительная стимуляция ЭФР. Перераспределение р65 в цитоплазме происходит как при восстановлении актиновых филаментов, так и при стимуляции ЭФР, причем ЭФР существенно усиливает этот процесс.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 03-04-48251) и по программе поддержки ведущих научных школ (НШ-7852.2006.4).

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОФОРМ АЛЬФА-АКТИНИНА 1 И 4 В КЛЕТКАХ ЛИНИИ А431. © А. Большакова,<sup>1</sup> О. Петухова,<sup>1</sup> В. Бабаков,<sup>1</sup> Л. Туроверова,<sup>1</sup> Д. Тентлер,<sup>1</sup> К.-Е. Магнуссон,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup> Университет г. Линчепинг, Швеция.

Альфа-актинин является актинсвязывающим белком, который связывает отдельные нити полимерного актина в пучки или сети и осуществляет контакт актиновых структур с плазматической мембраной. Известны четыре изоформы актина (100 кДа), две из них, актинин 1 и актинин 4, являются немышечными актинами. Предполагают, что эти изоформы могут играть разную роль в клеточной подвижности, адгезии клеток и что они регулируются различными сигнальными путями. Особым свойством актина 4 является способность транслицироваться в ядро и взаимодействовать с регуляторными молекулами и транскрипционными факторами. С целью выявления функциональных особенностей разных изоформ альфа-актина методами двойной иммунофлуоресценции в комбинации с конфокальной микроскопией и методом Вестерн-блота был проведен анализ распределения изоформ актина после воздействия ЭФР в клетках А431, культивируемых на пластике и после их расплавления на иммобилизованных белках внеклеточного матрикса. Поликлональные антитела, полученные на N-концевой пептид актина 4, выявляют белки в цитоплазматической фракции, в ядерной фракции, содержащей транскрипционные факторы, и во фракции белков, прочно связанных с хроматином. В цитоплазме помимо белка с электрофоретической подвижностью 100 кДа обнаруживается белок 72 кДа, характеризующийся исключительно цитоплазматической локализацией. В ядерных фракциях наряду с белком 100 кДа найдены белки 130 и 60 кДа. Моноклональные антитела к актину 1 выявляют в цитоплазме белки с мол. массой 100 и 72 кДа. В ядре выявляется белок 100 кДа во фракции, содержащей транскрипционные факторы, но не обнаруживается во фракции белков, связанных с хроматином. Сравнительный анализ распределения изоформ актина в цитоплазме показывает, что два белка, выявляемые антителами к актину 4, присутствуют примерно в одинаковом количестве, а в случае актина 1 доминирует белок с подвижностью 100 кДа, причем доля белка 72 кДа увеличивается при адгезии к белкам внеклеточного матрикса. Иммунофлуоресцентный анализ демонстрирует различную локализацию изоформ актина 1 и 4 в клетке и характер их перераспределения под действием ЭФР и цитохалазина Д. Распределение актинов в клетках, расплавленных на лигандах, зависит от условий, в которые клетки были помещены после обработки цитохалазином: в обычную среду, в среду с ЭФР или в среду с ЭФР в присутствии цитохалазина. Полученные данные о перераспределении актина 4 между ядерной фракцией, содержащей транскрипционные факторы, и фракцией белков, прочно связанных с хроматином, а также наши предыдущие результаты, демонстрирующие солокализацию и совместное перераспределение актина 4 и р65-субъединицы NF- $\kappa$ B в ядро, позволяют предположить, что этот актинсвязывающий белок играет важную роль в регуляции активности транскрипционных факторов. Результаты Вестерн-блоттинга также дают основания предполагать, что различное распределение двух изоформ актина может зависеть от образо-

вания фрагмента полноразмерного альфа-актина, наличие которого является регулируемым событием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-48251).

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАННЕГО ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПОВЯЗКИ НА ОСНОВЕ ЖИВЫХ АЛЛОГЕННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЛИНИИ М-22 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СУБДЕРМАЛЬНЫХ ОЖОГОВ. © В. С. Бочарова, О. И. Конюшко, Е. А. Жиркова, М. В. Сычевский. Научно-исследовательский институт скорой помощи, Москва.

В 2003—2005 гг. в Ожоговый центр нашего института поступили 2476 пациентов; 70 % из них имели обширные (более 10 % площади тела) ожоги II—IIIa степени. Совокупность тяжести больных, определяемой соматическим статусом, возрастом, степенью и локализацией поражения, определяет сложность выбора тактики лечения таких ожогов. Развитие новых медицинских технологий и методов диагностики, сосредоточение пациентов в специализированном отделении, располагающем широкими возможностями выбора метода лечения и взаимодействия с отделением биологических методов лечения, определяют актуальность разработки и применения новых методов лечения субдермальных ожогов. Субдермальный ожог IIIa степени устанавливает своего рода границу, разделяющую способность эпителия к спонтанной регенерации в течение 20—25 сут при поверхностных ожогах от невозможности самостоятельного заживления при поражениях IIIб—IV степени. В этом случае многочисленные очаги восстановительного роста эпителия возникают по всей поверхности ожоговой раны. Это в основном обеспечивается стволовыми клетками эпидермиса (СКЭ), сохранившимися в глубоких дериватах неповрежденной дермы (волосяные фолликулы, потовые и сальные железы). В связи с этим при лечении ожогов IIIa степени важно не допустить их углубления в результате развития гнойных осложнений и (или) формирования вторичных некрозов, что приведет к уничтожению сохранившихся при травме компартментов СКЭ кожных дериватов. Анализ данных литературы и собственный опыт использования методов клеточной терапии показали, что аллогенная трансплантация кератиноцитов, фибробластов и мезенхимальных клеток костного мозга сравнима по своей клинической эффективности и проявляется неспецифической стимуляцией регенерации эпителия, в основном за счет выделения пересаженными клетками в раневую среду факторов роста и молекул межклеточного матрикса. Известно, что в 1—2-е сут после травмы субдермальная ожоговая рана в большинстве случаев еще стерильна, однако клеточная антибактериальная защита быстро истощается. Кроме того, экссудат ожоговой раны представляет собой сложную, постоянно изменяющуюся во времени композицию мощных, активирующих репарацию стимулов, управляющих поведением всех клеток-участников раневого процесса, в том числе и сохранившимися СКЭ. В свою очередь динамика экспрессии ростовых факторов клетками, участвующими в репарации, имеет тесную взаимосвязь и жесткое регулирование во времени и по месту, нарушение порядка которых принято называть вторичным за-

живлением. Цель настоящего исследования заключалась в определении оптимального срока и оценке эффективности применения повязки на основе живых аллогенных фибробластов (АФ) на процесс репаративной эпителизации ожоговой раны IIIa степени. В 1—2-е сут после травмы использовалась биологическая повязка на основе аллогенных фибробластов линии М-22 (НИИИСиК МИБП им. Л. А. Тарасевича РАМН). Сроки заживления субдермальной ожоговой раны IIIa степени сравнили в двух группах больных, равнозначных по возрасту и площади ожогового поражения поверхности тела: 1) больные, которых лечили с помощью мажевых повязок ( $n = 20$ ); 2) больные, которых лечили с помощью повязки на основе живых АФ ( $n = 53$ ). Применение в 1—2-е сут после травмы, до появления признаков развития гнойных осложнений, повязок на основе живых АФ приводит к полноценной эпителизации ожоговых ран на 5—7-е сут, что подтверждается морфологическими исследованиями. Эпителизация происходит одновременно по всей раневой поверхности и носит «взрывной» характер. К 10—14-м сут появляются признаки восстановления пигментации кожи, что особенно ярко выражено у пациентов желтой расы, наблюдается рост волос, признаков гипертрофии не выявлено. При лечении с помощью мажевых повязок эпителизация ран наступала в среднем на 20—25-е сут. У четырех пациентов с нагноением наблюдалось заживление с образованием гипертрофического рубца. Таким образом, клинические результаты свидетельствуют о том, что патогенетически обоснованное применение для лечения субдермальных ожогов IIIa степени в 1—2-е сут после травмы биологических повязок, содержащих живые АФ линии М-22, через 5—7 сут приводит к безрубцовому восстановлению полнослойного эпителия.

**ПРОЛИФЕРАЦИЯ, ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФЕНОТИП КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ПРИ ГИПОКСИИ.**  
© Л. Б. Буравкова, Е. Б. Анохина, А. П. Жамбалова, О. С. Гринаковская. ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва.

Активное изучение свойств клеток-предшественников, выделяемых из различных тканевых источников, выявило их морфофункциональную гетерогенность и зависимость пролиферативной активности и дифференцировочного потенциала от широкого спектра химических и физических факторов. Кроме того, культивирование этих клеток само по себе может приводить к их модификации, которая зависит не только от ростовых факторов среды, но и от длительности культивирования. При этом необходимо отметить, что планируемое или реальное использование этих клеток в клинической практике требует более жестких, стандартизированных условий приготовления культур и определения показателей их «качества». На наш взгляд, важная роль принадлежит оценке свойств мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при действии такого важного физиологического параметра, как измененное содержание кислорода. Целью настоящей работы было изучение реакций культивируемых МСК, выделенных из костного мозга человека и крысы, на гипоксическую гипоксию. В работе использовали клетки, положительные по маркерам, характерным для МСК (CD90, CD54, CD44 и CD73). Клетки культивиро-

вали 3—4 сут в контрольных нормоксических условиях (95 % воздушной среды и 5 % CO<sub>2</sub>) или в условиях гипоксии, создаваемой с помощью герметичной камеры StemCell Technologies Inc. (Канада), куда подавали газовую смесь (95 % N<sub>2</sub> и 5 % CO<sub>2</sub>) до установления в среде концентрации кислорода 5 %. Морфологические характеристики МСК, а также пролиферативную активность оценивали с помощью фазово-контрастного микроскопа Zeiss и сопряженной с ним цифровой камеры. Жизнеспособность, а также иммунофенотип клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием наборов Annexin-V—PI (Immunotech, Франция) и антител, меченных FITC и PE. Способность к остеогенной дифференцировке оценивали по степени увеличения экспрессии щелочной фосфатазы в ответ на дифференцировочные стимулы. Показано, что гипоксия стимулировала в 1.5—4.0 раза пролиферацию МСК на ранних пассажах, не увеличивая по сравнению с контролем долю апоптотических и некротических клеток. В этих условиях в культуре преобладали фибробластоподобные быстроделющиеся клетки. Однако более длительное культивирование МСК приводило к изменению чувствительности клеток к недостатку кислорода в среде: пролиферативная активность была либо аналогична контролю, либо снижена. Число поврежденных клеток при этом, как правило, возрастало. Гипоксия не оказывала влияния на экспрессию изученных маркеров, что свидетельствует о сохранении фенотипа МСК. При оценке способности клеток отвечать на остеогенную стимуляцию было выявлено снижение как спонтанной, так и индуцированной остеогенной дифференцировки в условиях гипоксии, что согласуется со стимуляцией пролиферативной активности МСК. Таким образом, в условиях длительной гипоксии (5 % кислорода) на ранних пассажах наблюдалась активация пролиферации мезенхимальных клеток-предшественников, не изменялась экспрессия CD90, CD54, CD44 и CD73 на поверхности МСК, не активировались процессы апоптоза и некроза в культуре, а также снижалась способность клеток к спонтанной и индуцированной дифференцировке в остеогенном направлении.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Отделением биологических наук РАН и по программе поддержки ведущих научных школ (НШ-6364.2006.4).

**ПРОБЛЕМЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.** © В. В. Бурунова,<sup>1</sup> Ю. Г. Суздальцева,<sup>1</sup> А. В. Воронов,<sup>1</sup> К. Н. Ярыгин.<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup> Российский государственный медицинский университет, medcellbox@mail.ru, и <sup>2</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН, Москва.

Культивирование клеток постнатальных органов и тканей человека представляет основу для получения плюрипотентных клеток, представляющих интерес для разработки биомедицинских клеточных технологий. В широком смысле культивирование клеток включает в себя ряд технологических процедур: выделение клеток из биопсийного материала, пассирование клеток in vitro, контроль жизнеспособности клеточных культур, скрининг на наличие инфекционных агентов, долговременная криоконсервация клеток, наращивание необходимого количества клеточного материала. Получение культур

клеток постнатальных органов и тканей, их дальнейшее культивирование и исследовательская работа связаны с определенным риском для экспериментатора, связанным с вероятностью контаминации используемого материала опасными инфекционными агентами. В настоящее время в России отсутствуют единая система и стандарты тестирования культур клеток, полученных *de novo*. Тестирование полученных культур клеток на наличие инфекционных агентов является процедурой, необходимой для обеспечения инфекционной безопасности при работе с ними, и требует разработки соответствующей нормативной базы. В отсутствие специализированного законодательного обеспечения тестирование культур клеток должно учитывать законы РФ «Об охране здоровья населения Российской Федерации», «О трансплантации органов и тканей человека», «Временную инструкцию о порядке исследований в области клеточных технологий и их использования в учреждениях здравоохранения» от 18.04.2002, Приказ № 325 МЗ РФ «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации» от 25.07.2003, а также МУК 4.1/4.2.588.96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям» от 31.10.1996. В соответствии с вышеперечисленными документами был составлен список инфекционных агентов, подлежащих обязательному тестированию, в полученных культурах клеток. Полученные культуры фибробластов кожи человека и фибробластов пуповины человека после нормальных родов на 38—40-й нед гестации и стромальных клеток костного мозга человека подвергали ПЦР-анализу на присутствие провирусной ДНК и РНК ВИЧ-1, ВИЧ-2, РНК вируса гепатита С, ДНК вируса гепатита В, ДНК вирусов простого герпеса 1—2-го типов, ДНК цитомегаловируса, ДНК вируса Эпштейна—Барр, ДНК микоплазмы и ДНК токсоплазмы. Наиболее адекватным является дифференцированный подход, в рамках которого контролируемые параметры инфекционной безопасности зависят от происхождения клеточной культуры. Например, культуры клеток пуповины нуждаются в дополнительном тестировании на возбудителей урогенитальных инфекций (уреаплазмы, хламидии). Культура клеток фибробластов кожи такого исследования не требует, однако ее необходимо обследовать на наличие папилломавирусов 6-го и 11-го типов. Проведенная работа по разработке подходов к тестированию клеток на наличие инфекционных агентов является предпосылкой для разработки нормативной базы, регламентирующей использование культур клеток в доклинических и клинических испытаниях.

**ФЕНОМЕНОЛОГИЯ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТКИ: ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТОВ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ИНФУЗОРИИ *DILEPTUS ANSER*.**  
© С. И. Васянин, М. В. Тавровская. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Клоны инфузории *Dileptus anser* поддерживаются нами более 30 лет. В экспериментах по скрещиванию клонов и выращиванию эксконъюгантов наряду с клетками, дающими клоны нормально делящихся особей (при достижении размера 500—600 мкм клетки делятся пополам), появляются эксконъюганты, не способные к нормальному делению. Такие клетки продолжают расти и достигают гигантских размеров (до 1.5 мм). Можно наблюдать деление ядер при отсутствии формирования бо-

розды деления. Клетки-гиганты проявляют большое разнообразие по форме тела и способам деления: деление пополам, отделение небольших каудальных фрагментов, неравномерное деление на несколько частей. Иногда клетки трансформируются в гигантские амебоподобные комки с несколькими морфогенными зонами, от которых отделяются мини-клетки размером до 50 мкм. Трудно получить жизнеспособный клон гигантов от одного эксконъюганта. Нам удалось получить жизнеспособные клоны гигантов из популяции гигантов, полученной после массовой конъюгации комплементарных клонов. Гигантские клетки, полученные от эксконъюгантов, созревают раньше нормальных. «Гиганты» способны секретировать гамоны, вступать в конъюгацию, делиться под действием гамона на определенной стадии клеточного цикла. Другим методом получения «гигантов» является выращивание клеток из отрезанных каудальных мини-фрагментов нормальных клеток. При регенерации таких фрагментов формируются нормальные и гигантские клетки. Таким образом можно получить гигантские клетки с заданными свойствами (определенный тип спаривания и фаготип). Жизнеспособность «гигантов», полученных после регенерации, ниже, чем у эксконъюгантных. В первом случае клоны жили 2—3 мес, во втором — более 3 лет.

**ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ОНКОГЕНА *N-RAS* НА ПСЕВДОПОДИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ ПРИ ИХ ДВИЖЕНИИ.** © М. Е. Ваулина, А. Ю. Александрова. НИИ канцерогенеза РОНЦ РАМН, Москва.

В основе таких патологических процессов, как опухолевая инвазия, лежит изменение характера клеточной подвижности. Поскольку первым и одним из важнейших этапов движения клетки служит образование протрузий на ее ведущем крае, основной целью нашей работы было изучить изменения динамики и распределения активного края клетки в результате трансформации. В качестве модели мы использовали мышинные фибробласты линии 10(3) и их трансформированные производные 10(3)Ras, полученные путем трансфекции клеток исходной линии мутантным постоянно активированным онкогеном *N-RAS*. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания цитоскелетных структур мы показали, что в данной паре клеток экспрессия *N-RAS* приводит к морфологическим изменениям, типичным для трансформированных клеток, — уменьшению площади клеток, значительной редукции актиновых пучков, уменьшению размера и количества фокальных контактов. Для выявления различий в поведении активного края клеток мы использовали их миграцию в экспериментальную рану. У клеток, активно выполазающих в рану, измеряли длину активного края, площадь и количество отдельных протрузий и ретракций на нем. Были подсчитаны средние скорости протрузий и ретракций, характеризующих псевдоподиальную активность. Мы показали, что через 2 ч после нанесения раны (т. е. вскоре после активации движения) средние скорости протрузий и ретракций были высокими как у нормальных клеток (протрузии  $0.440 \pm 0.041$  мкм за 30 с, ретракции  $0.350 \pm 0.050$  мкм за 30 с), так и у *RAS*-трансформированных клеток (протрузии  $0.320 \pm 0.034$  мкм за 30 с, ретракции  $0.280 \pm 0.026$  мкм за 30 с). Через 24 ч после нанесения раны псевдоподиальная активность у нормальных клеток снизилась в 2.5—3.5 раза, а у трансфор-

мированных клеток оставалась практически на прежнем уровне. Кроме того, нами были выявлены существенные различия в распределении активного края по периметру нормальных и трансформированных клеток. У нормальных клеток активный край представлен, как правило, 1—2 крупными ламеллами на ведущем крае клетки, возможно также наличие хвостовой или — реже — боковых ламелл. Общее число участков активности не превышает 4. У RAS-трансформированных клеток количество ламелл значительно возрастает и составляет от 4 до 8. Это, как правило, одна небольшая ламелла на ведущем крае и разнородные по размерам участки активности по всему периметру клетки. Чтобы выяснить, как описанные нами различия в динамике и распределении активного края у нормальных и трансформированных клеток влияют на эффективность клеточной миграции, мы прослеживали путь миграции и расстояние, на которое переместились клетки за 8 ч наблюдений. Общий путь, пройденный RAS-трансформированными клетками, оказался в 1.3 раза больше, чем путь, пройденный нормальными клетками. При этом фактическое расстояние, пройденное клетками за это время, было одинаковым и для нормальных, и для трансформированных клеток. Таким образом, скорость движения у RAS-трансформированных клеток была больше (7.145 мкм/ч по сравнению с 5.450 мкм/ч у нормальных клеток). При этом движение стало менее направленным. Уменьшение прямолинейной составляющей движения наглядно выражается через процентное отношение прямолинейного расстояния к общему пройденному пути:  $78.430 \pm 3.311\%$  у контрольных и  $65.800 \pm 5.063\%$  у RAS-трансформированных клеток. Таким образом, показано, что трансформация фибробластов онкогеном N-RAS приводит к постоянному поддержанию повышенного уровня псевдоподиальной активности на ведущем крае трансформированных клеток, а также и к значительному перераспределению псевдоподиальной активности. Миграция RAS-трансформированных клеток характеризуется большей скоростью перемещения по субстрату, но имеет менее направленный характер, чем у нетрансформированных. Авторы предлагают схему регуляторных путей с участием кофиллина и малой ГТФазы Ras для объяснения обратной регуляции псевдоподиальной активности у нормальных клеток и нарушения этой регуляции при трансформации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48146а).

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ АКТИВНОСТИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ РАНЕВОГО ЭКССУДАТА ПРИ ТЕРМИЧЕСКИХ ТРАВМАХ.** © И. В. Воронкина,<sup>1</sup> О. С. Дорошкевич,<sup>2</sup> Л. В. Смагина,<sup>1</sup> К. М. Новик,<sup>1</sup> К. М. Крылов,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, voron@mail.cytspb.rssi.ru, и <sup>2</sup> Институт скорой помощи, Санкт-Петербург.

Ранее проведенные исследования протеолитической активности раневого экссудата показали, что основными протеазами, участвующими в процессе заживления раны и эпителизации раневой поверхности, являются матриксные металлопротеиназы (ММП). Активность ММП в экссудате изменяется определенным образом по мере

заживления раны, это было установлено для хирургических ран и ожогов различных степеней. Данные о протеолитической активности необходимы для наблюдения за состоянием раны и при необходимости оценки готовности раны к трансплантации. Целью настоящей работы было сравнительное изучение динамики активности ММП раневого экссудата при регенерации тканей после повреждения под действием высоких (при ожогах) и низких (при обморожениях) температур. Для исследования были использованы образцы экссудатов, собранные у пациентов Института скорой помощи, получивших термические травмы разных степеней. Исследовано 10 образцов экссудата, собранных после обморожений, и 10 — после ожогов. Протеолитическую активность экссудата определяли методом зимографии на желатине и на казеине. Результаты зимографии сопоставляли с результатами клинического анализа и визуального наблюдения. Полученные данные показали, что активность ММП в экссудатах, полученных после обморожения, была в несколько раз ниже, чем в ожоговых экссудатах. Синтез ММП происходит только в живых клетках. Так как при обморожении образуется гораздо большее количество некротической ткани, чем при ожоге, то, возможно, снижение общего уровня активности ММП в экссудате может свидетельствовать о состоянии ткани в месте отбора пробы. Возможность определить жизнеспособность ткани после обморожения — основная задача, для решения которой можно оценивать состояние раны по активности ММП.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной по Государственному контракту «Метод восстановления эпителиально-мезенхимальных дефектов с помощью стволовых клеток» (лот 2005-ЖС-12.1/001).

**ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ АКТИВНОСТИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ (ММП) ПОСЛЕ ПЕРЕСАДКИ ДЕРМАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА НА МОДЕЛИ НЕЗАЖИВАЮЩЕЙ РАНЫ У КРЫС.** © И. В. Воронкина,<sup>1</sup> М. В. Протасов,<sup>2</sup> М. А. Соловьева,<sup>2</sup> Л. В. Смагина,<sup>1</sup> Н. М. Юдинцева,<sup>1</sup> О. В. Галибин,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, voron@mail.cytspb.rssi.ru, и <sup>2</sup> Лаборатория трансплантологии С.-Петербургского государственного медицинского университета.

Одним из перспективных методов лечения различных видов ран является использование биотехнологических методов восстановления кожного покрова, в частности трансплантация дермального эквивалента. Использование заместительной клеточной терапии требует более подробного изучения взаимоотношений клеточных элементов и внеклеточного матрикса на уровне тканевых ферментов и сигнальных молекул. Помимо этого пока недостаточно разработаны методы достоверного лабораторного мониторинга состояния раны, позволяющие прогнозировать течение раневого процесса. Одним из новых методов оценки течения раневого процесса является изучение активности матриксных металлопротеиназ (ММП) — ферментов, участвующих в ремоделировании внеклеточного матрикса в течение раневого процесса. Цель настоящей работы: показать возможность прогнозирования течения раневого процесса при мониторинге состояния раны с помощью оценки уровня ММП в ране-

вом экссудате. Для этого на модели неэпителизируемой кожной раны у крыс была изучена динамика активности ММП-2 и ММП-9 при различных вариантах трансплантации дермального эквивалента. Неэпителизируемую рану создавали, вшивая в хирургически формируемый дефект кожи силиконовое кольцо, фиксируемое швами к дну раны. Трансплантацию кожного лоскута и трансплантацию дермального эквивалента проводили на разных сроках после образования незаживающей раны. Образцы раневого экссудата собирали через каждые 3 сут и определение активности ММП-2 и ММП-9 проводили методом зимографии на желатине. На 24-е сут от момента моделирования раны животных всех групп выводили из опыта. Из материала, взятого из дна раны, готовили гистологические препараты с окраской гематоксилином—эозином. При дальнейшей микроскопии оценивали состояние грануляционной ткани дна раны, состояние кожного лоскута и измеряли диаметр базальной мембраны кожного лоскута. Сопоставление результатов зимографии с данными гистологического анализа показало, что уровни активности ММП-2 и ММП-9 в раневом экссудате после трансплантации дермального эквивалента зависят от хода процесса эпителизации. При приживлении кожного лоскута активность ММП-9 существенно снижалась, а ММП-2 — нарастала, а при его лизисе, наоборот, активность ММП-9 увеличивалась, ММП-2 — снижалась. Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что на основе мониторинга активности ММП могут проводиться оценка состояния раны и прогнозирование приживления кожного лоскута.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной по Государственному контракту «Метод восстановления эпителиально-мезенхимальных дефектов с помощью стволовых клеток» (лот 2005-ЖС-12.1/001).

**ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS* НА МИГРАЦИЮ КЛЕТОК ИЗ ЦЕЛОМИЧЕСКОГО ЭПИТЕЛИЯ.** © И. В. Воронкина,<sup>1</sup> Н. С. Шарлаимова,<sup>1</sup> М. И. Блинова,<sup>1</sup> М. Торндайк,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, voron@mail.cyt-spb.rssi.ru, и <sup>2</sup> Морская биологическая станция Кристинеберг, Королевская академия наук, Швеция.

При повреждении ткани биохимический состав целомической жидкости у морской звезды *Asterias rubens* изменяется. Проведенные нами ранее исследования показали, что в целомической жидкости раненого животного повышается количество белка, и мажорные белковые компоненты можно разделить на несколько групп по биологической активности. В представленной работе изучение биологической активности проводили на культивируемой ткани целомического эпителия морской звезды в культуре. Работу с морскими звездами проводили на морской биологической станции Кристинеберг (Швеция) и на Беломорской биологической станции Зоологического института РАН. Для экспериментов образцы ткани целомического эпителия морской звезды от животных, которым предварительно была нанесена рана, и от интактных животных культивировали *in vitro* в среде L-15 с 2 % фетальной сыворотки в течение 8 сут. Мажорные белки бесклеточной целомической жидкости, взятой от этих же морских звезд, разделяли с помощью

гель-хроматографии. Биологическую активность полученных фракций оценивали, вводя их в среду культивирования и наблюдая за состоянием эксплантата эпителиальной ткани и миграцией клеток из него. Каждые 24 ч подсчитывали количество клеток, мигрировавших из ткани в среду, состав и протеолитическую активность среды культивирования оценивали методом электрофореза и Вестерн-блоттинга с окраской антителами на коллаген типа I, а также методом зимографии. В ходе культивирования в культуральной среде происходит накопление количества коллагена. Количество клеток, мигрировавших из ткани за время культивирования, было существенно выше для образцов ткани, взятых от раненых животных. Из ткани интактных животных клетки мигрировали равномерно в течение всего срока культивирования. Клетки из ткани раненых животных мигрировали в 1.5—2.0 раза быстрее в течение 3—6 сут, после чего скорость миграции снижалась до уровня, полученного для интактных животных. Одновременно происходило повышение уровня матриксных металлопротеиназ (ММП) в среде культивирования. При этом начальный уровень ММП был значительно выше в ткани от раненых животных. Для изучения биологической активности фракций целомической жидкости их вводили вместо сыворотки в среду культивирования (без сыворотки), а контролем служила среда культивирования с 2 % сыворотки. При этом введение фракций I группы снижало скорость деструкции ткани, а фракций III группы — повышало ее. При совместном действии различных фракций присутствие фракций III группы всегда приводило к повышению скорости деструкции ткани. Сопоставление результатов, полученных в настоящем исследовании, и результатов, полученных ранее на клетках млекопитающих, показало, что действие компонентов целомической жидкости проявляется одинаково как на клетках млекопитающих, так и на клетках морской звезды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-08017) и Королевской академии наук (Швеция) по программе «Сотрудничество Швеции и стран бывшего СССР».

**ИЗМЕНЕНИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА ПРИ ТЕПЛОМ ШОКЕ КЛЕТОК.** © Л. П. Гаврилова,<sup>1</sup> И. И. Корпачева,<sup>1</sup> С. Г. Семушина,<sup>2</sup> В. Б. Садовников,<sup>2</sup> В. А. Яшин.<sup>3</sup> <sup>1</sup> Институт белка РАН, lpg@vega.protres.ru, <sup>2</sup> Филиал Института биоорганической химии РАН и <sup>3</sup> Институт биофизики клетки РАН, Пущино.

Ответ цитоскелета нормальных эмбриональных и постнатальных фибробластов крыс на тепловой шок изучали методом флуоресцентной микроскопии. Обнаружено, что в результате инкубации клеток при 43 °С изменяется морфология всех известных цитоскелетных структур: актинсодержащих филаментов (АФ), микротрубочек (МТ) и промежуточных филаментов (ПФ). Реорганизация цитоскелета в фибробластах обоих типов при тепловом шоке была сходной: пучки АФ разбирались, морфология МТ заметно изменялась, а ПФ коллапсировали вокруг ядра. Изменения разных цитоскелетных структур происходили одновременно и были заметны через 4—20 мин. Подобное поведение цитоскелета при 43 °С мы наблюдали также в фибробластах эмбрионов мыши,

кожи человека и в 3ТЗ-клетках. Известно, что тепловой шок клеток эукариот стимулирует в них ряд генных, биохимических и морфологических изменений. Как правило, ответы эукариотических клеток разных типов на тепловой шок сходны. Исключением является поведение цитоскелета. Опубликованные результаты говорят о том, что у эукариотических клеток разных типов цитоскелет при тепловом шоке изменяется по-разному. Подобные результаты получены разными авторами в разных условиях эксперимента и при разной температуре (от 40 до 45 °С). Поэтому необходимы повторные исследования, для того чтобы выяснить, сходен или различен ответ цитоскелета на тепловой шок в клетках эукариот разного типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 93-04-21141, 96-04-50643 и 01-04-48322).

#### НОВЫЙ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД РЕГИСТРАЦИИ ВОСПАЛЕНИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ.

© Н. Е. Галич,<sup>1</sup> В. А. Малышкин,<sup>2</sup> М. В. Филатов.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> С.-Петербургский государственный университет, <sup>2</sup> Физико-технический институт РАН, Санкт-Петербург, и <sup>3</sup> С.-Петербургский институт ядерной физики, Filatov@omrb.pnpi.spb.ru.

Нами разработан высокочувствительный количественный метод регистрации воспалительных реакций, основанный на измерении способности нейтрофилов периферической крови к реакции респираторного, или окислительного, взрыва. Метод позволяет, измеряя способность нейтрофилов в образце крови, отвечать на стимул реакцией окислительного взрыва, судить о том, идет ли в организме воспалительный процесс, и следить за его течением. Основной момент нашей разработки заключается в том, что мы обнаружили, что нейтрофилы, которые однажды активировались в организме при взаимодействии с эндотелием сосудов в очагах воспаления, при повторной активации будут иметь ослабленную реакцию. При этом доля нейтрофилов с ослабленной реакцией будет указывать на вероятность контакта с очагом воспаления в организме, т. е. на размер этого очага, а степень ослабления — на интенсивность воспаления в очаге. **Суть метода** заключается в следующем. В образцы периферической крови или тканевых смывов (0.1—0.2 мл) добавляется регистрирующий краситель (гидроэтидин), который при окислении легко превращается во флуоресцентный краситель бромистый этидий. Одновременно добавляется индуктор окислительного взрыва (производный форболового эфира). В результате начинаются продукция нейтрофилами активных форм кислорода и окисление гидроэтидина. Процесс окрашивания длится 1 ч. Полученный в результате бромистый этидий связывается с ДНК внутри клеток, в результате чего они начинают флуоресцировать в красной области спектра при освещении ультрафиолетовым или зеленым светом. Эта флуоресценция отдельных клеток, коррелирующая со способностью клеток производить активные формы кислорода, может быть точно и быстро измерена с помощью проточного цитофлуориметра. Скорость измерения — 10<sup>3</sup> клеток в 1 мин. Среднее время измерения одного образца — 2 мин. Общее время анализа, включая взятие крови и приготовление образца, составляло 1.5 ч. При этом один оператор может параллельно анализи-

вать 10—20 образцов, так что общая производительность может составить 10—20 образцов за 1.5 ч. Принципиальной особенностью нашей разработки является то, что выработанная процедура весьма устойчива к вариации большинства входящих в нее параметров. Так, реакция не зависит от увеличения времени инкубации свыше 1.5 ч. Она не зависит также от увеличения концентраций использованного красителя и индуктора. Это и ряд других моментов приводит к тому, что реакция не подвержена иным изменениям, кроме изменений, связанных с наличием воспалительных реакций в организме. Это означает, что нормальные здоровые доноры дают всегда однотипную картину, на фоне которой легко видны отклонения, связанные с воспалительной реакцией. Проведенные на сегодняшний день предварительные исследования показали, что методика может найти применение для решения следующих медицинских проблем: 1) контроль за течением воспалительных процессов, возникающих после различных хирургических вмешательств; 2) регистрация аутоиммунных процессов при постинфекционных осложнениях, в частности при неврологических и сердечных осложнениях после дифтерии; 3) мониторинг хронического воспаления при ревматоидных артритах и миостениях; 4) регистрация воспалительной реакции при бронхиальной астме; 5) контроль за развитием воспалительных событий при инфарктах миокарда; 6) регистрация воспалений при васкулитах, системной красной волчанке, гепатитах, перитонитах, гнойных аппендицитах, воспалениях легких, сердечно-сосудистых заболеваниях и т. д. Новыми являются также и статистические методы анализа флуоресценции, расширяющие возможности количественного и качественного анализа. Например, возможны регистрация заболеваний, не определяемых по анализу крови стандартными биохимическими методами, а также регистрация нескольких различных заболеваний при их совместном проявлении. Для различения близкородственных признаков в условиях медленных плавных изменений средних значений и высокой степени шума иммунофлуоресценции используется анализ высоких статистических моментов, кумулянтов или эксцессов. Возможна регистрация динамики интегральной картины эволюции эксцессов по номерам моментов или по номерам степени корреляций. Определены критерии и параметры различий воспалительных процессов по статистическим критериям и интегральным характеристикам иммунофлуоресцентных гистограмм. Оценена максимальная чувствительность динамики мониторинга развития заболевания и лечения регистрируемого заболевания.

ЧАСТИЧНАЯ РЕВЕРСИЯ ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ФЕНОТИПА ФИБРОБЛАСТОВ 3ТЗ-SV40 ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИОКСИДАНТА N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА. © И. А. Гамалей, Н. А. Филатова, К. М. Курпичникова, Т. Е. Ефремова, Я. Ю. Комиссарчик, Ю. С. Полозов, С. Ю. Хайтлина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, igamaley@mail.cytspb.rssi.ru.

Многочисленные данные о ключевой роли окислительного стресса в патогенезе многих болезней человека, в том числе и клеточной трансформации, привели к концепции, согласно которой антиоксиданты могут защитить клетку и организм от разрушающего действия избытка окислителя, образующегося по тем или иным при-

чинам. Широкое распространение как фармакологический агент получил антиоксидант N-ацетилцистеин (НАС). НАС увеличивает пул восстановленного глутатиона в клетке, однако этим механизмом не объясняются те многочисленные эффекты, которые он вызывает. К многочисленным морфологическим изменениям, происходящим с клеткой в процессе трансформации, относится реорганизация структур цитоскелета, в том числе потеря пучков микрофиламентов и изменение связанной с ними системы фокальных контактов клеток с субстратом. Одним из функциональных нарушений вследствие трансформации может быть увеличение чувствительности клеток к инвазии некоторыми бактериями и к литическому действию естественных киллерных клеток (ЕК). Поэтому в настоящей работе исследовали влияние НАС на морфологические и функциональные характеристики мышинных фибробластов 3Т3, трансформированных вирусом SV40 (3Т3-SV40). Параллельно проводили те же эксперименты на нетрансформированных клетках 3Т3. Морфологические характеристики оценивали по состоянию актинового цитоскелета, функциональные — по чувствительности к бактериальной инвазии непатогенного штамма *Echerichia coli* A2 и к литическому действию ЕК (спленоцитов мышей). Для визуализации актиновых элементов цитоскелета использовали фаллоидин-TRITC, инвазию бактерий оценивали по данным электронной микроскопии, естественную киллерную активность спленоцитов — с помощью <sup>3</sup>H-уридинового цитотоксического теста. Кроме того, в клетках, находящихся в тех же экспериментальных условиях, оценивали содержание АФК (по флуоресценции соответствующего зонда) и концентрацию восстановленного глутатиона (спектрофотометрически). Показано, что в результате длительного действия НАС актиновый цитоскелет в клетках 3Т3-SV40 разбирается. Однако после удаления НАС из среды культивирования актиновый цитоскелет реорганизуется и появляются хорошо выраженные стресс-фибриллы, отсутствующие в контрольных клетках 3Т3-SV40, но характерные для нетрансформированных клеток 3Т3. Параллельно с морфологическими характеристиками меняются функциональные свойства клеток: в отличие от контрольных 3Т3-SV40 они перестают инвазироваться бактериями *E. coli* A2 и не подвергаются литическому действию ЕК, что делает эти клетки сходными (по этим показателям) с нетрансформированными 3Т3. Действие НАС и последующее его удаление не изменяют чувствительность нормальных клеток 3Т3 к бактериальной инвазии и литическому действию ЕК. Изменения цитоскелета в клетках 3Т3 при действии НАС полностью обратимы. Показано, что частичная реверсия трансформированного фенотипа клеток 3Т3-SV40 не связана с изменением содержания в них АФК и глутатиона при действии НАС. Предполагается, что действие НАС опосредовано изменением структуры и свойств поверхностных белков клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-49186 и 06-04-48586).

АМИЛОИДНЫЕ ОЛИГОМЕРЫ ЯИЧНОГО ЛИЗОЦИМА ВЫЗЫВАЮТ АПОПТОТИЧЕСКУЮ, А ФИБРИЛЛЫ — НЕКРОТИЧЕСКУЮ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК. © А. Л. Гарибян,<sup>1</sup> О. С. Москалева,<sup>1,2</sup> В. В. Замотин,<sup>1</sup> Б. А. Маргулис,<sup>2</sup> И. А. Костянян,<sup>3</sup> Л. А. Морозова-Рош.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Отдел ме-

дицинской биохимии и биофизики Университета Умеа, 90187, Умеа, Швеция, <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>3</sup> Институт биоорганической химии РАН, Москва.

Определение молекулярных и клеточных механизмов амилоидной токсичности наиболее важно для понимания патологии большинства амилоидозов. Лизоцим является широкораспространенным белком, структурные и функциональные свойства которого интенсивно исследовались в течение последних десятилетий. В конце 1990-х годов было установлено, что человеческий лизоцим способен вызывать системный амилоидоз в семьях, которые являются носителями патологических дестабилизирующих белок мутаций. В дестабилизирующих условиях *in vitro* лизоцим также может образовывать амилоид. Мы выполняли сравнительный анализ олигомеров и фибрилл яичного лизоцима, полученных *in vitro*, исследуя их токсичность на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y. Было показано, что они вызывают клеточную гибель через разные механизмы. Фибриллы вызывают быструю клеточную смерть, разрушая мембрану, что было показано по высвобождению лактатдегидрогеназы и проникновению пропидиума иодида. Олигомеры же способны проникать через клеточную мембрану и активировать каспазы. В результате клетки гибнут путем апоптоза, но значительно медленнее, только через 48 ч инкубации с амилоидом можно наблюдать транслокацию фосфатидилсерина, высвобождение лактатдегидрогеназы и окрашивание ДНК пропидиум иодидом, а также типичную для апоптоза морфологию клетки. Наши результаты показывают, что амилоид крайне губителен для клеток и что ни одна из его форм не может считаться нейтральной или нетоксичной. Цитотоксичность не является свойством определенного типа амилоида, но, скорее, многочисленные амилоидные структуры различной морфологии способны вызывать клеточную смерть. Тот факт, что амилоидные фибриллы яичного лизоцима вызывают токсичность, а как было показано в наших предыдущих исследованиях, протофиламенты лошадиного лизоцима и *de novo* белка альбибетина не обладают такой способностью, показывает, что эффект токсичности зависит от определенного типа фибрилл и от специфического адгезивного участка, позволяющего им связываться с клеточной мембраной.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КУЛЬТУРЫ ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК АМФИБИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОЛЛЕКЦИЙ ГИДРОБИОНТОВ. © Э. Н. Гахова,<sup>1</sup> Е. В. Мельникова,<sup>1</sup> С. А. Каурова,<sup>1</sup> А. А. Соколова,<sup>2</sup> Е. А. Назина,<sup>2</sup> В. К. Утешев.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт биофизики клетки РАН, Пущино, gakhova@icb.psn.ru, и <sup>2</sup> Нижегородский государственный университет.

Одним из надежных способов длительного сохранения любых клеточных культур является их криоконсервация. В настоящей работе мы изучали условия криоконсервации культуры зародышевых клеток амфибий, полученной путем диссоциации зародышей на стадии бластулы. Интерес к этой проблеме обусловлен тем, что к настоящему времени методы низкотемпературного сохранения интактных зародышей амфибий пока не разработаны. В то же время в целях гарантированного сохранения биологического разнообразия животных, в том

числе и амфибий, актуальна разработка подходов к длительному низкотемпературному сохранению их геномов и созданию генетических криоколлекций (Утешев, Гахова, 1994; Gakhova, 1998; Uteshev, Gakhova, 2005). В исследованиях ряда авторов было показано, что зародышевые клетки амфибий сохраняют тотипотентность до стадии гастрюлы (см. обзор: Никитина, 1996), поэтому они представляют собой полноценный генетический материал и могут быть использованы для создания генетических криобанков. Объектом нашего исследования служили зародыши двух видов амфибий — травяной и шпорцевой лягушек (*Rana temporaria* и *Xenopus laevis*). Культуру изолированных клеток получали путем диссоциирования зародышей на стадии бластулы в среде Ниу—Твитти, не содержащей кальция. Для криоконсервирования культуры зародышевых клеток использовали сочетание эндоцеллюлярных криопротекторов диметилсульфида (ДМСО), этиленгликоля, маннита или формамида с экзоцеллюлярным протектором сахарозой. В ряде экспериментов для замораживания применяли среды, содержащие полостную жидкость или плазму крови травяной лягушки, находящейся в зимнем анабиозе. Замораживание осуществляли прямым погружением пробирок с материалом в жидкий азот (скорость охлаждения 400—500 °С/мин) или в парах жидкого азота (скорость охлаждения 10—15 °С/мин). Оттаивание проводили на водяной бане при 38—40 °С. Сохранность криоконсервированных клеток оценивали флуоресцентным методом с использованием флуорохромов бромида этидия, 1-анилино-8-нафталиносulfоната или флуоресцеин-диацетата (Утешев и др., 2002; Мельникова и др., 2005). Результаты экспериментов показали, что для зародышевых клеток двух исследованных нами видов амфибий, относящихся к разным семействам и обитающих в резко различающихся биотопах, требовались разные условия для криоконсервации. Так, для криоконсервации зародышевых клеток шпорцевой лягушки лучшие результаты были получены при использовании криозащитного раствора, содержащего 5 % глицерина и 10 % сахарозы (более 8 % неповрежденных клеток). Криоконсервация зародышевых клеток травяной лягушки наиболее успешной была при использовании среды, содержащей 10 % ДМСО и 10 % сахарозы с добавлением 1 % бычьего сывороточного альбумина. Из общего количества заморозенно-оттаянных клеток 87 % были неповрежденными. Привлекают внимание результаты экспериментов, в которых в криозащитные среды были добавлены жидкости из организма травяной лягушки, находящейся в криоанабиозе. После криоконсервации клеток травяной лягушки с использованием полостной жидкости и плазмы крови количество неповрежденных клеток составляло 77 и 50 % соответственно. Результаты свидетельствуют о том, что и внутриполостная жидкость, и плазма крови травяной лягушки, находящейся в анабиозе, обладают криопротективными свойствами и защищают от повреждений зародышевые клетки даже в отсутствие в среде традиционных криопротекторов. Сохраняемые в криобанках криоконсервированные зародышевые клетки амфибий могут быть использованы для реконструкции зигот и при необходимости — для восстановления исчезнувших в природе видов (Утешев, Гахова, 1994; Uteshev, Gakhova, 2005).

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда р-2004-Наукоград (проект 04-04-97300).

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ, ПРИНИМАЮЩИХ УЧАСТИЕ В АПОПТОЗЕ, В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ И СПЛЕНОЦИТАХ ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO. © Л. Б. Гинкул, И. Н. Швембергер. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, lbgin@mail.cytspb.rssi.ru.

Известно, что злокачественный рост клеток в организме во многом зависит от взаимодействия опухолевых клеток с иммунной системой. Однако до сих пор во многих случаях остается неясным, какой путь выберет клетка — в сторону злокачественного роста или самоуничтожения путем апоптоза. Выявление экспрессии ключевых белков, принимающих участие в апоптозе, в опухолевых клетках и клетках иммунной системы может дать возможность определить степень злокачественности клонов опухолевых клеток и прогнозировать их жизнеспособность. Целью настоящего исследования являлось изучение роли экспрессии белков системы Fas/FasL, а также RIP, каспазы 3 и PARP во взаимодействии клеток гепатомы МГ-22а и гистиоцитарной саркомы J-774 мыши с клетками иммунной системы организма, в частности с сингенными спленоцитами. Наличие апоптотических клеток выявляли с помощью окраски акридиновым оранжевым и бромистым этидием, методом клоногенной выживаемости и электрофорезом низкомолекулярной ДНК. Выявление экспрессии белков Fas, FasL, RIP, каспазы 3 и PARP проводили методом непрямой иммунофлуоресценции. В результате проведенных экспериментов по совместному культивированию опухолевых клеток и спленоцитов in vitro апоптоз был выявлен во всех экспериментах как в опухолевых клетках, так и в спленоцитах, однако интенсивность его различалась. Мы разделили материал на две группы в зависимости от интенсивности апоптоза. В первую группу вошли опыты, в которых апоптоз в опухолевых клетках выявлялся в 80 % клеток, а апоптоз в спленоцитах — на невысоком уровне. Во вторую группу вошли опыты, характеризовавшиеся очень высоким уровнем апоптоза как у опухолевых клеток (около 100 %), так и у спленоцитов. В первой группе опытов была выявлена высокая экспрессия Fas до опытов и в опухолевых клетках, и в спленоцитах, которая снижалась после совместной инкубации. Экспрессия FasL до опытов в опухолевых клетках часто достигала максимальных значений, а после опытов снижалась в основном до среднего уровня. Экспрессия FasL в спленоцитах выявлялась на очень низком уровне до опытов, но после культивирования в большинстве случаев она резко возрастала. Экспрессия белков RIP, каспазы 3 и PARP в клетках обоих типов имела сходный характер. Она отмечалась на очень низком уровне до инкубации или совсем не выявлялась, однако после инкубации больше чем в половине случаев происходило резкое увеличение экспрессии этих белков (иногда до 100 %), причем это происходило в опухолевых клетках и спленоцитах в одних и тех же опытах. В других случаях экспрессия оставалась на близком к нулю уровне. Экспрессия Fas во второй группе, клетки которой отличались высоким уровнем апоптоза, редко имела высокие значения до опытов, однако после инкубации практически во всех случаях происходило ее значительное увеличение как в опухолевых клетках, так и в спленоцитах. Экспрессия FasL до опытов в опухолевых клетках наблюдалась на низком или среднем уровне или вообще не наблюдалась. После опытов количество клонов, в которых экспрессия не выявля-

лась, увеличилось. У большинства спленоцитов до опытов не отмечалась экспрессия FasL, но после инкубации в двух случаях из пяти она резко возросла. Экспрессия RIP, каспазы 3 и PARP тоже имела сходный характер. Интересно, что в отличие от клеток первой группы в опухолевых клетках она выявлялась на среднем уровне до опытов, а после опытов оставались клетки, в которых эти белки практически не экспрессировались. Экспрессия этих белков у спленоцитов носила такой же характер, как у клеток первой группы, — отмечалась на низком уровне до опытов, а после инкубации выявлялась или на среднем уровне, или на нулевом. Проведенные нами эксперименты по совместному культивированию клонов клеточных линий гепатомы МГ-22а и саркомы J-774 с сингенными спленоцитами позволили выявить разные способы взаимодействия опухолевых клеток и клеток иммунной системы, реализация которых может зависеть от экспрессии белков, принимающих участие в процессе апоптоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке С.-Петербургского научного центра РАН.

**МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ АДГЕЗИОННЫЕ КОНТАКТЫ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ФИБРОБЛАСТОВ: ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ И РЕГУЛЯЦИИ.**  
© Н. А. Глушанкова, Д. В. Айолло, Ю. М. Васильев. Российский онкологический центр РАМН, Москва.

Кадхеринсодержащие межклеточные адгезионные контакты (МАК), ассоциированные с актиновыми микрофиламентами, играют важнейшую роль в объединении клеток в тканевые структуры. Разрушение межклеточных контактов и угнетение экспрессии кадгерина во многих случаях предшествуют инвазии и метастазированию опухолевых клеток. Для исследования роли актинового цитоскелета и малых ГТФаз семейства Rho в образовании межклеточных контактов нами были изучены закономерности схождения клеток в узкой ране в культурах эпителиоцитов IAR-2, фибробластов Rat-1, а также фибрибластов Rat-1, трансфицированных конструкцией, несущей ген E-кадгерина. Иммунофлуоресцентная микроскопия выявила тангенциальную организацию МАК эпителиоцитов, содержащих E-кадгерин. МАК фибробластов Rat-1 и фибробластов, экспрессирующих как N-кадгерин, так и экзогенный E-кадгерин, располагаются перпендикулярно межклеточным границам и взаимодействуют с радиальными актиновыми пучками. При введении доминантно-негативного белка Rac в краевые клетки узкой раны не наблюдалось аккумуляции E-кадгерина в зоне схождения эпителиальных клеток и формирования МАК. Образование радиальных МАК в фибробластных клетках не зависело от активности Rac. Ингибитор эффектора Rho Rho-киназы — Y-27632 — разрушал актиновые пучки эпителиоцитов и фибробластов, резко изменял характер псевдоподиальной активности клеток при установлении контакта. В присутствии Y-27632 продолжалось образование первичных контактов эпителиальных клеток, в то время как радиальные МАК фибробластов не устанавливались. Ингибитор АТФазы миозина II блебистатин препятствовал образованию МАК в культурах фибробластов и не влиял на образование новых МАК эпителиальными клетками. Таким образом, пространственная организация межклеточных

адгезионных контактов эпителиоцитов и фибробластов определяется в первую очередь общей организацией актинового цитоскелета. Полученные данные свидетельствуют о различиях в регуляции образования кадхеринсодержащих контактов эпителиальных клеток и фибробластов.

**ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛИЯ В ЭМБРИОНАЛЬНОЙ КЛЕТКЕ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ЦИТОХАЛАЗИНОМ В.** © Д. В. Гольдштейн,<sup>1,2</sup> В. Н. Погорелов,<sup>1</sup> С. А. Яшкин,<sup>1,3</sup> А. Г. Погорелов.<sup>1,3</sup> <sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Pogorelov@iteb.ru, <sup>2</sup> ЗАО «РеМетЭкс», Москва, и <sup>3</sup> Факультет биофизики и биомедицины Пущинского государственного университета.

Перенос ядра соматической клетки в эмбриональную клетку индуцирует дефицит калия в цитоплазме последней (Гольдштейн и др., 2004; Погорелов и др., 2004). В результате возможна трансформация основных молекулярно-генетических механизмов клетки (Parkinson et al., 2002; Taurin et al., 2002; Goldmann et al., 2003). С целью разработки способов коррекции необходимо знать, какие манипуляции наиболее критичны для нарушения калиевого гомеостаза цитоплазмы. Механическое удаление ядерного материала из клетки эмбриона становится возможным после обработки цитохалазином В. Прямое действие препарата обусловлено трансформацией цитоскелета, что является причиной активизации калиевых каналов (Yazaki et al., 1995) и как следствие — нарушения цитоплазматического баланса калия. Поэтому цель исследования состояла в том, чтобы определить изменение содержания элемента в эмбриональной клетке под действием цитохалазина В и восстановление его уровня после отмывания препарата в физиологической среде. Для измерения внутриклеточной концентрации калия применили электронно-зондовый микроанализ. Вымытые двухклеточные эмбрионы мыши в G<sub>1</sub>/S-фазе 10 мин обрабатывали цитохалазином В (10 мкг/л). Последующую отмывку препарата проводили в течение 20 мин средой Дюльбекко. Все манипуляции проводили при комнатной температуре (24—25 °С). Обработанные эмбрионы замораживали в жидком пропане и лиофилировали в вакууме при низкой температуре (–100 °С). Высушенные препараты заключали в заливочную среду и сухим стеклянным ножом получали срезы толщиной 2 мкм, которые исследовали в сканирующем электронном микроскопе-микроанализаторе JSM U3 (JEOL). Расчет концентрации калия проводили по интенсивности линии K<sub>α</sub>K, возбуждаемой в срезе ускоренными электронными зондами (Pogorelov et al., 1991, 1994). Цитоплазматическая концентрация калия и натрия в blastomere двухклеточного эмбриона мыши в разных вариантах опыта оказалась следующей: 1) в эмбрионах сразу после выделения из яйцевода ( $n = 16$ ) — 108 и 124 мМ соответственно; 2) в эмбрионах после 10 мин инкубации в цитохалазине В ( $n = 12$ ) — 117 и 64 мМ; 3) в эмбрионах, инкубированных с цитохалазином В и отмытых 20 мин в среде Дюльбекко ( $n = 12$ ), — 111 и 126 мМ (представлены средние значения для указанного числа эмбрионов; среднеквадратичные отклонения для калия не было 10 %, для натрия — не более 15 %). Полученные результаты показывают, что инкубация в цитохалазине В вызывает уменьшение концентрации натрия в blastomere.

Этот факт может отражать активизацию Na/K-АТФазы, направленную на компенсацию утечки калия через калиевые каналы. Отмывка препарата приводит к восстановлению цитоплазматического Na/K-баланса. Таким образом, действие цитохалазина в используемом протоколе носит обратимый характер. По-видимому, более выраженного травматического эффекта следует ожидать на последующих этапах репрограммирования эмбриональной клетки.

**ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДНК БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA*, СОДЕРЖАЩИЕ СРG-МОТИВЫ, ОКАЗЫВАЮТ ОПОСРЕДОВАННЫЙ ЭФФЕКТ НА СОЗРЕВАНИЕ МОНОЦИТАРНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК.** © А. Е. Гончаров, Л. П. Титов. Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь.

Механизмы иммуномодулирующего влияния ДНК бактерий на иммунокомпетентные клетки изучены недостаточно. Установлено, что иммунобиологический эффект ДНК обусловлен метилированными CpG-последовательностями. В предыдущих работах (Титов и др., 2005) было показано влияние CpG-мотивов генома бактерий рода *Klebsiella* на функциональную активность мононуклеаров периферической крови. Целью работы было изучение прямого или опосредованного влияния данных олигонуклеотидов на функциональную активность моноцитарных дендритных клеток (ДК). При анализе генома бактерий рода *Klebsiella*, взятого из базы данных NCBI, обнаружены две перспективные последовательности — CpG1 и CpG2. Моноциты выделяли адгезией на пластике (до 25 % примеси других клеток, в основном представленных В-лимфоцитами) либо иммуномагнитной сепарацией (чистота не менее 97 %). Моноциты культивировали с ГМ-КСФ и ИЛ-4 в течение 6 сут. Незрелые ДК ( $n = 11$ ) инкубировали с ФНО- $\alpha$ , с комбинацией олигонуклеотидов CpG1 + 2, а также с ФНО- $\alpha$  + CpG1 + 2 в течение 2 сут. Фенотипирование клеток проводили при помощи цитофлуориметра FACS Calibu с использованием антител производства Caltag. Экспрессию мРНК цитокинов определяли методом real-time PCR. При культивировании незрелых ДК, полученных из моноцитов, выделенных адгезией на пластике с олигонуклеотидами и ФНО- $\alpha$ , оба препарата вызывали сравнимые изменения как в морфологии клеток, так и в фенотипе, что проявилось в увеличении экспрессии молекул CD1a, CD80 и HLA-DR при отсутствии влияния на CD86. Все индукторы созревания экспрессировали сравнимые уровни мРНК ИФН- $\alpha$  и ИЛ-10. ДК, стимулированные только олигонуклеотидами, экспрессируют на порядок больше мРНК ИЛ12p40 (ИЛ-12p40/ $\beta$ -актин —  $0.0124 \pm 0.0033$ ) по сравнению с ФНО- $\alpha$  ( $0.0010 \pm 0.0001$ ). Однако данные CpG-мотивы не оказывали влияния на функциональную активность ДК, полученных из выделенных иммуномагнитной сепарацией моноцитов. Экспрессия мРНК toll-like рецептора 9 (TLR-9) на моноцитарных ДК отсутствовала. В результате было показано иммунобиологическое влияние комбинации CpG-последовательностей CpG1 и CpG2 генома *Kl. pneumoniae*. Олигонуклеотиды вызывали созревание незрелых ДК, что проявилось в сравнимом с ФНО- $\alpha$  усилении экспрессии молекул CD1a, CD80 и HLA-DR. При этом отсутствие усиления экспрессии молекулы CD86 в зна-

чительной степени компенсируется существенно большей экспрессией мРНК про-Tx1 цитокина ИЛ-12 в сравнении со стандартным индуктором созревания — ФНО- $\alpha$ . Поскольку, согласно подтвержденным нами литературным данным, toll-like рецептор 9 (TLR9), распознающий CpG-мотивы, экспрессируется на плазматических ДК и на В-лимфоцитах, но не на моноцитарных ДК, есть основания считать изученный иммунобиологический эффект опосредованным. Данное предположение подтверждается также отсутствием влияния олигонуклеотидов на функциональную активность ДК, полученных из высокоочищенных моноцитов. Однако в случае выделения моноцитов методом адгезии полученные олигонуклеотиды могут быть использованы в качестве эффективных индукторов созревания ДК.

**ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ЭМБРИОГЕНЕЗ ИЛИ КАНЦЕРОГЕНЕЗ?** © О. Ф. Гордеева,<sup>1</sup> Н. Ю. Красникова,<sup>1</sup> А. В. Ларионова,<sup>3</sup> Д. В. Гуляев,<sup>1</sup> Т. М. Никонова.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт биологии развития РАН и <sup>2</sup> Российский государственный медицинский университет, Москва.

Эмбриональные стволовые клетки рассматривают как уникальную экспериментальную модель для изучения фундаментальных механизмов, вовлеченных в регуляцию процессов раннего развития млекопитающих, гистогенеза и канцерогенеза. Перспективы использования их для заместительной клеточной терапии стимулировали появление большого числа исследований биологии эмбриональных стволовых клеток. Однако широкомасштабные исследования механизмов самообновления и дифференцировки плюрипотентных клеточных линий показали, что при получении линий эмбриональных стволовых клеток и дальнейшей экспансии их в культуре *in vitro* происходит изменение программы их детерминации по сравнению с плюрипотентными клетками эмбрионов. Неконтролируемые генетические и эпигенетические модификации генома этих клеток могут приводить к появлению клеток с неизвестными свойствами и потенциалом. Дифференцировка плюрипотентных клеточных линий *in vitro* и *in vivo* в организме взрослых животных-реципиентов демонстрирует автономность функционирования этих клеточных систем, которая наблюдается также и при возникновении раковых опухолей. В нашей работе изучение механизмов регуляции самых ранних этапов детерминации клеток-предшественников трех зародышевых листков и линии половых клеток из эмбриональных стволовых клеток показало, что определение клеточной судьбы происходит вследствие изменения баланса сигнальных молекул регуляторных путей Nodal/Activin/TGF- $\beta$ . Детерминация плюрипотентных клеток в линию первичных половых клеток наиболее быстрая по сравнению с соматическими клетками, однако для дифференцировки зрелых гамет необходима скоординированная система регуляции. В отсутствие соответствующей сигнальной системы плюрипотентные клетки останавливаются на стадии первичных половых клеток. Профиль экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, остается стабильным на ранних и продвинутых стадиях дифференцировки эмбриональных стволовых клеток *in vitro*, а также в экспериментальных тератомах. Таким образом, эмбриональные стволовые клетки могут быть использованы для моделирования

процессов канцерогенеза в фундаментальных исследованиях и для создания тест-системы с целью поиска эффективных противоопухолевых препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-49185) и по программе фундаментальных исследований президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**ОРГАНИЗАЦИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В КЛЕТКАХ ВАЗОПРЕССИН-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ЛИНИИ MDCK.** © А. Н. Горшков, Е. С. Снизиревская, Я. Ю. Комиссарчик. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Линия MDCK представляет собой установленную культуральную модель вазопрессин-чувствительного плотного эпителия. Известно, что базолатеральная мембрана данных клеток содержит V2 — рецепторы к аргинин-вазопрессину (AVP), связывание которых с AVP запускает аденилат-циклазный каскад внутриклеточного сигналинга, приводящий к активации PKA и последующему фосфорилированию ряда белков. Актиновый цитоскелет является одним из важнейших участников процесса индуцированного вазопрессинном транспорта воды через плотные эпителии, в связи с чем мы провели изучение его организации в клетках MDCK. Для подтверждения пригодности данной клеточной модели для анализа механизмов транспорта воды с помощью иммунофлуоресценции нами было изучено связывание AVP с рецепторами в клетках MDCK. С этой целью были использованы поликлональные антитела против AVP. При инкубации клеток в  $10^{-5}$ — $10^{-6}$  М AVP на всех изученных сроках (30 с—15 мин) наблюдается достоверное увеличение иммунофлуоресценции меченных антителами клеток по сравнению с контрольными (без добавления AVP) образцами. Связанный с рецепторами AVP выявляется в виде небольших интенсивно флуоресцирующих кластеров преимущественно на базальной поверхности клеток. Полученные результаты подтвердили факт воздействия AVP на клетки MDCK и пригодность данных клеток для изучения механизмов действия антидиуретического гормона. Затем мы провели анализ организации актина и нескольких важнейших взаимодействующих друг с другом актиноорганизующих белков (палладина, альфа-актинина и эзрина) в клетках MDCK. С помощью электронно-микроскопического анализа установлено, что конгломератный монослой MDCK представлен полярными клетками с развитыми зонами межклеточных контактов: плотными, промежуточными и десмосомами. Апикальная поверхность клеток несет многочисленные микроворсинки. В цитоплазме значительно развиты элементы аппарата Гольджи, что говорит о высокой белоксинтезирующей и секреторной активности данных клеток. В непосредственной близости от аппарата Гольджи локализуются микротрубочки. Актиновые микрофиламенты обнаруживаются в апикальных микроворсинках, в областях межклеточных контактов и в виде отдельных пучков в цитоплазме клеток. Визуализация актина родамином-фаллоидином подтверждает данные ультраструктурного анализа. В базальной цитоплазме выявлены многочисленные стресс-фибриллы, связанные с фокальными контактами. Плотная сеть актина ассоциирована с межклеточными

контактами. Подстилающий апикальную мембрану цитоскелет представлен тонкими пучками актина в микроворсинках и слабофлуоресцирующей сетью субмембранных актиновых фибрилл. С помощью двойных флуоресцентных меток установлено, что в клетках MDCK альфа-актинин и палладин тесно колокализуются друг с другом и ассоциированы со всеми перечисленными выше актиновыми структурами. Эзрин присутствует в области апикальной клеточной мембраны, в ассоциации с субмембранным актином. Умеренная иммунофлуоресценция эзрина обнаруживается также в области межклеточных контактов. В то же время стресс-фибриллы базальной зоны цитоплазмы клеток MDCK являются эзрин-негативными структурами. Известно, что партнером по связыванию эзрина является палладин. Вместе с тем полученные результаты обнаружили только частичную колокализацию двух данных белков в апикальном субмембранном цитоскелете и в области межклеточных контактов. Следовательно, взаимодействие палладина и эзрина, очевидно, не является конститутивным (как в случае связывания палладина и альфа-актинина), а подвержено регуляции некими (на сегодня неустановленными) факторами. В дальнейшем данная клеточная линия, трансфицированная аквапорином 2, будет использована нами для изучения механизмов трансэпителиального транспорта воды.

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЛАБИЛЬНОГО АНТИГЕНА ЯДРЫШКА КАК ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ ПРИЗНАК УХУДШЕНИЯ СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА HeLa В КУЛЬТУРЕ.** © А. А. Григорьев,<sup>1,2</sup> А. М. Мураталиев,<sup>1</sup> Ю. В. Аблаева,<sup>1</sup> Т. И. Булычева,<sup>2</sup> О. В. Зацепина.<sup>1,3</sup> <sup>1</sup> Институт биоорганической химии РАН, zatsepin@ibch.ru, <sup>2</sup> Гематологический научный центр РАМН, Москва, и <sup>3</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии Московского государственного университета.

Из практики хорошо известно, что длительное выращивание иммортализованных клеток в культуре *in vitro* может приводить к изменению их первоначальных признаков, таких как общая морфология, способность к пролиферации, скорость удвоения популяции, увеличение числа гибнущих клеток и изменение чувствительности к внешним воздействиям. Эти признаки накапливаются со временем и в совокупности указывают на ухудшение общего состояния культуры. В настоящей работе мы предлагаем новый цитологический подход для оценки состояния клеток человека HeLa, основанный на изменениях в характере локализации специфического ядрышкового антигена (назван А3-антиген), предположительно входящего в состав транскрипционного комплекса РНК полимеразы I. А3-антиген с высоким сродством и исключительной специфичностью узнается моноклональным антителом (названо А3), которое было получено при иммунизации мышей линии Balb/c грубой фракцией ядер клеток Ramos по методике, описанной нами ранее (Булычева и др. Цитология, 2000, **42**: 944—954). Иммуноцитохимическое окрашивание антителом А3 клеток животных разных видов показало, что А3-антиген выявляется только в клетках человека и других приматов вне зависимости от их линейного или тканевого происхождения. В ядрышках иммунореактивных клеток, включая стандартные HeLa, MCF-7, фибробласты кожи и др., А3-антиген

локализуется в составе многочисленных фокусов, совпадающих с местами синтеза рРНК, а в митозе — в связи с районами ядрышковых организаторов хромосом (рДНК). Эти признаки позволяют отнести АЗ-антиген к белковым компонентам транскрипционного комплекса РНК полимеразы I. Удивительным свойством АЗ-антигена является изменение его характерной локализации в части популяции клеток культуры HeLa при ее длительном (до 6—8 мес) культивировании. При выращивании клеток HeLa в стандартных условиях (среда ДМЕМ, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, NuClone, стандартные концентрации стрептомицина и пенициллина; 37° С, 5 % CO<sub>2</sub>) через 2—4 мес после начала работы с культурой среди нормальных клеток, характеризующихся избирательной локализацией АЗ-антигена в ядрышках, выявляются клетки, в которых АЗ-антиген располагается не только в ядрышках, но и в дискретных нуклеолазмиических фокусах. Продолжение работы с «измененной» культурой приводит к тому, что доля аномальных клеток в ней постепенно возрастает до 30—50 %. Этот процесс сопровождается появлением в культуральных флаконах или на препаратах многочисленных гибнущих клеток, а также повышением чувствительности культуры к воздействию трипсина, ингибиторов транскрипции и трансляции. Причины спонтанных изменений в локализации АЗ-антигена в клетках HeLa со временем неизвестны. Есть основания полагать, что определенную роль в их возникновении может играть присутствие в среде культивирования следовых количеств антибиотиков, оказывающих ингибирующее влияние на синтез белка в клетках эукариот. Ранее нами показано, что частичное или полное подавление трансляции в разных типах культур клеток человека с помощью антибиотиков, специфически ингибирующих эукариотический синтез белка, также приводит к миграции АЗ-антигена из ядрышка в ядро. Представляется возможным, что характер расположения некоторых белков ядрышка может являться простым и надежным цитологическим маркером, указывающим на начало старения клеток человека в культуре в процессе их длительного культивирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-08131 офи-а).

**ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИЮ У НИХ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ, СЕКРЕЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 И ФАКТОРА РОСТА СОСУДОВ.** © О. С. Гринаковская, Л. Б. Буравкова. ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва.

Важная роль в регуляции сосудодвигательных реакций в условиях недостатка кислорода принадлежит паракринной функции эндотелиальных клеток (ЭК), которые синтезируют простагландин, оксид азота, предсердный натрийуретический фактор, активатор плазминогена, эндотелиальный фактор роста сосудов (hVEGF), IL-6 и целый ряд других биологически активных веществ. Известно, что при острой гипоксии происходят изменения функционирования ЭК, связанное с нарушением синтеза противовоспалительных интерлейкинов, и изменения степени адгезии лейкоцитов и тромбоцитов, проницаемо-

сти сосудистой стенки. При длительном воздействии различных повреждающих факторов, в том числе и гипоксии, происходит постепенное истощение и извращение компенсаторной способности эндотелия, приводящее к вазоконстрикции и пролиферации. В то же время практически нет данных о влиянии на культивируемые ЭК многократных гипоксических воздействий различной продолжительности. Целью работы было изучение влияния кратковременной и длительной повторяющейся гипоксии на жизнеспособность ЭК, экспрессию молекул адгезии на их поверхности — ICAM-1 и VCAM-1, секрецию IL-6 и hVEGF. В экспериментах использовали ЭК пупочной вены человека, выделенные по модифицированному методу Джимброне (Антонов и др., 1986), субкультивируемые до 4-го пассажа в стандартных условиях (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °С). Изменения жизнеспособности, экспрессии молекул адгезии и экскреции IL-6 и hVEGF изучали при одно-, двух- и трехкратном кратковременном (3 ч) и длительном (18 ч) воздействиях на культивируемые ЭК гипоксических газовых смесей. Гипоксию создавали в герметично замкнутой камере StemCell Technologies Inc. (Канада), снижая содержание O<sub>2</sub> до 5 % при замещении воздуха газовыми смесями (95 % N<sub>2</sub> + 5 % CO<sub>2</sub> или 95 % Ar + 5 % CO<sub>2</sub>). Оценка жизнеспособности ЭК с помощью набора Annexin-V — PJ (Immunotech, Франция) на проточном цитофлуориметре EpiX XL (Becton Dickinson, США) показала, что вне зависимости от условий культивирования (21 или 5 % O<sub>2</sub>) число живых клеток составляло 90—92 %, 7—8 % клеток было в стадии некроза/вторичного некроза и 1—2 % — апоптотически измененными. Изменение степени экспрессии молекул адгезии на поверхности ЭК оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченных антител. Показано, что при трехкратных кратковременных экспозициях количество клеток, экспрессирующих VCAM-1, уменьшалось в среднем с 58 до 50 %. В то же время многократная длительная гипоксия приводила к увеличению клеток, экспрессирующих VCAM-1, с 50 до 80 %. Не было отмечено существенного изменения степени экспрессии ICAM-1 на поверхности ЭК при однократных и многократных воздействиях. Для определения концентрации IL-6 и hVEGF в культуральной среде использовали иммуноферментный анализ и стандартные наборы Biosource (США). Показано, что секреция hVEGF увеличивается в 2 раза уже после однократного воздействия. В период реоксигенации наблюдалась тенденция к уменьшению концентрации hVEGF, однако его уровень не достигал контрольных значений даже через 48 ч культивирования в условиях нормоксии. Последующие двух- и трехкратная экспозиции в гипоксии приводили к дальнейшему увеличению уровня hVEGF в среде. Одно- и многократные длительные экспозиции ЭК при пониженном содержании O<sub>2</sub> вызывали повышение концентрации hVEGF и IL-6 в 2.5—3.0 раза. В периоде реоксигенации наблюдалось уменьшение их концентрации, которая, впрочем, не достигала первоначального уровня. Сразу после одно- и многократных кратковременных экспозиций ЭК в условиях гипоксии не было выявлено повышения секреции IL-6, однако ее подъем начинался в периоде последствия. Представленные результаты подтверждают полученные ранее данные о том, что культивируемый эндотелий хорошо переносит гипоксические условия, несмотря на стресс-реакцию, о которой свидетельствует повышенная экскреция IL-6. Увеличение числа клеток, несущих на повер-

хности VСAM-1, и усиление синтеза hVEGF при длительных гипоксических воздействиях могут свидетельствовать об активации процессов ангиогенеза и ингибировании процессов апоптоза. При этом только многократные длительные экспозиции изменяют адгезивные свойства клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке, представленной Отделением биологических наук РАН и по программе поддержки ведущих научных школ (НШ-6364.2006.4).

**КАРИОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ФИБРОБЛАСТОВ ИЗ ЭМБРИОНОВ МЫШИ, ПРАРОДИТЕЛИ КОТОРОЙ БЫЛИ ТРАНСФИЦИРОВАНЫ ГЕНОМ *ger*.** © Т. М. Гринчук, И. А. Габай, К. М. Иванцов, И. В. Кожухарова, В. М. Михайлов, Л. Л. Алексеенко, В. В. Зенин. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Как известно кариотип мыши в природе стабилен и представлен 19 парами аутосом и 2 половыми хромосомами. При исследовании иммортализованных клеточных линий, полученных из эмбрионов мышей трансгенного происхождения (одна линия была получена из клеток эмбриона, содержащего онкоген *v-sis* под промотором MMTV, две — из эмбрионов, содержащих онкоген *K51*), было установлено, что уже на 3—5-м пассажах культивирования *in vitro* клетки, несущие в своем геноме чужеродный онкоген, характеризовались кариотипической гетерогенностью, связанной с появлением околодиплоидных и околотетраплоидных вариантов хромосом, имеющих перестройки. Несмотря на то что характер изменений для каждой линии оказался индивидуальным, была установлена общая закономерность: даже непродолжительное культивирование (15—20 пассажей) приводило к усиленной неспецифической дестабилизации структуры кариотипа, выражающейся в усилении анеуплоидизации генома и в прогрессии количества и разнообразия перестроенных хромосом (Гринчук и др., 2004). В связи с тем что клетки мыши, маркированные зеленым белком в результате введения в них гена *ger*, представляют большой интерес в качестве разнообразных тест-систем, а также в качестве фидера при культивировании стволовых клеток, в настоящей работе был проведен детальный анализ степени стабильности кариотипа клеток, трансфицированных геном *ger*, при переводе их в условия *in vitro*. С этой целью гомогенат 13-суточных эмбрионов, полученных от скрещивания самки мыши трансгенного происхождения с самцом линии C57B1/6, был переведен в условия культивирования вне организма. На 2-м пассаже после введения клеток в культуру (ДМЕМ, 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и гентамицин) они были кариотипированы с использованием метода окрашивания метафазных хромосом на G-диски. На момент исследования зеленым белком было маркировано 15—20 % клеток. Кариотипирование выявило геномную неоднородность проанализированного материала: 80 % клеточной популяции составляли анеуплоидные клетки с псевдо- или околодиплоидным числом хромосом, 20 % — клетки с анеуплоидным набором, по числу хромосом близким к околотетраплоидному. В клетках околодиплоидного ряда хромосомных копий варьировало преимущественно от 0 до 3, в анеуплоидных

клетках вариабельность этого показателя была выше: пределы варьирования числа хромосомных экстракопий как в пределах клетки, так и между клетками были от 0 до 6. Каждая прокариотипированная клетка имела уникальный набор, представленный нормальными хромосомами мыши в разном числе копий и разнообразными по происхождению атипичными хромосомами: двуплечими, возникшими в результате так называемых робертсоновских транслокаций (эктопических ассоциаций между негомологичными эромосомами в области центромера), дицентриками, образованными путем последовательного транслоцирования (эктопического связывания) разнотипных хромосом последовательно, перестроенным различными способами телоцентрическими хромосом. Клетки со стандартным кариотипом мыши в проанализированном нами материале отсутствовали. Известно, что любые клетки млекопитающих, в том числе и мыши, при переводе в условия *in vitro* претерпевают спонтанные изменения на уровне кариотипа адаптационного характера в связи с введением клеток в культуру и(или) в связи с иммортализацией. Характер этих изменений в каждом конкретном случае может быть разным, но скорость изменений на первых этапах невелика. Разнокачественная кариотипическая нестабильность проанализированного в настоящей работе материала, выявленная на очень раннем этапе после введения клеток в культуру, позволяет рассматривать ее как индуцированную внесением в клеточный геном мыши чужеродного белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49609).

**КАРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ, ПРАРОДИТЕЛИ КОТОРОЙ БЫЛИ ТРАНСФИЦИРОВАНЫ ГЕНОМ *ger*.** © Т. М. Гринчук, К. М. Иванцов, И. А. Габай, Б. В. Попов, В. М. Михайлов, Н. С. Скрипкина, Л. Л. Алексеенко. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В основу настоящего сообщения положены данные кариологического анализа клеточной линии, полученной в результате введения в условиях *in vitro* клеток костного мозга мыши линии C57B1/6, прародители которой были трансфицированы геном *ger*. С применением метода окраски метафазных хромосом на G-диски было показано, что уже на 6-м пассаже анализируемые клетки характеризовались всеми признаками трансформированного генотипа: анеуплоидией, связанной с большим разбросом числа хромосом (от 46 до 85) и отсутствием модального класса, вариабельностью числа экстракопий той или иной хромосомы как в пределах клетки (от 1 до 5 копий), так и от клетки к клетке, наличием структурно перестроенных хромосом, в том числе часто встречаемой большой маркерной хромосомы, в 2 раза превосходящей длину хромосомы 1, двуплечих хромосом, возникших в результате робертсоновских слияний, дицентриков — в результате последовательного объединения телоцентриков, появлением дополнительного генетического материала в виде сверхмелких микрохромосом и ГОО в прицентромерных районах некоторых хромосом, делающих их двуплечими. В отдельных случаях обнаружены суперполиплоидные клетки с числом хромосом до

160. В процессе длительного культивирования клеток (около 50 пассажей) характер их кариотипической нестабильности, за исключением утраты маркерной хромосомы, сохранялся. Очевидно, что в клетках костного мозга взрослых мышей при их переводе из *in vivo* в *in vitro* селективно выгодными оказались анеуплоидные варианты, существующие наряду с околоплоидными в эмбриональных GFP-трансфектантах *in vitro*. Возникновение в мышцах, инъецированных внутримышечно клетками данной линии (46-й пассаж, но не 15-й), опухолей (мезенхимомы) говорит о том, что вступившие на путь прогрессирующей дестабилизации генома клетки костного мозга претерпевают в системе *in vitro* очень быстрое озлокачествление.

**РАЗЛИЧНАЯ РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ STAT1 И STAT3 ПРИ СТИМУЛЯЦИИ КЛЕТОК A431 ЭПИДЕРМАЛЬНЫМ ФАКТОРОМ РОСТА.** © П. С. Грудинкин, Н. Н. Никольский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Клетки эпидермоидной карциномы человека A431 характеризуются сверхэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) и отвечают гибелью клеточной популяции на действие ЭФР в высоких (наномолярных) концентрациях. Ранее было показано участие активируемого транскрипционного фактора STAT1 в этом ответе клеток A431 на ЭФР. Для исследования роли транскрипционных факторов семейства STAT в клетках A431 нами было применено трансфицирование клеток плазмидами, экспрессирующими малые интерферирующие РНК (siRNA) против STAT1 или STAT3 и получены постоянные линии клеток A431 с нокдауном (уменьшенным количеством) одного из этих белков. Полученные трансфектанты не отличались существенно по скорости роста в нормальных условиях от родительской линии и от контрольных трансфектантов с нефункциональной плазмидой. При действии ЭФР нокдаун STAT1 (но не STAT3) препятствовал снижению клеточной популяции. Дальнейшие исследования показали, что основным механизмом действия ЭФР является STAT1-зависимая индукция апоптоза. Нокдаун STAT3 существенно не влиял на протекание апоптоза, хотя значительно снижал вызываемую ЭФР индукцию антиапоптотического белка Bcl-X<sub>L</sub> и ингибитора циклинзависимых киназ p21<sup>Waf1</sup>. Кроме того, нокдаун STAT3 ингибировал вызываемую ЭФР разборку межклеточных контактов, что может быть связано с увеличением уровня E-кадгерина, наблюдавшимся только в отсутствие STAT3. По-видимому, баланс стимулируемых STAT3 антиапоптотических и проапоптотических путей нивелирует суммарный эффект STAT3 при действии ЭФР на клетки A431.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-49773) и по программе поддержки ведущих научных школ (НШ-2231.2003.4).

**ВЛИЯНИЕ ПРОЛАКТИНА НА ИНОЗИТОЛТРИФОСФАТ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ В ООЦИТАХ СВИНЕЙ.** © В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина. Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, vitald@fromru.com.

Показано, что в некоторых клетках пролактин способен стимулировать обмен фосфоинозитидов, однако не отмечены влияния этих фосфоинозитидов на освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо (Ratovondrahona et al., 1996). В работе изучали участие инозитол-1,4,5-трифосфат-чувствительных (IP<sub>3</sub>) рецепторов в стимулированном пролактином освобождении Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов свиней. В экспериментах использовали яичники свиней в стадии фолликулярного роста без видимой патологии. Ооциты выделяли из фолликулов диаметром 3—6 мм. Инкубацию ооцитов проводили в среде Дюльбекко в отсутствие кальция. Концентрацию кальция во внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклина. Интенсивность флуоресценции зонда измеряли на люминесцентном микроскопе, снабженном необходимыми светофильтрами. Для ингибирования IP<sub>3</sub>-чувствительных рецепторов использовали ингибитор гепарин. Так как гепарин имеет большую молекулярную массу, он не может самостоятельно проникать внутрь клеток. Чтобы обеспечить вход гепарина в ооциты свиней, в экспериментах использовали пермеабелизованные клетки. Для пермеабелизации использовали дигитонин (4 мкМ, длительность обработки 5 мин). Концентрации пролактина, применяемые в экспериментах, равнялись 5 и 50 нг/мл. В контрольных клетках добавление пролактина в концентрации 5 нг/мл вызывало освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо. Предварительная обработка ооцитов гепарином в концентрациях 0.1, 1.0 и 10.0 мг/мл ингибировала стимулированное пролактином освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо. Воздействие на ооциты пролактина в концентрации 50 нг/мл также вызывало освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо. Однако обработка ооцитов гепарином в концентрациях 0.1 и 1.0 мг/мл не оказывала влияния на стимулированное пролактином освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, и только инкубация с гепарином в концентрации 10 мг/мл приводила к ингибированию стимулированного пролактином освобождения Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо. Использование рутениевого красного приводило к ингибированию рианодинных рецепторов. Как и предполагалось, ингибирование рианодинных рецепторов рутениевым красным в концентрации 200 мкМ не оказывало влияния на стимулированное пролактином освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо. Таким образом, действие пролактина не связано с активацией рианодинных рецепторов. Различные концентрации пролактина, по-видимому, по-разному взаимодействуют с IP<sub>3</sub>-чувствительными рецепторами. Пролактин в концентрации 5 нг/мл освобождает Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, активируя IP<sub>3</sub>-рецепторы, в то же время пролактин в концентрации 50 нг/мл в основном освобождает Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо при активации других, не IP<sub>3</sub>-чувствительных рецепторов.

**ИЗМЕНЕНИЕ ЛАМЕЛЛИПОДИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ ПРИ ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ.** © Е. А. Добринских,<sup>1</sup> А. В. Верховский,<sup>2</sup> И. А. Воробьев.<sup>1,3</sup> <sup>1</sup> Кафедра клеточной биологии и гистологии Московского государственного университета, <sup>2</sup> EPFL, Лозанна, Швейцария, и <sup>3</sup> Институт физико-химической биологии Московского государственного университета.

Методом видеомикроскопии с усилением контраста исследовали изменение поведения активного края фибробластов 3Т3 в контроле и при деполимеризации микротрубочек нокодазолом. Контрольные клетки 3Т3 поляризованы и имеют ярко выраженную широкую ламеллу с одним, реже двумя активными краями, ограниченную стабильными краями. Длина активного края составляет около 35 % от видимой длины края клетки. Во время наблюдения на активном крае клетки происходит активный раффлинг, формирование прямых коротких филоподий и ламеллоподий (средняя площадь образованных ламеллоподий составляет  $67.17 \pm 3.36$  мкм<sup>2</sup>). Активный край существует в течение довольно длительного времени. Время жизни одиночного активного края (от возникновения до момента стабилизации) в контрольных клетках составляет  $14.2 \pm 1.7$  мин. Клетки 3Т3, обработанные нокодазолом, не поляризованы и не имеют выраженной широкой ламеллы. В них постоянно формируются довольно узкие выросты цитоплазмы, количество которых соответствует количеству активных краев, на концах которых и происходит образование короткоживущих ламеллоподий. Средняя площадь ламеллоподий в клетках без микротрубочек снижается в 2 раза по сравнению с площадью ламеллоподий в контрольных клетках. Однако в этих клетках также происходит образование активных краев с раффлингом и выдвиганием филоподий, но часть филоподий при этом становится длиннее, по сравнению с филоподиями в контрольных клетках, и они могут изгибаться. Количество активных краев в этих клетках увеличивается до  $4 \pm 1$ . После обработки нокодазолом длина одиночного активного края уменьшается по сравнению с контрольной больше чем в 3 раза и составляет около 11 % от видимой длины края клетки. Время жизни одиночного активного края в клетках, обработанных нокодазолом, также уменьшается почти в 3 раза по сравнению со временем жизни активного края в контрольных клетках и составляет  $4.8 \pm 0.2$  мин. При этом существование активного края заканчивается втягиванием всей ламеллоподии в отличие от контрольных клеток, где происходит стабилизация активного края. Общая средняя длина всех активных краев в клетках, обработанных нокодазолом, и в контрольных клетках была одинаковой —  $67.9 \pm 5.46$  и  $70.2 \pm 8.45$  мкм соответственно. Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что для инициации короткоживущей ламеллоподии достаточно полимеризации активного цитоскелета, но для ее расширения и поддержания долгоживущей ламеллы необходимы микротрубочки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49847).

**ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТА МИТО Q НА ЦИТОСКЕЛЕТ И МОРФОЛОГИЮ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК.** © Л. В. Домнина, М. Л. Домнинская, О. Ю. Иванова, И. В. Скулачев, В. П. Скулачев, Ю. М. Васильев. НИИ физико-химической биологии Московского государственного университета.

Влияние антиоксидантов на морфологию клеток, их цитоскелет и адгезивные свойства остается неясным. В настоящей работе мы изучали действие антиоксиданта Мито Q (Smith et al. *Methods Enzimol.*, 2004, 382 :

45—67) на клетки линии HeLa (трансформированные эпителиальные клетки человека), IAR-2 (эпителиальные клетки крысы), Rat-1 (фибробласты крысы), клетки L (трансформированные фибробласты мыши) и подкожные фибробласты человека. Были исследованы изменения морфологии клеток, их цитоскелета, адгезивных структур и системы микротрубочек. Для анализа изменений формы клеток использовали метод Данна и Брауна (Dunn, Brown, 1986). Исследование цитоскелета (пучки актиновых микрофиламентов, микротрубочки) и адгезивных структур (винкулин- и паксиллинсодержащие фокальные контакты) проводили с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции на конфокальном микроскопе. Митохондрии в живых клетках окрашивали тетраметилпродаминол. Изменения потенциала вызывали повреждением небольшого участка митохондрий лучом лазера (длина волны 488 нм). Показано, что при воздействии антиоксиданта Мито Q площадь распластанных клеток увеличивалась. Одновременно значительно увеличивались количество и толщина пучков актиновых микрофиламентов (стресс-фибрилл) и связанного с ними миозина. Длина винкулин- и паксиллинсодержащих фокальных контактов также увеличивалась. В экспериментах с точечным повреждением митохондрий лазерным лучом показано, что воздействие Мито Q приводит к формированию митохондриальной сети в клетках HeLa в отличие от контрольных клеток, имеющих отдельные, не связанные между собой митохондрии. Возможные механизмы изменений клеток под действием антиоксиданта обсуждаются.

Работа выполнена при финансовой поддержке Людвиговского института исследований рака (грант РО 863) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 02-04-48792 и 00-04-48090).

**РАЗЛИЧНАЯ СТРУКТУРНАЯ И ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ИЗОФОРМ АКТИНА В КЛЕТКЕ.** © В. Б. Дугина. НИИ физико-химической биологии Московского государственного университета.

Актины являются основными структурными компонентами цитоскелетных систем всех эукариотических клеток. Актинмиозиновые структуры ответственны за сократительные и двигательные функции клеток. Реорганизации актинового цитоскелета необходимы для осуществления таких ключевых процессов в клетке, как адгезия, миграция, поляризация и цитокинез. У млекопитающих синтезируется 6 изоформ актина, кодируемых различными генами. Мало известно о различии функций изоактинов в клетке. Спектр актиновых изоформ — мышечных и неммышечных (цитоплазматических) — может определять морфологические свойства, тип адгезионных структур и другие параметры, связанные с распластыванием и движением клеток. В неммышечных клетках позвоночных имеются две изоформы цитоплазматических актинов —  $\beta$  и  $\gamma$ . Топографическое распределение и функциональные различия этих двух изоформ до сих пор не были известны. Новые высокоспецифичные моноклональные антитела к актиновым изоформам, полученные и предоставленные нам проф. Шапоньером (С. Charopier, Женевский университет), были использованы для изучения распределения  $\beta$ - и  $\gamma$ -актина в культурах нормальных клеток различного происхождения (эпителия,

фибробластов и эндотелия), а также экспериментально трансформированных и опухолевых клеток. Был проведен анализ взаимной организации цитоплазматических изоформ актина методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии с применением трехмерной реконструкции изображения. Мы впервые показали, что цитоплазматические изоформы актина образуют различные структуры и по-разному распределены в нормальных клетках:  $\beta$ -актин выявляется в виде базолатеральных пучков, а  $\gamma$ -актин образует дорсальную кортикальную, а также ламеллиподиальную сеть микрофиламентов. Такие различия в распределении изоформ актина наблюдались в культурах нормальных клеток разного происхождения: фибробластах, эпителии и эндотелии.  $\gamma$ -Актиновая сеть была наиболее выражена в активных участках клетки в процессе распластывания и движения в культуральных условиях. Эксперименты с ингибиторами Rho-киназы и Rac1, а также миозина II позволили предположить различные пути регуляции цитоплазматических изоформ актина в клетке.

**ТРАНСАКТИВАЦИЯ РЕЦЕПТОРА ЭФР ПРИ ТЕПЛОМ ШОКЕ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА A431.** © А. Л. Евдонин, Г. М. Глускер, М. А. Берествой, Н. Д. Медведева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Под трансактивацией рецептора ЭФР понимают активацию рецептора в отсутствие действия специфического лиганда. В последнее время в литературе накапливаются данные о трансактивации рецептора ЭФР при различных повреждающих действиях (осмотический шок, действие перекиси водорода, тяжелых металлов). Действие повышенной температуры — тепловой шок — является одним из наиболее изученных стрессовых воздействий на клетку. Задача настоящей работы заключалась в исследовании активации рецептора ЭФР и ЭФР-зависимых сигнальных каскадов при тепловом шоке в клетках A431. Обнаружено, что тепловой шок ( $42^{\circ}\text{C}$ ) вызывает трансактивацию рецептора ЭФР. Этот вывод основан на том, что при тепловом шоке обнаружено фосфорилирование по тирозину как самого рецептора, так и белков-субстратов его тирозинкиназной активности (фосфолипазы  $\text{C}\gamma 1$ , STAT3 и ERK1, 2). Использование ингибиторов активности тирозиновых киназ показало, что трансактивация рецептора ЭФР при тепловом шоке не зависит от активности самого рецептора и активности Src-киназы, но зависит от активности Jak2-киназы. Эти результаты согласуются с данными, полученными при исследовании специфических сайтов фосфорилирования молекулы рецептора ЭФР. Кондиционная среда клеток, подвергнутых тепловому шоку, вызывает фосфорилирование по тирозину рецептора ЭФР в контрольных клетках, что позволяет сделать вывод об аутокринном типе трансактивации рецептора ЭФР при тепловом шоке.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49543).

**СЕКРЕЦИЯ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА 70 (HSP70) ИЗ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА A431.** © А. Л. Евдо-

нин, Г. М. Глускер, Н. Д. Медведева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Белки теплового шока ранее рассматривались как типично внутриклеточные белки, однако в последнее время в литературе накапливаются данные о том, что эти белки способны выходить из клеток во внеклеточную среду и выявляются в кондиционной среде культур клеток и тканевых жидкостях организмов. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что белок теплового шока 70 (Hsp70) выходит из клеток различного происхождения при действии теплового шока. Механизм выхода Hsp70 из клеток остается невыясненным. Задача настоящей работы заключалась в определении клеточных структур, вовлеченных в секрецию Hsp70 при тепловом шоке. Обнаружено, что действие повышенной температуры приводит к появлению Hsp70 в кондиционной среде клеток A431, что свидетельствует о способности этих клеток секретировать Hsp70. Показано, что в контрольных клетках Hsp70 локализован в цитоплазме, а при действии повышенной температуры перераспределяется в гранулы, локализованные на периферии клеток. Hsp70-содержащие гранулы не несут маркеров ранних эндосом, лизосом и липидных тел, но содержат хромогранина А — маркера секреторных гранул, что позволяет рассматривать их как секреторноподобные гранулы. Совместная локализация хромогранина А и Hsp70 в гранулах, а также одновременный выход обоих белков во внеклеточную среду свидетельствуют о том, что секрецию Hsp70 из клеток A431 осуществляют секреторноподобные гранулы. Полученные данные описывают новый секреторный путь, благодаря которому клетки карциномы способны активно выбрасывать Hsp70.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49543).

**ПРОТЕОГЛИКАНЫ КУЛЬТУРЫ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ МИОБЛАСТОВ КРЫСЫ L6J1.** © И. И. Ермакова, Г. А. Сакута, А. Л. Мокрушин, Т. А. Черткова, В. И. Морозов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, irigerma@yahoo.com.

Важнейшим компонентом процесса регенерации ткани скелетных мышц являются миобласты или сателлитные клетки. Вместе с тем до сих пор нет полного понимания механизмов, регулирующих рост и дифференцировку этих клеток. Большое значение для нормального протекания миогенеза имеет взаимодействие миобластов с внеклеточным матриксом (ВКМ), важными составляющими которого являются протеогликианы (ПГ). Эти соединения играют активную роль в миогенезе благодаря своей способности взаимодействовать с физиологически значимыми биомолекулами, включая факторы роста. Целью работы явилось выделение ПГ из культуры трансформированных миобластов крысы L6J1 для последующего изучения роли ПГ в процессах пролиферации и дифференцировки миобластов. Культура трансформированных миобластов крысы L6J1 получена из банка клеточных культур ИНЦ РАН. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Для мечения коровых белков ПГ использовали радиоактивную метку  $^{14}\text{C}$ -лейцин. Выделе-

ние ПГ проводили после наращивания примерно  $10^9$  клеток из культуральной среды, ВКМ и миобластов. ПГ экстрагировали с помощью сорбента Q-сефароза и элюировали в градиенте 0.2—1.5 М NaCl. Фракции градиента диализовали и лиофилизировали. ПГ выявляли в культуральной среде, ВКМ и клетках, используя краситель 1,9-диметилметиленовый синий, специфичный по отношению к ПГ. Показано, что ПГ культуральной среды представлен в основном ПГ эмбриональной сыворотки. Анализ включения  $^{14}\text{C}$ -лейцина в белки культуральной среды позволил выявить фракции ПГ, синтезированные миобластами. В клетках содержание ПГ было выше сравнительно с ВКМ. В процессе элюции ПГ с Q-сефарозы выявлены 4 фракции в случае ВКМ и 3 фракции — в случае клеток. Элюция первой фракции, не содержащей ПГ, происходит при концентрации соли 0.25 М NaCl. Во второй фракции (0.4—0.5 М NaCl) содержится основная часть белка с небольшим количеством углеводного компонента. Более гликозилированные ПГ элюируются в виде двух пиков при анализе ВКМ (0.55—0.65 и 0.8 М NaCl) и одного пика при анализе клеточного материала (0.7—0.9 М NaCl). Получены электрофоретические характеристики ПГ ВКМ и миобластов. Окраска геля альциановым синим — красителем, специфичным по отношению к полисахаридному фрагменту ПГ, подтвердила наличие ПГ во второй и третьей фракциях в случае клеток и в третьей и четвертой фракциях в случае ВКМ. Таким образом, с использованием описанной методологии выделены ПГ из культуры трансформированных миобластов крысы L6J1 и получены предварительные характеристики этих соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке С.-Петербургского научного центра РАН в 2005—2006 гг.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КРИОСОХРАНЕНИЯ ПОКОЯЩИХСЯ ПОЧЕК ЖИМОЛОСТИ СИНЕЙ *LONICERA CAERULEA* L. © А. С. Жестков, В. Г. Вержук, А. А. Соколкин. ГНУ ГНЦ РФ ВНИИ растениеводства, Санкт-Петербург, alexvirz@rambler.ru.

На Павловской опытной станции Института растениеводства коллекция жимолости представлена 251 образцом. В связи с тем что растения уязвимы к воздействию различных неблагоприятных факторов, необходимо продублировать коллекцию жимолости в генбанке. Мы хранили черенки жимолости (длина 15—20 мм, диаметр 4—7 мм) при умеренном холоде ( $-5\text{ }^\circ\text{C}$ ), запаянными в полиэтиленовую пленку (толщина 150 мкм) в течение 1 года без ухудшения жизнеспособности, а после 1.5—2.0 лет хранения она снизилась примерно на 40—50 %. В связи с этим остро стоит задача заложить коллекцию жимолости на хранение в криобанк при температуре  $-196\text{ }^\circ\text{C}$ , чему должна предшествовать разработка методики криогенного хранения. В качестве модельного объекта был взят сорт Амфора. В дальнейшем планируется проверить разработанную методику и на других сортах. Основную сложность при криоконсервации почек жимолости составляют их разная способность к выживанию и скорость сушки. Основные почки (как более чувствительные) хуже, чем почки замещения, переносят сверхнизкие температуры. Почки замещения при влажности 10—20 % можно замораживать даже без применения криопротектора, но при этом их выживаемость находит-

ся на низком уровне (15—25 %). В работе использовали следующие криопротекторы: PVS2 (глицерин, 30 % + ДМСО, 15 % + этиленгликоль, 15 % + сахароза, 0.4 М — Sakai et al., 1990); глицерин, 5 % + ДМСО, 5 % + сахароза, 5 % (Grout, Henshaw, 1978); ДМСО, 20 %; ДМСО, 20 % + сахароза, 0.4 М. Почки отделяли от черенка с тонким слоем сосудистой ткани и погружали в криопротектор. Время экспозиции в криопротекторе и температура варьировались. Первую группу почек предварительно выдерживали в криопротекторе при 20 и  $5\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 1 ч, подсушивали и замораживали методом витрификации в азотной шуге, а также методом программного замораживания со скоростью  $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-90\text{ }^\circ\text{C}$ , затем погружали в жидкий азот. Вторую группу выдерживали в криопротекторе при 20 и  $10\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 6 и 24 ч и замораживали в криобирках фирмы Nunc, не сливая криопротектор, с теми же скоростями. Выдержка в азоте всех образцов составляла 24 ч. Размораживание производили в водяной бане при  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Для отмывки криопротектора образцы второй группы помещали в 0.4 М раствор сахарозы. Для последующего проращивания использовали модифицированную среду MS без добавления гормонов; через 3—5 сут после прорастания растения переносили на среду, содержащую БАП (0.5) и ИМК (0.2).

По результатам экспериментов видно, что метод витрификации предпочтительнее как более простой, быстрый и дешевый (75 % выживаемости с PVS2 и 50 % — с ДМСО + глицерин + сахароза). Метод медленного замораживания позволяет достичь 80 % выживаемости, здесь предпочтительнее оказалось применение 20 % ДМСО. Во второй группе экспериментов предпочтительнее оказалось применение PVS2 с выдержкой при  $10\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 24 ч (выживаемость до 80 %). Выдержка в течение 6 ч давала примерно сходные результаты. Образцы, не прошедшие холодоподготовки, давали более низкий процент выживаемости и медленнее прорастали. В дальнейшем предполагаются применение других скоростей замораживания, определение пороговой температуры, при которой необходимо погружать образцы в азот, работа с другими криопротекторами.

МОРФОГЕННЫЕ, ПОТЕНЦИАЛЬНО МОРФОГЕННЫЕ И НЕМОРФОГЕННЫЕ АНДРОКЛИННЫЕ КАЛЛУСЫ ПШЕНИЦЫ ПО ДАННЫМ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ. © Д. Ю. Зайцев, О. А. Сельдимирова. Институт биологии Уфимского научного центра РАН, seldimirova@anrb.ru.

Андроклиния — феномен образования *in vitro* растения из морфогенетически компетентной клетки пыльника, как правило, сильновакуолизированной микроспоры, меняющей программу развития с гаметофитной на альтернативную спорофитную (Круглова и др., 2005). Один из путей морфогенеза *in vitro* микроспоры по спорофитной программе связан с формированием каллуса, который в данном случае предложено называть андроклиным. В культивируемых пыльниках образуются каллусы, как правило, двух типов: способные к дальнейшему морфогенезу *in vitro* и регенерации растений (морфогенные) и не обладающие такой способностью (неморфогенные). Согласно нашим предварительным исследованиям, в культуре пыльников пшеницы формируются и потенциально морфогенные каллусы, способные к реге-

нерации растений после еще одного пассирования на свежей питательной среде прежнего состава. Цель исследования состояла в выявлении цито-гистологического статуса различных типов андроклинных каллусов в 1-е сут после их появления на поверхности культивируемых пыльников. Андроклинные каллусы в культуре пыльников яровой мягкой пшеницы гибридной линии Фотос получали согласно известной методике (Круглова, Батыгина, 2002). Установлено, что морфогенные каллусы появляются на поверхности пыльников на 32-е сут культивирования и, по морфологическим данным, представляют собой образования белого матового цвета, плотной компактной структуры и узловатой формы. Светооптический анализ такого каллуса позволил выявить в его составе четыре зоны клеток. Зона I, занимающая приблизительно треть объема каллуса, состояла из плотной массы однородных клеток таблитчатой формы, обладающих меристематическими признаками — тонкой оболочкой и крупным ядром, занимающим центральное положение в клетке. Зона II была представлена округлыми клетками с крупными ядрами. Клетки зоны III были мелкими и уплощенными. Зона IV содержала вакуолизованные паренхимные клетки с относительно небольшими ядрами. Появление неморфогенных каллусов на поверхности пыльников отмечено на 28-е сут культивирования. По морфологическим данным, это образования желтого цвета, мягкой рыхлой обводненной структуры, неопределенной формы. По данным светооптического анализа, в таком каллусе имеются две зоны клеток — небольшая центральная и обширная периферическая. Центральная зона представлена мелкими клетками округлой формы, как правило, без ядер. Периферическая зона содержала крупные паренхимные клетки неправильной формы, также без ядер. Гипертрофированные межклетники периферической зоны определяют рыхлость этого типа каллуса. Часто наблюдаемое отсутствие ядер в клетках обеих зон свидетельствует о процессах их дегенерации. Основная особенность этого типа каллуса — отсутствие признаков меристематичности у составляющих его клеток. Потенциально морфогенные каллусы появлялись на поверхности пыльников на 29-е сут культивирования и имели внешнее морфологическое сходство и с морфогенными каллусами (белый цвет) и с неморфогенными каллусами (мягкая рыхлая обводненная структура неопределенная форма). Цито-гистологический анализ выявил в их составе три зоны клеток. Зона I состояла из мелких, уплощенных клеток. Зона II была представлена округлыми клетками с мелкими ядрами. Клетки зоны III имели неправильную форму и различный размер, характеризовались отсутствием ядер и хорошо развитыми межклетниками. Такие каллусы переносили на свежую питательную среду прежнего состава, и на 10-е сут культивирования в них отмечалось появление обширных зон меристематических клеток. Таким образом, анализ цито-гистологического статуса каллусов всех трех типов свидетельствует о внутренней зональности этих андроклинных структур, выраженной в различной степени у каллусов разного типа. Кроме того, только морфогенные и потенциально морфогенные каллусы характеризовались наличием зон меристематических клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 05-04-97911 и 05-04-08114) и по

программе поддержки ведущих научных школ РФ (проект НШ-4834.2006.4).

МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-kB ИНГИБИТОРАМИ HDAC В ТРАНСФОРМАНТАХ E1A + RAS. © Е. А. Затуловский,<sup>1,2</sup> М. В. Абрамова,<sup>1</sup> С. Б. Светликова,<sup>1</sup> В. А. Поспелов.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup> С.-Петербургский государственный политехнический университет, zatulovskye@mail.ru.

Ингибиторы гистон-деацетилаз (HDAC) обладают антипролиферативным действием на трансформированные клетки, они также способны вызывать блок клеточного цикла или апоптоз. Однако индукция апоптоза при действии ингибиторов HDAC происходит не во всех типах трансформированных клеток. В настоящей работе проведен анализ влияния ингибиторов HDAC на активность транскрипционного фактора NF-kB, который играет существенную антиапоптотическую роль в клетке. Установлено, что подавление пролиферации эмбриональных фибробластов мыши, трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras, сопровождается транскрипционной активацией NF-kB-регулируемых промоторов, но не индукцией апоптоза. Мы исследовали механизмы активации транскрипционного фактора NF-kB ингибиторами HDAC и показали, что при этом происходит уменьшение содержания ингибитора NF-kB — белка IκB. Методом иммунопреципитации и последующего иммуноблоттинга мы установили, что бутират натрия вызывает уменьшение комплексообразования между транскрипционным фактором NF-kB и его ингибитором IκB. Инактивация ингибитора IκB и уменьшение его взаимодействия с NF-kB демаскируют последовательность ядерной локализации (NLS) белка p65/RelA, в результате чего происходит его транслокация в ядро. Иммунофлуоресцентный анализ показал, что при обработке трансформантов E1A + Ras бутиратом натрия происходит накопление транскрипционного фактора NF-kB в ядре. Уровень активности люциферазного репортера под контролем NF-kB-респонсивного элемента (3xNF-kB-luc) существенно возрастает в клетках, обработанных бутиратом натрия. Таким образом, мы показали, что ингибитор HDAC бутират натрия активирует NF-kB-регулируемые промоторы в эмбриональных фибробластах мыши, трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras, причем это происходит благодаря уменьшению содержания ингибитора IκB и накоплению свободного транскрипционного фактора NF-kB в ядре. Активация NF-kB коррелирует с увеличением содержания фосфорилированной (активной) формы киназы Akt-1 и снижением уровня апоптоза в E1A + Ras-трансформированных клетках при действии ингибиторов HDAC.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49058) и С.-Петербургского научного центра РАН.

ЭНДОГЕННЫЙ БЕЛОК TRPC3 УЧАСТВУЕТ В ФОРМИРОВАНИИ СТРУКТУРЫ НАТИВНЫХ ДЕПОУПРАВЛЯЕМЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ A431.  
 © О. А. Зимица, Л. Н. Глушанкова, А. Ю. Скопин, В. В. Бугай, В. А. Алексеенко, Е. В. Казначеева, Г. Н. Можяева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Активация рецепторов плазматической мембраны, сопряженных с фосфолипазой C, инициирует каскад событий, приводящих к высвобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из кальциевых депо и последующему входу  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматическую мембрану. В этом случае вход  $\text{Ca}^{2+}$  опосредуется ионными каналами, известными как депоуправляемые каналы (store-operated channels —  $I_{\text{SOC}}$ ). Несмотря на интенсивные исследования, их молекулярная природа остается неизвестной. Члены неоднородного семейства белков TRP являются наиболее вероятными кандидатами на роль  $I_{\text{SOC}}$ -каналов или их субъединиц. С использованием метода коротких интерферирующих РНК (siRNA) была получена стабильная линия клеток A431 с подавленной экспрессией белка TRPC3. Измерения внутриклеточной концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  с помощью флуоресцентных кальций-чувствительных зондов показали, что подавление экспрессии белка TRPC3 значительно уменьшает депоуправляемый вход кальция в клетках A431. Исследование свойств кальцийпереносящих каналов в модифицированной линии клеток A431 показало, что набор каналов по сравнению с контрольными клетками A431 значительно изменен.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной по программе РАН «Молекулярная и клеточная биология», по программе поддержки ведущих научных школ (НШ-4904.2006.4) и Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 04-04-49053 и 04-04-49057).

**СТРЕСС-КИНАЗА p38 $\alpha$  НЕ ЯВЛЯЕТСЯ НЕОБХОДИМОЙ ДЛЯ АКТИВАЦИИ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ МЫШИ.** © Ю. Г. Зубова, Т. В. Быкова, С. Г. Зубова, В. С. Романов, Н. Д. Аксенов, В. А. Поспелов, Т. В. Постелова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и С.-Петербургский государственный университет, jul\_zubova@mail333.com.

Ускоренное клеточное старение является ключевой программой, препятствующей размножению клеток с нарушенной пролиферативной программой. Старение связано с необратимой остановкой клеток в цикле, многочисленными морфологическими изменениями и экспрессией маркера старения — SA- $\beta$ -галактозидазы. Недавно было показано, что ускоренное старение может быть индуцировано как в нормальных, так и в опухолевых клетках с помощью цитостатиков-интеркаляторов, ингибиторов гистоновых деацетилаз и ретиноидов. Ранее мы обнаружили, что эмбриональные фибробласты крысы, трансформированные онкогенами E1A и cHa-ras, неспособные останавливаться в цикле после действия повреждающих агентов, при действии ингибитора гистоновых деацетилаз бутирата натрия останавливаются в цикле и стареют, причем этот процесс сопровождается накоплением активных форм стресс-киназы p38 $\alpha$ . Согласно многочисленным литературным данным, индуцированное ускоренное старение в опухолевых клетках человека также невозможно без активации стресс-киназы p38 $\alpha$ . В связи с этим целью исследования было изучение роли киназы p38 $\alpha$  в реализации программы ускоренного старения при действии ингибитора гистоновых деацетилаз бутирата натрия. Для этой цели были получены трансформанты E1A + cHa-ras из эмбриональных фибробла-

стов мыши, нокаутной по стресс-киназе p38 $\alpha$  (MErasp38 $^{-/-}$ ). Методом проточной цитометрии было показано, что при действии бутирата натрия трансформанты MErasp38 $^{-/-}$  способны необратимо останавливаться на границе фаз G<sub>1</sub>/S, так как после отмывки бутирата они не способны входить в фазу репликации ДНК. Бутират вызывает распластывание клеток на субстрате и перестройки актинового цитоскелета, экспрессию галактозидазы SA- $\beta$  и накопление в ядрах гетерохроматиновых образований, выявляемых после окрашивания клеток ДНК-интеркалятором DAPI. Полученные данные позволяют предполагать, что в трансформированных клетках преждевременное старение, индуцированное бутиратом натрия, может развиваться в отсутствие стресс-киназы p38 $\alpha$ , через альтернативные пути негативной регуляции клеточного цикла.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-49766 и 06-04-49058).

**СТРЕССОВЫЕ ГРАНУЛЫ И ЦИТОСКЕЛЕТ. СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЕ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ СТРЕССОВЫХ ГРАНУЛ У ВЫСШИХ И НИЗШИХ ЭУКАРИОТ.** © П. А. Иванов,<sup>1</sup> Й. Гашек,<sup>2</sup> Е. С. Надеждина.<sup>1,3</sup> <sup>1</sup>НИИ физико-химической биологии Московского государственного университета, ivanovpa@mail.ru, <sup>2</sup>Институт микробиологии Чешской академии наук, Прага, и <sup>3</sup>Институт белка РАН, Пущино.

В результате различных неблагоприятных воздействий в цитоплазме клеток высших эукариот и дрожжей происходит быстрое появление плотных образований, называемых стрессовыми гранулами. Стрессовые гранулы представляют собой локальные скопления мРНК, некоторых факторов инициации трансляции и РНК-связывающих белков. Ранее нами было показано, что разрушение микротрубочек, но не актиновых филаментов ингибирует формирование стрессовых гранул в культивируемых клетках CV-1, Vero и HeLa (Ivanov et al., 2003). Наиболее вероятно, что роль микротрубочек в процессе образования стрессовых гранул заключается в транспорте компонентов стрессовых гранул по цитоплазме. В настоящей работе мы попытались проверить связь с микротрубочками и микротрубочковыми моторами уже сформированных стрессовых гранул в клетках млекопитающих, а также установить участие цитоскелета в формировании стрессовых гранул в клетках дрожжей. Указанием на активный транспорт по микротрубочкам может служить наличие в составе стрессовых гранул микротрубочковых моторных белков. Методом иммунофлуоресцентного окрашивания мы показали, что в подвергнутых окислительному стрессу клетках HeLa тяжёлая цепь динеина концентрируется в стрессовых гранулах. При этом в стрессовых гранулах отсутствуют динактиновый комплекс и кинезин-I; во всяком случае, их концентрация не превышает таковую в цитозоле. Для прижизненного наблюдения за поведением стрессовых гранул клетки трансфицировали вектором pEGFP со встройкой кДНК полиА-связывающего белка (PABP), одного из компонентов стрессовых гранул. При окислительном стрессе в клетках образовывались стрессовые гранулы, содержащие зелёный флуоресцентный белок, слитый с GFP. Мы наблюдали быстрые, хотя и хаотиче-

ские, перемещения стрессовых гранул по цитоплазме. В отдельных случаях скорость перемещения достигала 0.5 мкм в 1 с. Исходя из больших размеров стрессовых гранул и скоростей перемещения по цитоплазме можно с достоверностью предполагать, что эти перемещения осуществляются за счет активного транспорта. Перемещения стрессовых гранул в цитоплазме практически полностью блокируются при разрушении микротрубочек, что указывает на роль именно микротрубочковых моторов в движении стрессовых гранул. Один из нас (Гашек, не опубликовано) обнаружил, что в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при тепловом шоке образуются стрессовые гранулы, сходные по составу со стрессовыми гранулами млекопитающих. Мы проверили влияние веществ, вызывающих деполимеризацию микротрубочек или актиновых филаментов, на образование стрессовых гранул в дрожжах. Оказалось, что в дрожжевых клетках деполимеризация либо актиновых филаментов, либо микротрубочек не влияет на образование стрессовых гранул. Однако при одновременном разрушении и актиновых филаментов, и микротрубочек мы наблюдали значительное ингибирование образования стрессовых гранул. Возможно, что и в клетках дрожжей для формирования стрессовых гранул также необходимы элементы цитоскелета. Однако в отличие от клеток высших эукариот возможно замещение актина на микротрубочки (и наоборот) в этом процессе.

Работа выполнена при финансовой поддержке в виде гранта Президента РФ для поддержки молодых кандидатов наук, гранта президиума РАН по программе «Молекулярная и клеточная биология» и гранта INTAS по программе поддержки молодых ученых.

**МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ШАПЕРОНА БТШ70 В НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ НА ПРИМЕРЕ ХОРЕИ ГЕНТИНГТОНА.** © М. В. Инополитова, О. В. Москалева, Б. А. Маргулис, И. В. Гужова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [guzhova@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:guzhova@mail.cytspb.rssi.ru).

Белки теплового шока играют важную роль в защите клеток при действии различных повреждающих факторов. Защитное действие БТШ70, наиболее изученного представителя белков теплового шока, было показано в клеточных и животных моделях различных нейродегенеративных заболеваний, в частности заболеваний, связанных с накоплением белков с длинными полиглутаминовыми последовательностями, например хорей Гентингтона. Это заболевание вызывается мутацией элонгации триплета, кодирующего глутамин, в N-концевой части молекулы хантингтина, что приводит к формированию внутриклеточных нерастворимых агрегатов мутантного белка и развитию апоптоза в нейронах определенных зон мозга. БТШ70 способен замедлять процесс формирования высокомолекулярных агрегатов и способствовать выживанию клеток. Известно, что БТШ70 присутствует в агрегатах и может взаимодействовать с мутантным белком. Однако механизмы защитного действия БТШ70 недостаточно изучены. Формирование агрегатов мутантного белка можно объяснить ковалентным взаимодействием глутаминов с клеточными белками-донорами лизина под действием фермента транслглютаминазы, активность которого повышена в зонах мозга, подверженных

заболеванию. На роль такого донора лизина предлагают фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (ГАФДГ). Было показано, что этот фермент может специфически взаимодействовать с хантингтином и способствовать образованию высокомолекулярных агрегатов. Кроме того, БТШ70 также может специфически взаимодействовать с ГАФДГ. Можно предположить, что механизм защитного действия БТШ70 заключается в том, что он, взаимодействуя с ГАФДГ, препятствует его связи с полиглутаминовой цепью мутантного хантингтина и замедляет процесс формирования нерастворимых агрегатов. Целью настоящего исследования является выяснение механизмов защитного действия БТШ70 при нейродегенеративных заболеваниях на примере хорей Гентингтона. Исследование проводится на клеточной модели хорей Гентингтона с использованием временной трансфекции плазмидой, кодирующей мутантный белок. В исследовании используется стабильная индуцибельная клеточная линия на базе клеток нейробластомы SK-N-SH, содержащая ген *BTSH70*. Было показано, что БТШ70 способен подавлять образование внутриклеточных агрегатов мутантного хантингтина, причем этот эффект носит дозозависимый характер, т. е. в клетках с индуцированной экспрессией БТШ70 процент высокомолекулярных агрегатов, а также средний размер агрегатов, образованных мутантным хантингтином, значительно ниже, чем в клетках с низким содержанием БТШ70. Было показано, что БТШ70 и ГАФДГ колокализуются в клетках нейробластомы человека при котрансфекции этих белков. Специфическое взаимодействие данных белков было подтверждено методом реципрокной коиммунопреципитации в клетках нейробластомы после индукции БТШ70. Также при помощи конфокальной микроскопии было показано, что БТШ70 и ГАФДГ колокализуются с нерастворимыми внутриклеточными агрегатами, образованными фрагментами мутантного хантингтина. Используя модификацию метода ДСН-ПААГ ЭФ для анализа ДСН-нерастворимой клеточной фракции (Electrophoretic retardation), мы показали, что под действием увеличения содержания БТШ70 в клетках, в клетке уменьшается доля ГАФДГ, находящегося в комплексе с нерастворимыми агрегатами мутантного хантингтина. Это подтверждает гипотезу о ключевой роли взаимодействия БТШ70 и ГАФДГ в предотвращении процесса агрегации за счет БТШ70.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 04-04-49237) и по программе РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТРОФОБЛАСТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОЛОНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ БЛАСТОЦИСТ МЫШИ.** © И. В. Капралова, Л. М. Межевскикина. Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Московская обл., Институтская ул., 3, [irina.kapralova@yahoo.com](mailto:irina.kapralova@yahoo.com).

Стабильные культуры эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) в основном получают из ранних зародышей на стадии бластоцисты. Мы исследовали возможность получения ЭСК из интактных бластоцист мыши после их инкубирования в среде с рекомбинантным цитокином LIF (leukemia inhibitory factor). В качестве контроля были использованы бластоцисты, развитие которых

проходило в среде без добавления LIF. Бластисты выделяли в середине 4-х сут беременности после естественного спаривания мышей без предварительной гормональной обработки. Всего были использованы 352 бластоцисты, длительность культивирования составляла 8 сут. Через каждые 24 ч подсчитывали число клеток трофобласта и внутренней клеточной массы, оценивали адгезивные свойства, способность бластоцист выходить из зона *pellucida* и формировать колонии ЭСК, а также активность эндогенной щелочной фосфатазы — тест на плюрипотентность клеток. Было выявлено положительное влияние LIF на бластоцисты мыши в концентрации 10 нг/мл, которую обычно используют в средах для культивирования ЭСК. Этот цитокин способствует увеличению числа клеток трофобласта и адгезии после выхода бластоцист из *z. pellucida*. Благоприятное действие LIF связано прежде всего с повышением функциональной и пролиферативной активности трофобласта, особенно в течение первых 48 ч культивирования бластоцист, когда происходит выход из *z. pellucida* и начинается формирование плюрипотентных колоний ЭСК из клеток внутренней клеточной массы. Полагаем, что активность трофобласта крайне важна для создания в условиях культуры *in vitro* монослоя для обеспечения фидерных функций и более тесных межклеточных взаимодействий с колониями ЭСК. Рекомбинантный LIF необходим для зародышей мыши в качестве фактора, стимулирующего процессы имплантационного развития, а также на этапе выделения ЭСК из бластоцист.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49521а).

**ТИПЫ ОРГАНОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ЗАРОДЫШЕВОГО КАЛЛУСА ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ.** © А. А. Катасонова,<sup>1</sup> И. Ф. Шаяхметов.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Институт биологии Уфимского научного центра РАН, aneteka@rambler.ru, и <sup>2</sup> Башкирский государственный университет, Уфа.

Органогенез в каллусной культуре *in vitro* включает в себя процессы образования либо корней, либо побегов, либо корней и побегов одновременно. Цель исследования — выяснить типы органогенеза в каллусах, полученных из незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы, в культуре *in vitro*. Эксплантатами для получения каллусов послужили незрелые зародыши яровой мягкой пшеницы сорта Симбирка, инокулированные на 15—17-е сут после опыления. Незрелые зародыши вычленили в стерильных условиях и перенесли на питательную среду MS (Murashige, Skoog, 1962), дополненную 2.0 мг/л 2,4-Д и 0.2 мг/л кинетин (Шаяхметов, 2001). Инкубацию зародышей проводили при 26° С в темноте. По внешнему виду полученная каллусная ткань представляла собой компактное блестящее образование бледно-желтого цвета. Для индукции органогенеза каллусы пассировали на исходную питательную среду MS без 2,4-Д и культивировали при 26° С на свету. Через 20 сут производили визуальную количественную оценку органов, по которым выделяли тип органогенеза. Установлено, что в 30.3 % случаев морфологически наблюдалось образование побегов, в 2.2 % — образование корней, в 43.5 % — образование как побегов, так и корней. В

24.0 % случаев образования корней или побегов не наблюдалось. Таким образом, в каллусах, полученных из незрелых зародышей пшеницы, введенных в культуру на одной стадии развития и культивируемых на одной питательной среде, либо индуцировались различные типы органогенеза, либо последний не наблюдался. Одна из возможных причин этого явления — неоднородность каллуса, который состоит из групп клеток, реализующих морфогенетические потенции различными путями (Батыгина, 1987). Важную роль играют связи между группами клеток в каллусе, что в свою очередь обусловлено их формой и размером. Вероятно, немаловажную роль играет зависимость эффекта, вызываемого гормонами, от физиологической характеристики клеток-мишеней.

**КУЛЬТУРЫ СТВОЛОВЫХ/ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК МОЗГА ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА.** © З. Б. Квачева, В. И. Вотяков, Л. П. Тутов, С. В. Корень, Л. А. Хватова, Ю. А. Кабанова, Е. Н. Романюк. ГУ Научно-исследовательский институт микробиологии и эпидемиологии, Минск.

В настоящее время установленным фактом является существование нейральных стволовых/прогениторных клеток (СПК) в субвентрикулярной и вентрикулярной зонах головного мозга и гиппокампе, обонятельной луковице и других областях мозга человека. Согласно современным представлениям, нейральные СПК служат для поддержания гомеостаза и регуляции репаративных процессов в ЦНС. Эти клетки обладают способностью к самовозобновлению и мультипотентностью — дифференцируются в нейроны, астроциты и олигодендроциты. Нейральные предшественники, наращиваемые *in vitro*, могут представлять собой один из источников клеток в клинической трансплантологии, при разработке новых подходов для лечения различных нейродегенеративных заболеваний. Сегодня выделение СПК из нейрогенных областей головного мозга взрослого человека и приготовление из них культур представляют определенные трудности ввиду недостаточной изученности их биологических свойств. Отсутствуют единые протоколы их выделения и культивирования для наращивания клеточной биомассы. Цель работы — установление условий выделения СПК мозга взрослого человека, подбор состава ростовой среды, вида и концентрации ростовых факторов и других компонентов для их длительного культивирования. Клетки выделяли из хирургических биоптатов мозга (кора больших полушарий) оперированных людей в возрасте 25 и 30 лет. Ткань мозга подвергали механической дезагрегации и обработке растворами трипсина и коллагеназы типа 1 (1 : 1). Приготовленную клеточную суспензию в ростовой среде помещали в пластиковые культуральные флаконы, обработанные антиадгезивным покрытием. В течение 5—14 сут культивирования в термостате при 37° С наблюдали формирование и рост клеточных кластеров в виде нейросфер. Исследовали влияние на пролиферативную активность клеток в нейросферах различных вариантов ростовых сред, в состав которых входили среды ДМЕМ, МЕМ и F-10 с добавками ростовых факторов и без таковых. Установлено, что добавление в смесь питательных сред (ДМЕМ + F-10) двух ростовых факторов — FGF-b и hEGF — и гепарина обуславливает лучшую генерацию нейросфер и наращивание в них клеток, что согласуется

с данными некоторых исследователей, которые для культивирования нейральных СПК людей и животных не используют фактор, препятствующий спонтанной дифференцировке клеток, — LIF. Этот фактор более необходим для роста СПК, полученных из эмбриональной и фетальной тканей. Морфологический анализ нейросфер выявил их гетерогенность и полиморфизм. Спонтанную дифференцировку и гибель клеток предотвращали вторичным диспергированием агрегатов и переносом клеток в новые флаконы. При длительном культивировании (3—4 пассажа) наблюдали отпочковывание новых клонов из нейросфер, а не только рост клонов за счет экспансии по периферии слоев прогениторных клеток. Фенотипирование клеток в нейросферах проводили непрямым методом флуоресцирующих антител при переводе культур из суспензионного культивирования в монослойное. Получены данные, свидетельствующие о наличии в нейросферах нестин-положительных клеток (стволовых клеток), MAP-2-положительных клеток (предшественников нейронов) и клеток, несущих маркер O4 незрелых олигодендроцитов, а также ГФКБ-положительных клеток (астроцитов). Полученные нами результаты по идентификации клеток из нейросфер подтверждают тот факт, что продуцируемые в культуре структуры являются истинными нейросферами — клонами СПК, описываемыми другими исследователями, а подобранные нами условия их роста обеспечивают их продукцию.

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ФАКТОРА РОСТА СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ (VEGF) И ЕГО РЕЦЕПТОРОВ В КЛЕТКАХ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ МЫШИ.** © *Е. П. Киселева, А. В. Крылов, О. И. Степанова, В. И. Людыно.* Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург.

Несмотря на достигнутые успехи в изучении взаимоотношений опухоли и организма, лечение онкологических заболеваний человека остается одной из актуальных проблем современной медицины. Новое направление биотерапии злокачественных заболеваний заключается в применении антиангиогенных препаратов, блокирующих в организме действие факторов, стимулирующих рост опухолевых сосудов, в частности фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF). Однако действие этого фактора не ограничивается только ангиогенным эффектом. В работе, проведенной нами совместно с американскими исследователями, было впервые показано, что VEGF может оказывать иммунодепрессивное влияние на организм и вызывать инволюцию тимуса (Ohm et al., 2003). Для выяснения механизма действия VEGF на иммунокомпетентные клетки нами была изучена экспрессия генов рецепторов VEGF в клетках иммунной системы. Ранее было известно, что моноциты крови человека имеют рецептор VEGF первого типа (VEGFR-1), но сведения в отношении других клеток иммунной системы отсутствовали (Barleon et al., 1996). Экспрессию мРНК рецепторов VEGF (VEGFR-1 и VEGFR-2) изучали в тимocyтах, лимфоцитах лимфоузлов и перитонеальных макрофагах интактных мышей с помощью реакции обратной транскрипции (ОТ) с последующей ПЦР. Суммарную РНК в количестве 2 мкг использовали для ОТ, которую проводили в присутствии олиго(дТ)15-праймеров и обратной транскриптазы M-MLV (Promega) в соот-

ветствии с протоколом производителя. ПЦР проводили с использованием специфических праймеров, подобранных таким образом, чтобы длина продукта при прохождении реакции на кДНК и ядерной ДНК была различной. Использованные праймеры для VEGFR-1 (Flt-1) — прямой 5'-gaagcggttcacstggactgagacc-3' и обратный 5'-ggctttgctgggggattctctaa-3' (размер продукта 432 пары нуклеотидов — п. н.). Использованные праймеры для VEGFR2 (KDR/Flk-1) — прямой 5'-acagacagtgggatgctccttgcacat-3' и обратный 5'-aaacaggaggtgagctgcagtggtg-3' (272 п. н.). Уровень экспрессии мРНК β-актина определяли для контроля эффективности прохождения ОТ и использовали в качестве внутреннего стандарта. Кроме того, в клетках исследовали также экспрессию мРНК VEGF с помощью прямого (5'-gacctggcttactgctgta-3') и обратного (5'-gtgagggttgatccgcatgat-3') праймеров, являющихся общими для всех изоформ VEGF (297 п. н.). Результаты визуализировали при помощи электрофореза в геле, окрашенном бромистым этидием. В результате проведенных исследований установлено, что тимocyты экспрессируют мРНК VEGFR-2, а лимфоциты лимфоузлов и перитонеальные макрофаги — мРНК обоих рецепторов (VEGFR-1 и VEGFR-2). Кроме того, оказалось, что все исследованные нами клетки обладают способностью синтезировать VEGF, так как в них была экспрессирована мРНК этого фактора. Таким образом, нами впервые показано, что клетки иммунной системы, в том числе тимocyты, конститутивно синтезируют и сам VEGF, и рецепторы к нему. При инкубации перитонеальных макрофагов в течение 24 ч в присутствии 50 нг/мл рекомбинантного препарата VEGF экспрессия мРНК собственной молекулы возрастала в 1.3 раза, экспрессия мРНК VEGFR-1 — в 2 раза, а VEGFR-2 — в 1.8 раза по сравнению с контролем. Полученные данные позволяют предполагать, что VEGF играет важную, но в настоящее время неизвестную и новую для нашего понимания роль в отношении иммунной системы. Описанная ранее функция VEGF как хемоаттрактанта для моноцитов крови явно недостаточна и не объясняет наличия активированных генов как самого фактора, так и его рецепторов в клетках иммунной системы в отсутствие в организме активного ангиогенеза или воспаления. Мы предполагаем, что VEGF может играть важную роль в выходе лимфоцитов и макрофагов из тканей и поддержании их нормальной рециркуляции в организме.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48250).

**ПОДАВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЦЕНТРОСОМЫ ПРИ ИНДУКЦИИ ЭРИТРОИДНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ K562.** © *О. П. Кисурнина-Евсеньева, А. В. Тишкова, Г. Е. Онищенко.* Кафедра клеточной биологии и гистологии Московского государственного университета.

Центросома является центром организации микротрубочек в животных клетках. Контролируя полярность микротрубочек, их число и распределение, эта органелла координирует разнообразные процессы, в том числе и дифференцировку клеток. Особый интерес вызывают исследования патологических нарушений в структуре и активности центросомы при опухолевом росте. Химиче-

ская индукция дифференцировки является одним из способов прекращения опухолевого роста. Сравнение последовательности изменений в состоянии centrosомы при индукции эритроидной дифференцировки в культуре опухолевых клеток с тем, что происходит при нормальном эритропоэзе *in vivo*, может способствовать пониманию степени нормализации дифференцированного фенотипа клеток при химической терапии опухолевого роста. Дифференцировку клеток культуры K562 (эритромиелобластоз человека) индуцировали воздействием тимидина (2 мМ, 3 сут) и ДМСО (диметилсульфоксид, 1 %, 11 сут). В работе было проведено изучение состояния centrosомы на световом и ультраструктурном уровнях. Было показано, что оба агента вызывают снижение митотического индекса и остановку в прохождении клеточного цикла. Иммуноцитохимическое окрашивание антителами у альфа-тубулина показало, что при индукции дифференцировки клеток K562 существенно снижается активность centrosомы в качестве центра организации микротрубочек. Электронно-микроскопические исследования выявили уменьшение перичентриолярного материала и числа отходящих от центриолей микротрубочек. Происходит перемещение аппарата Гольджи на периферию клетки и увеличение протяженности каналов гранулярного эндоплазматического ретикула. Эти изменения могут свидетельствовать о частичной инактивации centrosомы и нарушении процессов везикулярного транспорта, обеспечиваемого системой микротрубочек. Сходные изменения происходят и при эритроидной дифференцировке *in vivo*. Известно, что дифференцировка многих типов клеток, в том числе и эритроцитов, связана с активацией ряда каспаз — ферментов, участвующих и в апоптотической гибели клеток. Для выяснения роли этих ферментов в механизмах химически индуцированной дифференцировки клеток K562 нами был использован панкаспазный ингибитор zVAD-fmk в концентрации 25 мМ. Интересно отметить, что само по себе воздействие zVAD-fmk не вызывает уменьшения доли гибнущих клеток, но не приводит к снижению митотического индекса. На ультраструктурном уровне обнаруживается, что при действии только zVAD-fmk centrosома имеет те же черты строения, что и в контроле, но происходит увеличение лизосомного компартмента. При совместном воздействии ДМСО и zVAD-fmk наблюдается восстановление организации клеточного центра и активности centrosомы, что свидетельствует об участии каспаз в процессе дифференцировки клеток K562. Таким образом, химически индуцированная дифференцировка клеток K562 включает активацию каспаз и сопровождается инактивацией centrosомы, аналогичной той, которая происходит при эритроидной дифференцировке *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-49248) и по аналитической ведомственной целевой программе «Развитие научного потенциала высшей школы (2006—2008 гг.)» (проект РНП.2.1.1.7842).

НОВЫЕ СВОЙСТВА ИММУНОАКТИВНЫХ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДЕФЕНСИНОВ. © З. В. Ковалева,<sup>1</sup> В. П. Иванова,<sup>2</sup> Т. М. Гринчук.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН и <sup>2</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, Санкт-Петербург, valet@iephb.ru.

Ранее нами были выявлены иммуноактивные олигопептиды FGER и GERA — фрагменты 12—15 и 13—16 дефенсинов кролика и человека, регулирующие как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. Оба пептида активируют у Т-лимфоцитов человека процессы индукции CD2-антигена, который, как известно, относится к суперсемейству адгезивных молекул иммуноглобулинового гена и играет важную роль в ускорении адгезии между Т-лимфоцитами и другими иммунокомпетентными клетками. В связи с этим было высказано предположение о том, что дефенсиновые фрагменты могут влиять и на адгезивные свойства других типов клеток. В опытах использовали линию эпителиоподобных клеток СНО-К1. Клетки ( $10^6$  в 1 мл) инкубировали в среде ДМЕМ/F12 без сыворотки с разными концентрациями пептидов (от  $10^{-10}$  до  $10^{-4}$  М) или без них 30 мин при 37 °С, затем после добавления КРС клеточную суспензию переносили в планшет (необработанный или обработанный фибронектином) и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 1 ч. Адгезированные клетки окрашивали в 0.3%-ном растворе кристаллического фиолетового. Связанный краситель экстрагировали и измеряли оптическую плотность полученных экстрактов при 570 нм. Установлено, что оба пептида увеличивают адгезию клеток СНО к пластиковой поверхности. Выявленный эффект может быть связан с активацией пептидами адгезивных рецепторов — интегринов. Как известно, одним из наиболее распространенных белков внеклеточного матрикса является гликопротеин фибронектин, непосредственно участвующий в процессах адгезии и миграции клеток. В связи с этим нас интересовало, изменится ли степень адгезии клеток СНО к иммобилизованному фибронектину после предварительной обработки клеток пептидными фрагментами, и если изменится, то в какой мере. Обнаружено, что прединкубация клеток с исследованными пептидами приводит к ингибированию адгезии этих клеток к фибронектину. В ходе адгезии клеток к фибронектину активируются интегриновые рецепторы, для которых лигандом является именно этот белок внеклеточного матрикса. Поскольку в данном случае не выявлено четкой дозозависимости между эффектом ингибирования адгезии клеток, предварительно обработанных синтетическими пептидами, к иммобилизованному фибронектину и концентрацией этих пептидов в среде инкубации, можно утверждать, что изученные пептиды полностью не блокируют участки связывания интегринов с фибронектином. Возможно, исследованные пептиды связываются с иными участками молекулы интегриновых рецепторов. Не исключается также возможность активации пептидами интегриновых молекул через ускорение конформационных переходов рецепторных молекул в высокоаффинное состояние или процессов кластеризации интегриновых молекул, что приводит к стимуляции процессов образования фокальных контактов и в конечном счете к усилению клеточной адгезии.

РОЛЬ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 70 кДа В МОДУЛЯЦИИ ПРОТИВО-ОПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА. © Е. Ю. Комарова, О. В. Колупаев, И. В. Гужова, Б. А. Маргулис. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Белок теплового шока Hsp70 может постоянно синтезироваться опухолевыми клетками большого количе-

ства типов, включая клетки миелоидной лейкемии, и даже может служить диагностическим маркером для определения степени злокачественности опухоли. С одной стороны, повышенное содержание шаперона в злокачественных новообразованиях приводит к тому, что опухоль становится устойчивой к противоопухолевой терапии, а с другой — были получены интересные данные, указывающие на то, что шаперонная активность Hsp70 может стимулировать противоопухолевый ответ иммунной системы. Несколько лет тому назад появились сведения о том, что Hsp70, ранее считавшийся исключительно цитоплазматическим белком, может выходить во внеклеточное пространство и приобретать свойства «сигнала опасности», мобилизирующего иммунную и эндокринную системы. В начале 1990-х годов было убедительно показано, что Hsp70 может также выходить на поверхность раковых клеток с образованием комплексов с опухолевыми антигенами, причем такие комплексы являются мишенью для клеток иммунной системы. Целью нашей работы было изучение роли Hsp70 в модуляции иммунного ответа, направленного против опухолевых клеток. В качестве модели исследования были выбраны три линии клеток: линия U-937 (лимфома человека), линия HL-60 (промиелоидная лейкемия человека) и линия K-562 (эритроидная лейкемия человека), различающиеся по уровню базальной экспрессии Hsp70. В опытах с клетками лейкемии человека линии U-937, HL-60 и K-562 нами было установлено, что Hsp70, выделенный из мышцы быка и введенный в культуру, способен сначала покрывать клеточную поверхность, а затем проникать в клетки и накапливаться в цитоплазме. Этот вновь появившийся белок определяет на значимый период времени поведение клеток, снижает уровень пролиферации и даже вызывает экспрессию маркеров дифференцировки. Обработка опухолевых клеток различного происхождения очищенными Hsp70 также приводит к увеличению эффективности их распознавания цитотоксическими лимфоцитами в тесте CTL. Рост эффективности был пропорционален концентрации Hsp70 в культуральной среде и зависел от типа клеток-мишеней, различающихся по уровню содержания собственного Hsp70 и по способности к его накоплению. Полученные нами результаты интересны не только с точки зрения фундаментальной науки, но и значимы для поиска новых форм противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 04-04-49237) и по программе РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**ПОИСК МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ВЫЯСНЕНИЯ РОЛИ ТИРОЗИНКИНАЗЫ ИНТЕРНАЛИЗОВАННОГО РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (ЭФР) В РЕГУЛЯЦИИ ПОЗДНИХ СТАДИЙ ЭНДОЦИТОЗА.** © К. А. Кондратов, Н. А. Степаняни, А. П. Амосова, Е. С. Корнилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Связывание ЭФР со своим рецептором на плазматической мембране приводит к стимуляции рецепторной тирозинкиназы (ТК). Считается установленным, что активация ТК необходима как для инициации митогенного сигнала, так и для регуляции двух стадий эндоцитоза

ЭФР-рецепторных комплексов: интернализации и (в большей степени) сортировки рецепторов из ранних эндосом в поздние. Однако и после этого рецептор (Р) сохраняет свою тирозинкиназную активность вплоть до попадания в лизосомы. Физиологическое значение этого факта остается неизвестным. Для исследования роли рецептора ТК на поздних стадиях эндоцитоза был отработан методический подход с использованием AG1478 — специфического синтетического ингибитора активности тирозинкиназного рецептора ЭФР. Через определенное время после стимуляции эндоцитоза в клетках A431 неинтернализированный ЭФР удаляли с плазматической мембраны с помощью ацетатного буфера (рН 4.5), тем самым получая клетки, содержащие активированные ЭФР-Р только в эндосомах. Временной и концентрационный анализ показал, что AG1478 оказывает свое действие уже через 5 мин после добавления к клеткам. Фосфорилирование ЭФР-Р по тирозину падает более чем на 80 % по сравнению с контрольным уровнем при использовании концентраций AG1478 выше 250 нМ, но восстанавливается через 15 мин после удаления ингибитора. Использование AG1478 в концентрации выше 1 мкМ приводит к необратимому подавлению ТК-зависимого фосфорилирования рецептора. Таким образом, использование 5-минутной обработки клеток AG1478 в диапазоне концентраций 250—600 мкМ позволяет экспериментально манипулировать ТК-активностью рецептора в эндосомах. Используя этот подход, мы обнаружили, что постоянно активная ТК необходима для поддержания комплекса ЭФР-Р с убиквитин-лигазой c-Cbl.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49046).

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗА НА РОСТ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК СКОРЗОНЕРЫ *SKORZONERA HISPANICA* И АКТИВНОСТЬ ЯДЕРНОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I.** © Ю. М. Константинов,<sup>1</sup> К. З. Гамбург,<sup>2</sup> В. И. Тарасенко,<sup>1</sup> Л. И. Семенова,<sup>1</sup> В. Н. Шмаков,<sup>1</sup> С. Л. Гроховский,<sup>2</sup> А. Л. Жузе.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033, а/я 317, и <sup>2</sup> Институт молекулярной биологии РАН, Москва, yukon@sifibr.irk.ru.

ДНК-топоизомеразы относятся к числу важнейших ферментов метаболизма нуклеиновых кислот и участвуют в основных генетических процессах клетки, связанных с разделением цепей ДНК, таких как транскрипция, репликация, рекомбинация и репарация. До настоящего времени мало известно об особенностях биохимических характеристик этих ферментов у таких представителей эукариот, как растения, и их роли в процессах роста и деления растительных клеток. Суспензионная культура растительных клеток может служить перспективной модельной системой как 1) для изучения участия митохондриальной и ядерной ДНК-топоизомеразы I (Топо I) в биологических процессах эукариотической клетки, так и 2) для скрининга ингибиторов Топо I. Последнее тем более актуально, что ДНК-топоизомеразы являются первичными мишенями ряда соединений с противоопухолевым действием. Целью настоящей работы было изучение влияния двух ингибиторов Топо I, относящихся к классу

малобороздочных лигандов, — Хёхста 33258 (Ht-258) и Хёхста 33342 (Ht-342) — на рост суспензионной культуры клеток скорзонеры *Scorzonera hispanica* L. и активность Топо I ядерной и митохондриальной локализации. Известно, что Ht-342 обладает повышенной мембранной проницаемостью по сравнению с Ht-258. Культуру ткани скорзонеры поддерживали в конических колбах (250 мл, объем суспензии 60 мл) путем разбавления выросшей культуры свежей средой в 20 раз каждые 10—11 сут. Культивацию осуществляли при 26 °С в темноте на орбитальной качалке. Среда состояла из минеральных солей по Мурашиге и Скугу, сахарозы (2 %) и тиамин-НСI (1 мг/л). Влияние соединений на митотический индекс оценивали через 3—4 сут после пересева (логарифмическая фаза роста). Клетки фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты (3 : 1) 1 ч и окрашивали реактивом Шиффа. Митотический индекс определяли как число митотических фигур на 1000 клеток в трехкратной повторности. Определение активности Топо I осуществляли путем оценки релаксации суперспирализованной плазмидной ДНК с использованием анализа форм ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Красители Хёхст угнетали рост в концентрациях выше 10 мкМ с полной остановкой роста при 50 мкМ, причем Ht-342 действовал сильнее, чем Ht-258. Добавление этих веществ во время экспоненциального роста снижало митотический индекс уже через 3 ч после добавления. При сравнении влияния Ht-258 и Ht-342 на релаксацию ДНК топоизомеразы из ядер скорзонеры установлено, что 50%-ное ингибирование активности ядерного фермента наблюдалось уже в присутствии 2.5 мкМ Ht-342, тогда как Ht-258 вызывал аналогичный эффект только в концентрации 7.5 мкМ. Сходную чувствительность к ингибиторам проявляла и Топо I митохондрий. Представленные результаты показывают, что вещества, ингибирующие Топо I, угнетают рост культуры растительной ткани. Это угнетение связано с торможением деления клеток, о чем свидетельствуют данные по митотическому индексу. Влияние на митотический индекс обнаруживается уже в первые 3 ч. Тот факт, что Ht-342 был более активен в угнетении роста культуры и активности Топо I, позволяет предположить, что угнетение роста культуры обусловлено влиянием этих веществ на активность фермента. Интенсивный поиск соединений, действующих на ДНК-топоизомеразу, проводится в настоящее время в связи с возможностью их использования в качестве противоопухолевых и антимикробных препаратов. Можно предположить, что суспензионные культуры растительных клеток могут использоваться как дополнительный объект для скрининга этих веществ. Это подтверждается нашими данными по чрезвычайно высокой чувствительности культуры клеток скорзонеры к камптотецину, вызывавшему почти полное прекращение роста уже в концентрации 0.02 мкМ. К преимуществам культур растительных клеток можно отнести очень дешевую питательную среду, простой метод регистрации эффекта и минимальный расход изучаемых соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционного проекта СО РАН № 6.

**ВЛИЯНИЕ ИФН- $\alpha$  НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И СОЗРЕВАНИЕ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, ПРЕОБРАЗУЮЩИХСЯ В ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТ-**

КИ. © С. М. Космачева, С. В. Суренский, М. В. Белевцев, М. П. Потанин. ГУ РНПЦ гематологии и трансфузиологии и ГУ РНПЦ детской онкологии и гематологии, Минск.

Кроме стандартного метода получения дендритных клеток (ДК) из моноцитов (Мн) при их культивировании в присутствии IL-4 и GM-CSF, занимающего 8—9 сут, предлагаются методики более быстрого получения зрелых ДК. Показано, что ИФН- $\alpha$ , действующий как аналог естественных факторов, может индуцировать дифференцировку и созревание Мн с формированием потенциально антигенпрезентирующих клеток. Цель настоящей работы — оценить влияние ИФН- $\alpha$  на этапы дифференцировки и созревания моноцитов периферической крови при формировании дендритных клеток. Мн периферической крови получали из гепаринизированной венозной крови здоровых лиц адгезией на пластике. Прилипшие к пластике клетки инкубировали в полной питательной среде, содержащей GM-CSF (1000 МЕд/мл) и ИФН- $\alpha$  (1000 ЕД/мл). Для стимуляции Мн к дифференцировке использовали рекомбинантный человеческий GM-CSF (Leucotax, Novartis Pharma, Швейцария) и рекомбинантный ИФН- $\alpha$  («Intron A», Schering-Plough, США). Для индукции созревания ДК на 3—4-е сут в культуру дополнительно вносили липополисахарид (ЛПС) *E. coli* (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мкг/мл. Через 18—24 ч неприлипшие клетки собирали и концентрировали центрифугированием. Оценивали морфологию, фенотип (с использованием панели моноклональных антител CD45 FITC/CD14 PE, CD83 FITC, HLA-DR PE — Becton Dickinson, США) и функциональную активность клеток в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). Через 3 сут культивирования Мн в присутствии GM-CSF и ИФН- $\alpha$  была получена клеточная популяция, в которой 60 % клеток морфологически определялись как незрелые дендритные клетки — крупные не прилипающие к пластике клетки округлой или овальной формы с обильной цитоплазмой, но малоразвитыми отростками. На клетках, полученных в результате дифференцировки Мн под влиянием ИФН- $\alpha$  и стимулированных ЛПС (0.05—1.00 мкг/мл) в течение 24 ч, более заметно выражены цитоплазматические отростки, которые имеют самую различную форму. Ядро приобретает неправильную форму с многочисленными вдавлениями. Проведенный нами фенотипический анализ клеточных популяций показал, что у моноцитов, дифференцированных в ДК под влиянием ИФН- $\alpha$ , отмечаются высокая экспрессия антигенов CD14, HLA-DR и появление CD83, являющегося маркером активации и созревания ДК. Добавление к незрелым ДК ЛПС (1 мкг/мл) и дополнительное культивирование в течение 1—2 сут приводили к увеличению плотности экспрессии HLA-DR почти в 2 раза, резкой потере CD14, значительному увеличению клеток, экспрессирующих CD83-рецептор. Количество клеток, экспрессирующих маркер CD83, в большинстве экспериментов составляло 21—31 %. Была изучена способность полученных ДК усиливать пролиферацию обедненной моноцитам популяции аллогенных МПК. Наиболее сильное стимулирующее влияние на МПК ДК оказывают в соотношении 1 : 10, причем ДК, стимулированные ЛПС, проявляли большую активность по сравнению с нестимулированными клетками. Индексы стимуляции составили  $7.2 \pm 2.4$  и  $4.2 \pm 0.4$  соответственно. При соотношениях 1 : 100 и 1 : 1000 стимулирующая активность ДК снижается, и различия в активности клеток разной степени зрелости не от-

мечается. Индекс стимуляции (ИС) аллогенной СКЛ моноцитами в соотношении 1 : 10 составлял  $1.4 \pm 0.3$  и был ниже, чем ИС при таком же соотношении и стимуляции ДК, что свидетельствует о более высокой функциональной активности ДК. Таким образом, нами показано, что в присутствии ГМ-КСФ и ИФН- $\alpha$  в течение 3—4 сут происходят дифференцировка 60 % моноцитов периферической крови в незрелые ДК, что определяется морфологически, и созревание небольшого количества ДК, определяемых по маркеру CD83. Влияние ЛПС в течение 24 ч как дополнительного фактора созревания ДК после 3—4 сут предварительного культивирования в присутствии ГМ-КСФ и ИФН- $\alpha$  приводит к увеличению количества зрелых ДК. О наличии в популяции ДК зрелых клеток свидетельствует усиление пролиферативной активности СКЛ. Однако на большинстве ДК отмечается высокая экспрессия маркера CD14, что свидетельствует о неполной дифференцировке моноцитов в ДК под влиянием ИФН- $\alpha$ .

**УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ ПУТЕЙ МОРФОГЕНЕЗА IN VITRO КЛЕТОК КАЛЛУСОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.** © Н. Н. Круглова. Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Kругlova@anrb.ru.

Морфогенез растений как формообразовательный процесс различных структур, совершающийся на различных уровнях (Батыгина, 1987), вызывает большой интерес. Одно из перспективных направлений исследований — изучение морфогенеза в каллусе в контролируемых условиях *in vitro*. Каллус как гетерогенная интегрированная структура (система), образующаяся в результате пролиферации клеток на поверхности отдельных структур растительного организма, формирующаяся, как правило, из исходно разных клеток генеративных или вегетативных органов (Батыгина, 1987), представляет собой идеальную модельную систему для изучения как общих закономерностей, так и особенностей морфогенеза растений *in vitro*. Цель исследования состояла в выявлении путей морфогенеза *in vitro* клеток каллусов, различающихся по своему происхождению: каллус, полученный в культуре *in vitro* незрелого пыльника, и каллус, полученный в культуре *in vitro* незрелого зародыша. Объектом исследования послужили сорта и гибридные линии яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., которые, согласно предварительным данным, отличаются высокой частотой формирования морфогенных каллусов в культуре незрелых пыльников и в культуре незрелых зародышей. Предварительно было выявлено, что компетентный к формированию морфогенного каллуса незрелый пыльник должен находиться в стадии сильновакуолизированной микроспоры (Круглова и др., 2005), незрелый зародыш — в фазе органогенеза (Круглова, Сельдмирова, 2004). Морфогенные каллусы различного происхождения получали путем культивирования *in vitro* незрелых пыльников и незрелых зародышей на индукционной питательной среде, составленной на прописи Мурашиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962), при этом незрелые пыльники и незрелые зародыши культивировали до появления на их поверхностях хорошо развитых морфогенных каллусов. Методами световой и электронной микроскопии установлено, что морфогенный каллус обоих типов состоит из групп неоднородных клеток — меристематических и паренхиматозных. В то же время морфогенный каллус пыльникового происхождения бе-

рет начало от одной гаплоидной клетки — сильновакуолизированной микроспоры, тогда как морфогенный каллус зародышевого происхождения — от группы диплоидных клеток щитка незрелого зародыша. Методом иммуноферментного анализа растительных образцов (Кудоярова и др., 1986) в морфогенных каллусах обоих типов выявили содержание эндогенного ауксина ИУК и перенесли их на среду для регенерации, составленную на прописи Мурашиге и Скуга, в вариантах, различающихся концентрацией экзогенного ауксина ИУК. Методами световой и электронной микроскопии через 30—35 сут культивирования *in vitro* были выявлены следующие пути морфогенеза меристематических клеток каллусов обоих типов: эмбриоидогенез (соматический эмбриогенез), гемморизогенез, геммогенез, ризогенез и гистогенез. Установлено, что определяющую роль в индукции того или иного пути морфогенеза играл баланс между эндогенным содержанием ИУК (в составе морфогенного каллуса в момент инокуляции на среду для регенерации) и концентрацией экзогенной ИУК (в составе среды для регенерации). Таким образом, индукция определенного пути морфогенеза меристематических клеток морфогенного каллуса обоих изученных типов определяется соотношением между эндогенным содержанием ауксина ИУК в каллусе (внутренний сигнал) и экзогенной концентрацией этого ауксина в питательной среде (внешний сигнал). По-видимому, сама способность инициальных клеток к морфогенезу в системе любого каллуса зависит от их расположения в каллусе и от межклеточных взаимодействий (позиционный контроль). В целом полученные на примере морфогенных каллусов различного происхождения (гаплоидная сильновакуолизированная микроспора пыльника и диплоидные клетки щитка незрелого зародыша) экспериментальные данные подтверждают концепцию универсальности путей морфогенеза растений в естественных условиях и в условиях культуры *in vitro* (Батыгина, 1984, 1994, 2000).

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 05-04-97911 и 05-04-08114), по программе поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-4834.2006.4) и по Государственной научно-технической программе Республики Башкортостан «Воспроизводство биоресурсного потенциала РБ» (проект 3/3).

**АНДРОГЕНОНЕЗАВИСИМАЯ ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.** © А. В. Кузнецова,<sup>1</sup> Т. И. Данилова,<sup>1</sup> О. П. Попова,<sup>1</sup> П. В. Шегай,<sup>2</sup> А. А. Иванов,<sup>1</sup> Б. Я. Алексеев.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Научно-исследовательский институт молекулярной медицины Московской медицинской академии, avkuzn@mmascience.ru, и <sup>2</sup> Московский научно-исследовательский онкологический институт Минздравсоцразвития РФ.

Известно, что андрогены (тестостерон и 5 $\alpha$ -дигидротестостерон) контролируют развитие, дифференцировку и функцию добавочных желез мужской половой системы, в частности предстательной железы. Основное действие андрогенов направлено на регулирование экспрессии разнообразных генов клеток стромы и эпителия, ответственных за метаболизм, секрецию простат-специфических белков, факторов роста и пролиферацию клеток-

мишеней. Это действие осуществляется через андрогеновый рецептор (АР). Неактивированный АР присутствует в цитоплазме клеток в комплексе с белками теплового шока 90, 70, и 56 кДа, связь с которыми предупреждает активацию рецептора. Присоединение андрогенов ведет к диссоциации этого комплекса, димеризации АР и транслокации его в ядро, где запускается каскад реакций, приводящий к активации вышеописанных генов. Хотя роль андрогенов и АР в развитии, метастазировании и андрогенонезависимой прогрессии рака предстательной железы до конца не выяснена, наиболее распространенным подходом в лечении рака предстательной железы на сегодняшний день остается хирургическая и(или) лекарственная «кастрация». Антиандрогеновая терапия в короткие сроки индуцирует регрессию опухоли, однако в последующие годы у большинства больных наблюдается развитие более агрессивного андрогенонезависимого и метастазирующего рака предстательной железы. Целью исследования явилось изучение пролиферативной активности опухолевых клеток предстательной железы в первичной культуре. Смешанная первичная культура аденокарциномы предстательной железы получена из операционного клинического материала от больных со II ( $T_{2A}N_0M_0$ ) и III ( $pT_{3a}N_0M_0$ ) стадиями заболевания. Превалирующим гистологическим вариантом рака предстательной железы явилась мелкокацинлярная аденокарцинома с большим стромальным компонентом, отражающим стромальную гиперплазию. Пролиферативную активность клеток в культуре оценивали в условиях параллельного культивирования ткани одного и того же пациента с добавлением и без добавления в ростовую среду тестостерона. В результате изучения экспрессии АР на фоне присутствия тестостерона обнаружена довольно выраженная интенсивность иммунопероксидазной реакции с внутриядерной локализацией АР во всех клетках культуры на различных пассажах, свидетельствующая об активации АР. В среде без тестостерона наблюдалось слабое диффузное цитоплазматическое окрашивание неактивированного АР. При оценке пролиферативной активности (МТТ-тест) к 12-м сут в среде без тестостерона отмечалось резкое увеличение пролиферативной активности клеток по сравнению с клетками, культивируемыми в среде тестостероном. Полученные данные свидетельствуют о том, что пролиферация клеток не носит андрогенонезависимого характера, так как бурно развивается в отсутствие тестостерона. Возможно, в этом случае задействованы другие сигнальные пути.

**ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ХРОМАТИНА В ООЦИТАХ КОРОВ ПРИ ИХ СОЗРЕВАНИИ В РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.** © Т. И. Кузьмина. Всероссийской НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, prof.kouzmina@mail.ru.

Несмотря на значительные успехи клеточных технологий репродукции млекопитающих (оплодотворение *in vitro*, клонирование, трансгенез, трансплантация эмбрионов), отдельные их этапы требуют дальнейшего совершенствования. Особую значимость приобретают разработки, относящиеся к получению полноценных яйцеклеток как начального этапа всех вышеуказанных технологий. В настоящем исследовании на основе результатов сравнительного анализа различных систем культиви-

рования ооцитов мы попытались выявить оптимальные системы для дозревания яйцеклеток *in vitro* исходя из условий их созревания *in vivo*. Для этого мы использовали следующие модели: 1) ТС-199 + 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) + 15 мкг/мл ФСГ + 500 нг/мл эстрадиола 17- $\beta$ ; 2) ТС-199 + 10 % эстральной сыворотки коров; 3) ТС-199 + 50 % инактивированной жидкости овариальных фолликулов, выделенных из фолликулов диаметром 9 мм; 4) ТС-199 + 0.47 мг/мл белков фолликулярной жидкости (БФЖ) с мол. массой 65 кДа (Кузьмина и др., 1993); 5) ТС-199 + 10 % ФБС + клетки гранулы (2 · 10<sup>6</sup> клеток в 1 мл); 6) ТС-199 + 10 % ФБС + стенка половины неатретического фолликула диаметром 5 мм. Критерием эффективности модели культивирования служил один из маркеров созревания яйцеклетки — состояние хроматина (анализ стадий мейоза и хромосомные нарушения). Контроль за ядерным созреванием ооцитов позволяет в качестве одного из тестов использовать возможность оплодотворения ооцитов и получения полноценных эмбрионов. Всего прокультивировано и проанализировано 611 ооцитов, представлены данные экспериментов в трех повторностях. Для сравнения результатов созревания ооцитов в различных системах использовали критерий  $\chi^2$ , при этом был принят уровень значимости  $P < 0.05$ . Статистический анализ проводили на компьютере по программе SigmaStat. При экстракорпоральном созревании ооцитов отмечались дегенерации хромосом на всех стадиях мейоза. Так, при культивировании ооцитов в ТС-199 с 10 % ФБС и гормонами (группа 1) основная масса ооцитов с дегенерацией хромосом находилась на продвинутых стадиях мейоза (диакинез—метафаза II). Такие же данные получены при культивировании ооцитов в группах 2 (культивирование с 10%-ной эстральной сывороткой), 3 (среда культивирования — жидкость фолликулов 9 мм) и 4 (бессывороточное культивирование с белками фолликулярной жидкости с мол. массой 65 кДа). Среди ооцитов, прокультивированных в течение 24 ч с клетками гранулы (5-я группа) 6.06 % клеток имели дегенерированные хромосомы, из них 1.5 % — на стадии диакинеза, 1.5 % — на стадии метафазы I, 2.06 % — на стадии метафазы II. При введении в культуральную среду тканевой культуры фолликула (группа 6) 2.8 % ооцитов дегенерировали на стадии диакинеза и 2.8 % — на стадии метафазы II. Следует отметить, что в группах, где использовали клетки гранулы (группа 5), стенки фолликулов (группа 6), фолликулярную жидкость (группа 3) или ее белки (группа 4), не было выявлено нарушений на стадии анафазы. С учетом общего числа дегенераций на всех стадиях мейоза в этих же группах отмечен наименьший выход ооцитов с дегенерацией хроматина через 24 ч культивирования: в группе 4 (белки фолликулярной жидкости) — 9.2 % ( $P < 0.05$ ), в группе 5 (с клетками гранулы) — 6.06 % ( $P < 0.05$ ) и в группе 6 (с тканью фолликула) — 5.6 % ( $P < 0.01$ ). Итак, использование структурных элементов фолликула или продуктов их секреции (белки фолликулярной жидкости) в системах дозревания яйцеклеток *in vitro* способствовало снижению уровня ооцитов с нарушениями мейоза, что обуславливает перспективность использования этих моделей в технологии экстракорпорального дозревания яйцеклеток.

**ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ РАЗВИТИЯ МИКРОСПОР ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В КУЛЬТУ-**

PE IN VITRO. © П. А. Куксо. Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Kruglova@anrb.ru.

Андроклиния (по другой терминологии — андрогенез *in vitro*) — феномен образования растения-регенеранта из морфогенетически компетентной клетки пыльника в условиях культуры *in vitro* (Хохлов, 1976; Круглова и др., 2005). Как правило, компетентными в отношении образования растений-регенерантов у злаков являются сильновакуолизованные микроспоры. Явление андроклинии связано с переключением развития сильновакуолизованных микроспор с обычного для естественных условий гаметофитного пути на принципиально иной, спорофитный путь развития в условиях культуры. Методика отбора пыльников, содержащих сильновакуолизованные микроспоры, по морфологическим и фенотипическим признакам донорных растений хорошо отработана (Круглова, Батыгина, 2002). Однако возникает вопрос: все ли сильновакуолизованные микроспоры одного пыльника переключаются на спорофитный путь развития? Цель исследования состояла в цитологическом мониторинге развития сильновакуолизованных микроспор в культуре пыльников *in vitro*. Объектом исследования послужила гибридная линия яровой мягкой пшеницы Фотос, пыльники которой отличаются уникально высокой отзывчивостью на условия культивирования. Пыльники темпорально фиксировали с момента инокуляции на питательную среду Potato II через каждые 3 сут культуры в течение 30 сут эксперимента. В момент инокуляции в пыльниках отмечено абсолютное большинство сильновакуолизованных микроспор (95 %). Кроме того, в пыльниках имеется и незначительное количество (5 %) двухклеточных пыльцевых зерен, которые далее, к 15-м сут эксперимента, дают начало трехклеточным пыльцевым зернам, т. е. продолжают гаметофитное развитие. Цитологический анализ путей развития микроспор в культивируемых пыльниках показал следующее. Значительная часть микроспор уже на 3-и сут эксперимента переключала свой путь развития с гаметофитного на спорофитный. При этом отмечены два варианта. Часть микроспор (70 %) претерпевает аномальные симметричные митотические деления с формированием сначала двухклеточной структуры (3 сут эксперимента), а далее многоклеточной (12 сут эксперимента). Образование двух потенциально равных клеток связано с параллельным или произвольным положением веретена деления относительно оболочки микроспоры. Часть микроспор (25 %) делится с образованием двух равных ядер (3 сут эксперимента). Далее двуядерные клетки формируют сначала многоядерные структуры (6 сут эксперимента), а затем многоклеточные (9 сут эксперимента). Таким образом, в культивируемых пыльниках через 15 сут эксперимента отмечены многоклеточные структуры (единые клеточные группировки, располагающиеся в пределах растянувшейся оболочки микроспоры) тройственного происхождения. Дальнейшее развитие таких многоклеточных структур связано с формированием эмбриоидов (21 сут эксперимента) или каллусов (28 сут эксперимента) в зависимости от гормонального состава питательной среды. Часть микроспор (5 %) также в первые 3 сут культуры претерпевает нормальные для естественных условий асимметричные митотические деления с образованием генеративной и вегетативной клеток, тем самым продолжая развитие по гаметофитной программе с формированием двухклеточных

пыльцевых зерен. В ходе дальнейшего культивирования такие двухклеточные пыльцевые зерна останавливаются в своем развитии. В целом отмеченное разнообразие путей развития сильновакуолизованных микроспор в культивируемых пыльниках пшеницы определяется, на наш взгляд, асинхронностью прохождения ими клеточного цикла в момент инокуляции пыльников на питательную среду. С другой стороны, условия культуры *in vitro* дают возможность проявиться тем морфогенетическим потенциям, которые в скрытом виде имелись в микроспорах в естественных условиях. Иначе говоря, андроклинию следует рассматривать как процесс, который в условиях культуры *in vitro* только заканчивается, но закладывается он в естественных условиях. Культура *in vitro* выступает в роли важного инструмента для познания скрытых морфогенетических потенций клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-97911 и 05-04-08114).

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕПРЕССИЯ ПРОТООНКОГЕНА *c-fos* В E1A + cHa-ras-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ МОЖЕТ БЫТЬ СНЯТА ПОСЛЕ АКТИВАЦИИ МЕК/ЕРК-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ АНТИБИОТИКОМ АНИЗОМИЦИНОМ. © А. Н. Кукушкин, С. Б. Светликова, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Ранее мы показали, что в эмбриональных фибробластах крысы (REF), трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras, сильно подавлена транскрипция протоонкогена *c-fos*, причем ростовые факторы сыворотки лишь незначительно ее активируют в отличие от их сильного эффекта в нормальных фибробластах. Однако мы обнаружили, что при действии на данные трансформанты антибиотика анизомицина в низких концентрациях этот негативный блок транскрипции *c-fos* снимается. Установлено, что индуцированная анизомицином транскрипция гена *c-fos* опосредуется через активацию МЕК/ЕРК-сигнального пути, а не через стресс-киназные каскады JNK и p38, как можно было бы ожидать. Кроме того, воздействию анизомицина на трансформанты не приводило к накоплению ацетилированных форм коровых гистонов, как это наблюдалось при сывороточной стимуляции или обработке ингибиторами гистондеацетилаз (HDAC); таким образом, в данном случае реализуется HDAC-независимый механизм регуляции транскрипции. С помощью киназного анализа *in vitro* было показано, что анизомицин повышает ЕРК-зависимое фосфорилирование трансактивационного домена транскрипционного фактора Elk-1 — ключевого регулятора индуцибельной транскрипции протоонкогена *c-fos*. Предварительная обработка E1A + ras-трансформированных клеток антиоксидантом N-ацетил-L-цистеином (NAC) устраняет индуцированную анизомицином активацию транскрипции *c-fos*, поэтому можно предположить, что при воздействии на клетки данного антибиотика генерируются активные формы кислорода (ROS), которые, в частности, могут ингибировать активность фосфатаз MKP, специфичных для MAP-киназ, тем самым способствуя накоплению фосфорилированных ЕРК-киназ и активации их субстратов (Elk-1, ЕРК-зависимые эффекторные киназы RSK, MSK). Также при действии анизомицина наблюдается

дополнительная MEK/ERK-зависимая активация других генов раннего ответа, *c-jun* и *Erg-1*, транскрипция которых находится на заметном уровне в отличие от транскрипционно-репрессированного гена *c-fos*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49261-а).

**МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА АСТРОЦИТЫ.** © Т. А. Кулагова,<sup>1</sup> Г. Н. Семенкова,<sup>1, 2</sup> З. Б. Квачева,<sup>3</sup> М. Н. Михаденок,<sup>2</sup> С. А. Корень.<sup>3</sup> <sup>1</sup> Физический факультет Белорусского государственного университета, tatyana\_kulagova@tut.by, <sup>2</sup> Химический факультет Белорусского государственного университета и <sup>3</sup> Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ, Минск.

Астроциты — нейроглиальные клетки — выполняют ряд важных функций в мозге: регулируют внеклеточную концентрацию ионов, метаболитов и нейротрансмиттеров, поддерживают нейрональные и синаптические функции, регулируют развитие продуцирующих миелин клеток, образуют вместе с церебральными эндотелиальными клетками гематоэнцефалический барьер, принимают участие в инициации и регуляции иммунного и воспалительного ответов при повреждении и патологических состояниях мозга. Известно, что пероксид водорода в зависимости от концентрации обладает двойственным влиянием на функциональное состояние различных типов клеток. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в миллимолярных концентрациях в клетках *in vitro* индуцирует разрывы цепей ДНК, перекисное окисление липидов, снижение интенсивности гликолиза, морфологические изменения плазматических мембран, вызывая гибель клеток по механизмам апоптоза или некроза. Пероксид водорода в низких концентрациях является вторичным мессенджером, участвует в процессах трансдукции сигнала. Актуальным является изучение воздействия пероксида водорода в широком диапазоне концентраций (1 · 10<sup>-3</sup>—1 · 10<sup>-9</sup> М) на структурно-функциональные характеристики астроцитов для установления цитотоксических и регуляторных эффектов H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в отношении этих клеток. В настоящей работе изучено влияние пероксида водорода на морфологические характеристики, индекс пролиферации, менадионзависимую опосредованную люцигенином хемилюминесценцию и продукцию оксида азота перевариваемыми клетками глиомы крысы С6. Установлено, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в диапазоне концентраций 5 · 10<sup>-7</sup>—1 · 10<sup>-8</sup> М выступает в качестве регулятора морфологических и функциональных свойств перевариваемых клеток глиомы крысы, индуцируя реактивацию астроцитов, которая проявляется в гипертрофии клеточных тел и увеличении пролиферативной активности. При культивировании клеток С6 с пероксидом водорода в этом диапазоне концентраций в течение 24 ч наблюдается повышение уровня нитритов/нитратов в культуральной жидкости и усиливается продукция супероксидных анион-радикалов, индуцируемых менадионом. При действии пероксида водорода в концентрациях выше 1 · 10<sup>-6</sup> М происходит разрушение и разрежение клеточного моноослой, пикноз ядер, что свидетельствует в пользу цитодеструктивного действия исследуемого препарата. При этом в культуре клеток С6 отмечено снижение пролиферативной активности, уровня генерируе-

мых NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> и активности менадионзависимых генерирующих супероксид систем астроцитов. При стимуляции функциональной активности клеток С6 липополисахаридом В (ЛПС) зарегистрировано усиление пролиферации и продукции NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> астроцитами. При 24-часовом культивировании клеток С6 с ЛПС и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> выявлены дозозависимое ингибирование ЛПС-обусловленной пролиферативной активности, снижение выхода люцигенинзависимой хемилюминесценции астроцитов при действии менадиона до уровня контрольных значений. При сочетанном действии ЛПС и пероксида водорода в диапазоне концентраций 1 · 10<sup>-6</sup>—1 · 10<sup>-8</sup> М зарегистрировано потенцирование продукции оксида азота астроцитами. Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют заключить, что пероксид водорода в субмикромольных концентрациях оказывает стимулирующее воздействие на клетки С6 в культуре, а также модифицирует сигнальные пути, приводящие к усилению митотической активности и продукции оксида азота при стимуляции клеток липополисахаридом В.

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ПРОТЕАСОМ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ-РЕЦИПИЕНТАХ.** © В. А. Куличкова, А. С. Цимоха, А. Г. Миттенберг, И. В. Кожухарова, Ю. Б. Ермолаева, И. Н. Евтеева, Л. Н. Гаузе, И. М. Константинова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ikonst@mail.cytspb.rssi.ru.

Несмотря на значительный прогресс в изучении протеасом, некоторые вопросы, в частности вопрос об экскреции этих частиц из клеток и их интернализации клетками, остаются малоисследованными. Ранее нами была обнаружена способность клеток экскретировать 26S-протеасомы в культуральную среду (к-среду). Полученные результаты свидетельствуют о том, что выделяемые в к-среду протеасомы сохраняют ферментативные активности, характерные для этих частиц. В настоящей работе впервые продемонстрирована способность 26S-протеасом входить в живые клетки из культуральной среды. Для оценки способности клеток поглощать протеасомы клетки инкубировали в среде, в которую были добавлены меченные биотин-флюоресцеином протеасомы. Обнаружено, что 26S-протеасомы способны быстро проникать из культуральной среды в клетки и выявляются как в цитоплазме, так и в ядрах клеток-реципиентов. Получены картины распределения экзогенных протеасом в клетках проэритролейкемии человека линии K562. Обнаружено, что интернализированные клетками частицы влияют на экспрессию специфических генов в клетках-реципиентах. Так, методом RT-PCR показано, что поглощенные клетками K562 протеасомы значительно усиливают влияние апоптоза на экспрессию генов-регуляторов апоптоза — *bcl-xl*, *bcl-2* и *c-myc*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49606) и С.-Петербургского научного центра РАН.

**РОЛЬ МАЛЫХ G-БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ВХОДА Ca<sup>2+</sup> В МАКРОФАГИ.** © Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев. Кафедра биофизики Биолого-почвенного факультета С.-Петербургского государственного университета.

Практически все агонисты, связываясь с мембранными рецепторами, вызывают двухфазное увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках. В качестве первой фазы выступает кратковременная мобилизация  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. Вторая фаза, более длительная, связана с входом  $\text{Ca}^{2+}$  из наружной среды. В настоящее время предполагают, что одним из основных механизмов входа  $\text{Ca}^{2+}$  в электрически невозбудимые клетки является так называемый депозависимый, или «емкостной», вход  $\text{Ca}^{2+}$ . В соответствии с моделью «емкостного» входа  $\text{Ca}^{2+}$  вход  $\text{Ca}^{2+}$  регулируется степенью заполнения  $\text{Ca}^{2+}$ -депо таким образом, что опустошение депо активирует вход  $\text{Ca}^{2+}$ . В то же время механизм, посредством которого информация об опустошении  $\text{Ca}^{2+}$ -депо передается от эндоплазматического ретикула к  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам в плазматической мембране, до сих пор остается неясным. Ряд моделей депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  предполагает участие малых G-белков в регуляции «емкостного» входа  $\text{Ca}^{2+}$ . С использованием флуоресцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -зонда Fura-2AM исследовано участие малых G-белков в активации и поддержании депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированного пуринергическим агонистом АТФ или ингибитором эндоплазматических  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз тапсигаргином, в перитонеальных макрофагах крысы. В экспериментах использован аналог фарнезилцистеина N-ацетил-S-фарнезил-L-цистеин (AFC), ингибирующий фарнезилметилтрансферазы и препятствующий метилированию, связыванию с мембраной и активации белков Ras. Кроме того, изучено влияние на «емкостной» вход  $\text{Ca}^{2+}$  ингибитора везикулярного транспорта брэфельдина А, который инактивирует малые G-белки семейства *arf*, играющие ключевую роль в регуляции везикулярного транспорта в клетках. Показано, что предварительная инкубация макрофагов с 50 мкМ AFC не влияет на мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из депо, но существенно (на 55 %) подавляет депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированный АТФ или тапсигаргином. Добавление AFC после окончания фазы мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо, вызванной АТФ или тапсигаргином, когда процессы активации входа уже были запущены опустошением депо, также приводит к значительному подавлению депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ . Полученные данные свидетельствуют об участии малых G-белков семейства Ras в активации и поддержании емкостного входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофаги. Установлено также, что предварительная инкубация клеток с 50 мкМ брэфельдина А в течение 1 ч до введения АТФ или тапсигаргина приводит к практически полному подавлению входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофаги. Обработка макрофагов брэфельдином А в течение 1 ч после активации клеток тапсигаргином не влияет на вход  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированный введением 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  в наружную среду, что может свидетельствовать о том, что механизм, сходный с везикулярным транспортом, необходим для активации, но не для поддержания емкостного входа в макрофагах. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии *arf*-белков, обязательных составляющих механизма везикулярного транспорта, в активации депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах. Результаты согласуются с моделью «емкостного» входа  $\text{Ca}^{2+}$  («связывание по типу секреции» — secretion-like coupling model), предполагающей обратимую транслокацию  $\text{Ca}^{2+}$ -депо к плазмалемме, происходящую с участием малых G-белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных ис-

следований (проект 03-04-49091) и по программе Минобробразования «Развитие научного потенциала высшей школы» (проект 4681, 2005 г.).

**СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ЛИНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА: СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ.** © М. А. Лагарькова,<sup>1</sup> М. А. Прохорович,<sup>1</sup> А. Г. Шиллов,<sup>2</sup> С. Л. Киселев,<sup>1</sup> С. М. Закиян.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Институт биологии гена РАН, Москва, xmar@mail.ru, и <sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Стандартизация методических и технологических подходов для работы с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) человека является необходимым шагом на пути к их потенциальному применению в клинике. Это обусловлено тем, что, помимо того что в связи с индивидуальным происхождением каждой клеточной линии, большое значение имеют условия культивирования линий, при которых должны сохраняться основные свойства клеток, а именно их плюрипотентное состояние и генетическая стабильность. На основе имеющихся в распоряжении клеточных линий ЭСК человека создана коллекция. В коллекцию входят 3 клеточные линии (HUES 7, 8 и 9), полученные от проф. Мелтона (Гарвардский университет, США), 4 клеточные линии ESM 01, 03 и 04 (полученные в Институте биологии гена РАН) и 2 клеточные линии (ESM 0118 и ESM 0309), в которых произошли хромосомные перестройки. Для всех клеточных культур проведен анализ основных параметров, принятых для характеристики ЭСК человека, и проведено сравнение методов их культивирования.

**ВЗАИМНОЕ ВЛИЯНИЕ КЛЕТОК СЕРДЦА И СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ.** © Г. Е. Левина,<sup>1</sup> Ю. В. Маленьких,<sup>1</sup> Н. С. Николаенко,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>2</sup> <sup>1</sup> С.-Петербургский государственный политехнический университет и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Согласно литературным данным (Кругляков, 2004), стромальные клетки костного мозга (СККМ) *in vitro* под действием индукторов способны дифференцироваться в мышечные клетки и, в частности, в кардиомиоциты. Данные о дифференцировке СККМ в кардиомиоциты *in vivo* спорны. Хотя специфическое микроокружение в миокарде сердца (как сами клетки, так и компоненты внеклеточного матрикса) может быть мощным индуктором дифференцировки СККМ. Экспериментальный моделью для изучения межклеточных взаимодействий может стать совместное культивирование исследуемых клеток. Задачей настоящей работы явилось изучение влияния кардиомиоцитов и сердечных фибробластов на стромальные клетки костного мозга *in vitro*. Для ее решения были разработаны две модельные системы сокультивирования этих клеток двумя способами: бесконтактное и контактное сокультивирования. Клетки сердца (КС) и СККМ получали из неонатальных крыс (в возрасте 1—4 сут). Для сокультивирования использовали первичные культуры КС и СККМ (2—3 пассажа), а также фракции КС различной степени адгезивности. Были получены фракции КС, обогащенные кардиомиоцитами или

фибробластами. Совместное культивирование проводили в ростовой среде, используемой для культивирования клеток сердца (90 % DMEM, 10 % СЭК и 50 мкг/мл гентамицина). Для контактного сокультивирования со стекла удаляли 1/3 клеток сердца с помощью эластичного шпателя и на это место сеяли СККМ. Сокультивирование проводили в течение 4 сут. Контролем служили те же клетки, культивируемые 4 сут в разных чашках Петри. Сокультивирование клеток на разных покровных стеклах проводили в одной чашке Петри диаметром 50 мм. Культуры СККМ различались сроками и условиями предварительного культивирования (количеством пассажей, содержанием сыворотки и ее заменителя, наличием подложки в виде фибронектина). СККМ сеяли на отдельные стекла в чашки Петри диаметром 50 мм, где уже находились стекла с КС. Сокультивирование проводили в течение 14 сут. Как и в предыдущем варианте, контрольные КС и СККМ культивировали раздельно. Для выявления мышечных клеток в смешанной культуре использовали ШИК-реакцию на гликоген. Для идентификации активных клеток, способных к расщеплению фосфатов и преобразованиям внеклеточного матрикса, проводили реакцию на щелочную фосфатазу. Для анализа локализации сократительных белков (актинового цитоскелета и распределения миозина) использовали метод иммунофлуоресценции (окраска антителами к тяжелым цепям миозина медленного типа и родамин-фаллоидином). В течение всего срока сокультивирования СККМ и КС сохраняли свою жизнеспособность и функциональную активность: кардиомиоциты синхронно сокращались, СККМ активно пролиферировали. Среди обоих типов клеток были выявлены клетки с положительной окраской на гликоген и щелочную фосфатазу. В результате контактного сокультивирования СККМ мигрировали, вплотную «подходили» к слою клеток сердца и, возможно, контактировали с ними. Было показано, что КС и СККМ могут находиться в непосредственном контакте, не оказывая негативного влияния друг на друга. При совместном культивировании клетки не отличались от контрольных и сохраняли свою функциональную активность и морфологию. Однако признаков дифференцировки стромальных клеток костного мозга в кардиомиоцитарном направлении при сокультивировании с интактными клетками сердца обнаружено не было.

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ АЛЛОГЕННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ НЕЙРОКЛЕТОК НА КЛЕТКИ ОПУХОЛИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА IN VITRO.** © Л. Д. Любич, Н. И. Лисяный. Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова АМН Украины, Киев.

В последнее время актуальным является исследование терапевтического потенциала нейтральных стволовых клеток при различной патологии ЦНС, в том числе нейроонкологического профиля. Целью исследования было изучение действия эмбриональных нейроцитов человека (ЭНК), полученные из эмбрионов 9—10 нед гестации, на клетки опухолей головного мозга (медуллобластом и глиом). Для этого супернатант 1-суточной культуры аллогенных ЭНК, культивируемых в среде DMEM + конА (10 мкг/мл), добавляли к суспензии свежeweделенных клеток из опухолевого образца и инкубировали клетки 16 ч при 4 °С. Установлено, что после ин-

кубации с супернатантом ЭНК количество клеток в опухолевой суспензии снижалось на  $28.03 \pm 2.26$  %, при этом на  $18.61 \pm 13.21$  % увеличивалось количество Хехст-положительных клеток — клеток, вступивших на путь апоптоза. Более значительное снижение клеточности суспензии наблюдалось в образцах глиом (30 %) по сравнению с образцами медуллобластом ( $9.07 \pm 3.68$  %), кроме того, в образцах глиом под влиянием супернатанта ЭНК большее количество клеток подвергалось апоптозу ( $22.98 \pm 13.69$  %) по сравнению с образцами медуллобластом ( $12.80 \pm 0.91$  %). При исследовании влияния супернатанта ЭНК на экспрессию мРНК цитокинов в клетках опухолей головного мозга методом ОТ-ПЦР в 60 % случаев зафиксировано изменение экспрессии мРНК цитокинов. При этом в двух случаях клетки опухоли прекращали экспрессировать мРНК IL-10, в одном случае начинали экспрессировать мРНК IL-10, в двух случаях начинали экспрессировать IFN- $\alpha$ , в одном случае прекращали экспрессию IL-12. Мы не зафиксировали влияние супернатанта ЭНК на экспрессию мРНК TGF- $\alpha$ . Таким образом, эмбриональные нейроциты человека продуцируют растворимые факторы, оказывающие *in vitro* проапоптотическое действие на клетки опухоли мозга и влияющие на экспрессию мРНК иммуносупрессивных (IL-10) и провоспалительных (IFN- $\alpha$  и IL-12) цитокинов опухолевыми клетками.

**МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ВЫЗЫВАЮТ ДЕГРАДАЦИЮ МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ HeLa.** © К. Г. Лямзаев,<sup>1</sup> О. Ю. Плетюшкина,<sup>1</sup> О. К. Непряхина,<sup>2</sup> Б. В. Черняк.<sup>1</sup> <sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии Московского государственного университета и <sup>2</sup> Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета.

Было показано, что ингибиторы дыхания (пирицидин, антимицин, миксотиазол), АТФ-синтазы (олигомицин, ауровертин) и разобщители (ДНФ, FCCP) не вызывают заметной гибели клеток HeLa в течение 48 ч. Указанные ингибиторы в присутствии глюкозы вызывают значительные изменения в структуре митохондрий независимо от уровня АТФ. Эта модель была использована нами для исследования механизмов дробления митохондриального ретикулума. Наиболее быстрое дробление митохондрий наблюдалось при совместном действии ингибиторов дыхания и разобщителей. Обработка клеток HeLa в течение 72 ч ДНФ либо FCCP в комбинации с антимицином или миксотиазолом приводила к гибели значительной части клеток (60—70 %). Оставшиеся клетки имели нормальные ядра, были анексин V-негативны и имели нормальный цитоскелет. В клетках общее количество митохондрий значительно снижалось, а оставшиеся собирались в кластеры в районе ядра. Цитохром *c* в этих клетках обнаруживался лишь в остатках митохондрий, но не в цитоплазме, хотя выход других митохондриальных белков полностью исключить нельзя. Колокализации митохондриальных кластеров с аутофагосомами не наблюдалось. Таким образом, можно предположить, что механизм деградации митохондриального материала не связан с аутофагией. Анализ наших и литературных данных позволяет предположить, что механизм деградации митохондрий в клетках HeLa под действием митохондриальных ингибиторов сходен с таковым при дифференцировке ретикулоцитов или формировании клеток хрус-

талика глаза, которые также идут независимо от аутофагии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-49062 и 04-04-49484).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ БЕЛКОВОГО ПРОФИЛЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ СКЕЛЕТНО-МЫШЕЧНЫХ МИОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА В ХОДЕ МИОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ.** © А. А. Макаров,<sup>1</sup> Л. И. Ковалев,<sup>1</sup> К. В. Лисицкая,<sup>1</sup> Л. С. Еремина,<sup>2</sup> И. Ю. Торопыгин,<sup>3</sup> С. С. Шишкин.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт биохимии РАН, amkrv@mail.ru, <sup>2</sup> Российский университет дружбы народов и <sup>3</sup> НИИ биомедицинской химии РАМН, Москва.

Сателлитные клетки скелетной мускулатуры являются важными участниками процессов мышечной регенерации и гипертрофии. Культивируемые сателлитные клетки, называемые миобластами, представляются удобной моделью для экспериментального изучения миогенной дифференцировки. Будучи одноядерными фибробластоподобными клетками в пролиферирующем состоянии, они способны при культивировании в среде, содержащей лошадиную сыворотку, претерпевать характерные изменения — выходить из клеточного цикла, удлиняться и в конечном счете сливаться с образованием многоядерных миотуб. Эти процессы сопровождаются изменением строения и функции клеток, проходящих в них биохимических процессов. Целью настоящей работы является изучение изменений белкового профиля культивируемых миобластов человека в процессе миогенной дифференцировки и идентификация изменяющихся качественно или количественно белков. Скелетно-мышечные миобласты человека культивировали в среде F-12, содержащей пируват натрия, гентамицин и 12.5 % эмбриональной телячьей сыворотки. Дифференцировку индуцировали культивированием в среде, содержащей 2 % лошадиной сыворотки, в течение 2—8 сут со сменой среды каждые 2 сут. Белки, выделенные из миобластов, фракционировали методом двухмерного электрофореза по О'Фарреллу. Для детекции белков использовали окрашивание красителем Кумасси R-250 и азотнокислым серебром, что позволяло выявлять до нескольких сотен белковых фракций на одной электрофореграмме. Идентификацию белков проводили методом времяпролетной MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием пакета программ Mascot и базы данных NCBI Protein. Было обнаружено количественное и качественное изменение более десятка белковых фракций. В частности, после 2 сут инкубации в среде, содержащей 2 % лошадиной сыворотки, было отмечено увеличение количества таких белков, как В-цепь супероксиддисмутазы, ассоциированного белка 1 рецептора липопротеинов низкой плотности, коллагенсвязывающего белка 2 (продукта, индуцирующего пролиферацию гена 14), митохондриальной альфа-АТФ-синтазы, бета-актина и аннексина А5. В ходе дифференцировки заметно уменьшилось количество белка S100A11 и немускульной формы кофилина. Также отмечены незначительные изменения количества маннозосвязывающего лектина 2 и аннексина А1. Таким образом, были выявлены изменения белкового профиля в ходе дифференцировки миобластов человека. Идентифицирован ряд белков, претерпевающих количествен-

ные или качественные изменения и, следовательно, так или иначе вовлеченных в процессы миогенной дифференцировки. Эти белки могут рассматриваться как потенциальные маркеры миогенной дифференцировки у человека и возможные молекулярные мишени при разработке новых методов влияния на процессы мышечной регенерации и гипертрофии.

Работа выполнена в рамках комплексного проекта «Медико-биологические технологии повышения работоспособности человека в условиях напряженных физических нагрузок» (проект ЖС-КП.6/002).

**АДГЕЗИВНАЯ И СЕКРЕТОРНАЯ ФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОНУКЛЕАРОВ КРОВИ ПРИ СИСТЕМНОМ ОСТЕОПОРОЗЕ У МУЖЧИН (ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ).** © Э. Б. Макарова,<sup>1</sup> Л. П. Евстигнеева,<sup>2</sup> Е. А. Лаврукова,<sup>1</sup> Е. Б. Трифонова,<sup>1</sup> И. А. Зельский,<sup>1</sup> А. В. Осипенко.<sup>1</sup> <sup>1</sup> ФГУ «УНИИТО» Росздрава и <sup>2</sup> ГУЗ СОКБ1, Екатеринбург.

Общепризнано, что суммарный эффект генетических и средовых факторов детерминирует плотность костной ткани. При этом пролиферация, дифференцировка и функциональная активность остеобластов и остеокластов контролируются факторами роста, цитокинами, молекулами адгезии, опосредующими влияние гормонов и обеспечивающими взаимодействие между клетками, клетками и матриксом. Эти механизмы образуют единую динамическую сеть. Однако вклад различных регуляторных молекул и клеток при остеопорозе требует более тщательного изучения. Цель исследования — оценить функциональную и секреторную активность нейтрофилов и мононуклеаров крови у пациентов с системным идиопатическим остеопорозом. Объект исследования — 6 мужчин (возраст 30—50 лет) с системным идиопатическим остеопорозом (1-я группа). В контрольной группе обследованы 4 мужчины соответствующего возраста с нормальной плотностью костной ткани без факторов риска развития вторичного остеопороза (2-я группа). Минеральную плотность кости оценивали методом рентгеновской двухэнергетической денситометрии. Клетки крови разделяли методом центрифугирования в ступенчатых градиентах плотности на гранулоциты (ГЦ) и мононуклеары (МНК) и определяли спонтанную и стимулированную (краткосрочной инкубацией с коллагеном I типа) адгезию клеток к пластику, концентрацию ИЛ-1α (Biosource) и sRANKL (Biomedica) в супернатанте клеток методом ИФА. В результате выявлено снижение исходного уровня адгезивной способности МНК и ГЦ у пациентов с остеопорозом по сравнению с пациентами контрольной группы. При инкубации с костным коллагеном адгезия МНК пациентов 2-й группы возросла более значительно, чем у пациентов 1-й группы. Возможно, это связано со снижением реактивности МНК пациентов с остеопорозом или снижением способности МНК распознавать коллаген I типа. Адгезивная способность нейтрофилов при инкубации с костным коллагеном у пациентов 1-й группы вначале возросла, но при увеличении дозы коллагена снижалась ниже исходного уровня. У пациентов 2-й группы адгезия нейтрофилов после инкубации с костным коллагеном дозозависимо снижалась ниже исходного уровня. Известно, что при активации нейтрофилов *in vivo* цитокины выступают в качестве ко-

стимуляторов активирующих агентов. Таким образом, именно цитокиновый профиль, влияющий на клетки *in vivo*, может определять конечный результат при стимуляции нейтрофилов различными дозами коллагена. Концентрация ИЛ-1 в супернатанте МНК крови пациентов с остеопорозом выше, чем этот показатель у пациентов с нормальной плотностью костной ткани. ИЛ-1 независимо от других активирующих агентов может стимулировать функцию остеокластов. Кроме того, по данным литературы известно, что ИЛ-1 вызывает снижение адгезивной активности МНК, а в стимулированных Т-лимфоцитах при распознавании через рецепторы контактного взаимодействия коллагена I типа происходит ингибирование пролиферативного ответа, повышение степени дифференцированности клеток и, следовательно, способности выполнять специфичные функции, например синтез RANKL. Однако различий по уровню sRANKL в супернатанте мононуклеаров в настоящем исследовании нами обнаружено не было. Таким образом, у пациентов с системным идиопатическим остеопорозом происходит увеличение спонтанного синтеза ИЛ-1 клетками крови, способного самостоятельно и посредством регуляции экспрессии RANKL влиять на активность остеокластов и остеокластогенез. Снижается способность МНК и нейтрофилов крови к адекватному ответу на внешнее воздействие, в том числе при контакте с костным коллагеном I типа.

**ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИИ КЛЕТОК С НАИБОЛЕЕ ВЫРАЖЕННОЙ СПОСОБНОСТЬЮ К КАРДИОМИОЦИТАРНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ПУТЕМ ИХ ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ АДГЕЗИИ К ПОДЛОЖКЕ.** © Ю. В. Маленьких,<sup>1</sup> Г. Е. Левина,<sup>1</sup> Н. С. Николаенко,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> С.-Петербургский государственный политехнический университет и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В настоящее время в связи с планируемым использованием стромальных клеток костного мозга (СККМ) для терапии инфаркта миокарда встает задача выделения фракции СККМ с наиболее выраженной способностью к кардиомиоцитарной дифференцировке. Целью настоящей работы являются описание характеристик фракций СККМ, полученных методом адгезии, и определение предрасположенной к кардиомиоцитарной дифференцировке клеточной фракции. Выделение и культивирование СККМ осуществляли по отработанной методике (Pittenger et al., 2001). Разделение клеток на фракции проводили по степени адгезии на пластике. Экспериментальным путем были подобраны оптимальные временные промежутки для адгезии (1, 3, 5 и 10 мин). Результаты фракционирования анализировали при помощи инвертированного микроскопа. Для сравнения пролиферативной активности клеток разных фракций, а также для определения в них степени спонтанной остеогенной дифференцировки в клетках проводили реакцию на щелочную фосфатазу. Для индукции кардиомиоцитарной дифференцировки клетки всех фракций в течение 1 сут обрабатывали 5'-азациитидином. Контролем служили необработанные клетки. После отмены индуктора как опытные, так и контрольные клетки на протяжении 2 нед культивировали в среде с низким содержанием сыворотки, после чего анализировали полученные результаты. Для контроля кардиомиоцитарной дифференцировки

клетки всех фракций окрашивали на гликоген и мышечную изоформу миозина. В результате разделения СККМ по степени адгезии были получены четыре фракции клеток, характеризующиеся различной морфологией, разной активностью щелочной фосфатазы и близкие по содержанию в них гликогена. Анализ результатов индукции кардиомиоцитарной дифференцировки показал наибольшую предрасположенность фракции 3-минутной адгезии к дифференцировке в данном направлении. Сходные результаты, полученные для контрольных и дифференцированных клеток данной фракции, указывают на возможность спонтанной дифференцировки в кардиомиоцитарном направлении.

**ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЛИПРОЛИНОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ФЕОХРОМОЦИТОМЫ КРЫСЫ PC12.** © К. В. Мартынова, А. В. Нечаева, П. А. Климова, Л. А. Андреева, С. И. Шрам, Н. Ф. Мясоедов. Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Martynova\_KV@ypost.ru.

В настоящее время проводятся интенсивные исследования по выявлению биологической активности ряда новых пептидов, недавно выделенных в обособленное семейство и получивших название «глипролины» (Ашмарин, 2001). Известно, что глипролины обладают выраженным противоязвенным действием и способностью снижать свертываемость крови (Lyapina et al., 2000; Saponina et al., 2000). Ранее нами было показано, что синтетический пептид семакс, содержащий концевую последовательность Pro-Gly-Pro, оказывал цитопротекторное действие на культуру клеток PC12, имеющих эндокринно-нейрональную природу (Сафарова и др., 2003). Однако оценку нейропротекторной активности глипролинов на моделях *in vitro* и *in vivo* ранее не проводили. Целью настоящей работы было исследовать влияние ряда синтетических глипролинов на выживаемость культуры клеток PC12. Синтетические глипролины, состоящие только из остатков Pro и Gly длиной от 2 до 6 аминокислотных остатков были синтезированы в нашем институте. Известно, что клетки PC12 могут претерпевать нейрональную дифференцировку в присутствии фактора роста нервов (ФРН). О нейротрофической активности синтетических глипролинов судили по изменению морфологии клеток: увеличению размеров, расплыванию, образованию длинных отростков. В качестве положительного контроля использовали ФРН. В среде культивирования с ФРН на 3-и сут клетки приобретали нейроноподобную форму. Исследуемые глипролины не вызывали таких изменений в течение 7 сут культивирования. Цитопротекторную активность пептидов оценивали на модели некроза, вызванного окислительным стрессом (30 мин инкубации клеток в среде 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Для выявления некротических клеток использовали флуоресцентный краситель иодид пропидия. Показано, что исследуемые пептиды обладали цитопротекторной активностью, которая зависела от структуры пептида и его концентрации. Полученные данные позволяют предположить, что в спектре биологической и фармакологической активности глипролинов может присутствовать и нейропротекторное действие.

**МЕЗОГЛЕИН — БЕЛОК, СИНТЕЗИРУЕМЫЙ МЕЗОГЛЕАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ МЕДУЗЫ *Aurelia aurita*.**

© И. В. Матвеев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Внеклеточный матрикс (ВКМ) имеется у всех многоклеточных животных и может составлять значительную часть объема их тканей. ВКМ активно участвует в регуляции множества процессов, происходящих в организме, начиная с самых первых шагов эмбрионального развития. Объектом настоящей работы была выбрана сцифоидная медуза *Aurelia aurita* — доминирующий планктонный организм Белого моря. Тело представителей этого вида, как и у других кишечнополостных, образовано двумя эпителиальными пластами, эпидермой и гастродермой, между которыми находится мезogleя. Основную массу мезоглеи составляет ВКМ, который у многих кишечнополостных не содержит клеток. Мезogleя выполняет функцию скелета, придавая определенную форму телу животного, также она участвует в транспорте и запасании питательных веществ. У медузы *A. aurita* и ряда других представителей классов Scyphozoa и Anthozoa мезogleя заселена свободными подвижными клетками. Полагают, что ВКМ мезоглеи синтезируется клетками эпителиев. Участие мезоглеальных клеток в регуляции состава ВКМ мезоглеи не очевидно, однако они являются активно синтезирующими, и это позволяет предполагать, что эти клетки участвуют в формировании ВКМ мезоглеи. Показано, что мезogleя или ее экстракт является оптимальной подложкой для переживающих культур клеток беспозвоночных. Проблема культивирования постоянных клеточных линий беспозвоночных может быть решена, если будет определен состав ВКМ медузы. Мажорный белок мезоглеи *A. aurita* с мол. массой около 45 кДа назван «мезоглеин» после клонирования и секвенирования его кДНК (GenBank Accession No. DQ467654). В результате поиска известных доменов в гипотетической аминокислотной последовательности мезоглеина были обнаружены домены Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) и zona reticulata (ZR), а также 3 сайта узнавания протеазы фуринов, 2 возможных сайта N-гликозилирования и 1 возможный сайт O-гликозилирования. Результаты иммуногистохимического анализа срезов *A. aurita* показали, что мезоглеин локализуется в гранулах мезоглеальных клеток и в апикальной части клеток эпидермы, а у зрелых медуз он выявляется в составе эластических волокон. В результате анализа экспрессии мезоглеина в эпидерме, мезоглее и гастродерме методом ОТ-ПЦР показано, что мезоглеин дифференциально экспрессируется в мезоглеальных клетках. Возможно, мезоглеин является структурным элементом ВКМ мезоглеи и делает ее более прочной.

Работа выполнена при финансовой поддержке, представленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-49578-а) и по программе поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-11-П).

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КОЛЛЕКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ГИДРОБИОНТОВ В КРИБАНКЕ ИНСТИТУТА БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РАН. © Е. В. Мельникова. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, melnikova@icb.psn.ru.

Организация коллекций генетического материала гидробионтов в Крибанке ИБК РАН включает в себя оценку состояния зародышей ранних стадий развития,

зародышевых клеток и спермы. С этой целью нами использованы флуорохромы АО, аурамин, примулин, флуоресцеин, ЭБ, PI, Hoechst и АНС, а также флуорогенный препарат флуоресцеиндиацетат. Анализ состояния зародышей и клеток на основании низкой проницаемости для флуорохромов в норме проводился как до их замораживания, так и после размораживания. Наблюдения проводили на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ И-3 (ЛОМО, Россия) с использованием цифровой фотокамеры, на конфокальном микроскопе LSM-510 (Karl Zeiss, Германия) и на двухволновом микрофлуориметре оригинальной конструкции (Карнаухов и др., 1975). Проведенные исследования показали, что по проницаемости для указанных флуорохромов не отмечено различий как между зародышами, так и между зародышевыми клетками травяной лягушки *Rana temporaria*, шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, а также серой жабы *Bufo bufo* при искусственном и естественном оплодотворении. Использование вышеперечисленных флуорохромов как по отдельности, так и в определенных сочетаниях позволяет говорить не только о состоянии оболочек зародышей и цитоплазматической мембраны клеток при диссоциации этих зародышей, о состоянии отдельных ферментативных систем, но и о влиянии криопротекторов и процесса замораживания—оттаивания на эти системы. Использование одновременно двух флуорохромов АНС и ФДА позволило сделать предположение об обратимых трансмембранных дефектах зародышевых оболочек при повреждении и предполагаемом времени их существования. По принципу оценки проницаемости для флуорохромов подбирали условия замораживания спермы лягушки *R. temporaria*. Следует отметить возможности флуоресцентного анализа, а именно оценки состояния зародышей по проницаемости для флуорохромов как у теплокровных, так и холоднокровных. И что особенно важно — возможности использования этого способа в оценке состояния зародышевых клеток как в изолированном виде, так и в составе нативного зародыша.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-97300) и Министерства промышленности и науки Московской обл.

СОХРАНЕНИЕ МАРКЕРОВ ХРОМОСОМ СОМАТИЧЕСКОГО ПАРТНЕРА В ГЕНОМЕ ВНУТРИ- И МЕЖВИДОВЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК МЫШИ В УСЛОВИЯХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ IN VIVO. © А. Г. Мензоров, В. Е. Ведерников, М. В. Пузиков, А. А. Василькова, А. Г. Шилов, Е. А. Кизилова, О. Л. Серов. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, menzorov@mail.ru.

Гибридные клетки, полученные слиянием эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и соматических клеток, сохраняют высокий уровень плюрипотентности и в настоящее время рассматриваются как новый инструмент изучения обратимости дифференцировки соматической клетки. Тесты на образование тератом и химер являются наиболее прямым методом оценки потенциала гибридных клеток. Необходимо быть уверенным в том, что тератомы и химеры произошли именно из гибридных клеток, а не из ЭСК, особенно важно проследить за судьбой соматических хромосом, так как именно они яв-

ляются «мишенью» репрограммирования. Целью настоящей работы было исследование хромосомного состава внутри- и межвидовых гибридных клеток в условиях роста *in vivo* при образовании тератом и участии в развитии химерных животных. В Лаборатории генетики развития нашего института было получено 5 внутривидовых гибридных клонов серии HESF от слияния плюрипотентных ЭСК линии НМ-1 мыши *Mus musculus* (линия 129/Ola) и эмбриональных фибробластов мыши линии DD/c. Хромосомный состав клонов этого типа был определен в условиях их культивирования *in vitro*. В тестах *in vivo* были получены тератомы из двух субклонов — HESF1-1 и HESF4-1 — путем введения иммунодефицитным мышам *nude*. Анализ 7 микросателлитов показал полное сохранение гомологов соматического партнера. 20 межвидовых клеточных гибридов (клоны серии НМС) были получены от слияния ЭСК НМ-1 с соматическими клетками (спленоцитами) другого вида мышей — *M. caroli*. Полученные гибридные клоны сохраняли фенотип ЭСК и имели межклональные различия по составу хромосом. Для тестов *in vivo* были взяты контрастные по содержанию хромосом соматического партнера клоны, клон НМС15 содержит 2 хромосомы, а клон НМС29 — 13. Тератомы были получены путем введения под кожу мышам *nude* клеток клонов НМС27, НМС29, НМС56, НМС58 и субклона НМС15-4. Хромосомный состав тератом был определен с помощью 20 микросателлитов. В 2 наблюдается сохранение всех гомологов хромосом, в 5 — частичная или полная сегрегация хромосом соматического партнера. В тест на химеризм были взяты клон НМС29 и субклоны НМС15-1, НМС15-4 и НМС29-3. Получено 7 химерных животных от субклона НМС15-4, 5 — от субклона НМС15-1, 1 — от клона НМС29 и 2 — от субклона НМС29-3. Вклад гибридных клеток в ткани химерных животных оценивали с помощью видоспецифических маркеров на хромосомы 19 и X *M. caroli*. Химеризм определяли по вкладу в 12 органов, производных трех зародышевых листков. Для химер, полученных с участием клеток субклона НМС15-1, показан вклад гибридных клеток в формирование 5 органов, для клеток субклона НМС15-4 — во все органы, за исключением селезенки и печени. Вклад гибридных клеток клона НМС29 показан в 7 органах, а клетки субклона НМС29-3 обнаружены во всех исследованных. Таким образом, потомки клеток клона НМС29 и субклонов НМС15-4 и НМС29-3 участвуют в формировании всех трех зародышевых листков, тогда как потомки клеток субклона НМС15-1 — в двух. Также выявлено присутствие потомков гибридных клеток в гонадах. Данные о вкладе клеток клонов в формирование химер свидетельствуют о том, что гибридные клетки сохраняют плюрипотентность, причем маркеры хромосом соматического партнера не элиминируются. Таким образом, клоны, имеющие различное количество хромосом соматического партнера, сохраняют плюрипотентные свойства, что подтверждается участием гибридных клеток в формировании химерных животных и образовании тератом. При этом наблюдается полное или частичное сохранение маркеров хромосом соматического партнера по слиянию, что свидетельствует о происхождении тератом из гибридных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49383).

МОДИФИКАЦИИ ХОЛОФЕРМЕНТА ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ III ЧЕЛОВЕКА, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ *IN VIVO*. © Н. А. Меркулова, В. М. Седова. С.-Петербургский политехнический университет и Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vanda.sedova@rambler.ru.

Фосфорилирование и гликозилирование *in vivo* индивидуальных субъединиц РНК-полимеразы III исследовали в клетках эпидермальной карциномы человека линии А431. ДНК-зависимая РНК-полимераза III синтезирует структурные и каталитические РНК, являющиеся компонентами таких важных для жизнедеятельности клетки процессов, как созревание РНК и синтез белка. Поскольку эти процессы строго зависят от метаболического состояния клетки, то и транскрипция РНК-полимеразы III регулируется в течение клеточного цикла и клеточной пролиферации, а также в ответ на действие ростовых факторов, при вирусной инфекции и трансформации клеток. Фосфорилирование и дефосфорилирование транскрипционных факторов — это те модификации, которые принимают участие в регуляции транскрипции в ответ на внеклеточные сигналы. Показано, что киназа СК2 (СК2) позитивно и негативно регулирует транскрипцию РНК-полимеразы III. Негативная регуляция осуществляется через фосфорилирование компонентов TFIIIB — TBP, Brf2 и Vdpl, в то же время присутствие СК2 является совершенно необходимым для активации транскрипции РНК-полимеразы III. Большинство протеинкиназ и протеинфосфатаз, участвующих в регуляции транскрипции, относится к серин-треониновым ферментам. Однако известно, что у многоклеточных организмов в ядре присутствуют также и тирозиновые киназы и фосфатазы, которые участвуют в регуляции белок-белковых взаимодействий между рядом транскрипционных факторов — NF-κB, STAT-белки, c-Jun — и РНК-полимеразой II. Помимо фосфорилирования, по современным представлениям, O-гликозилирование остатками N-ацетилглюкозамина является той посттрансляционной модификацией, которая очень широко распространена в цитоплазматических и ядерных белках, но до настоящего времени не идентифицирована в холоферменте РНК-полимеразы III. Целью нашего исследования явилось изучение фосфорилирования и гликозилирования *in vivo* индивидуальных субъединиц собственно РНК-полимеразы III человека. Холофермент ДНК-зависимую РНК-полимеразу III выделяли из ядер эпидермоидной карциномы человека А431. Для точного определения молекулярных масс модифицированных *in vivo* субъединиц были использованы стандартные наборы полипептидов (Sigma, США). Установлено, что субъединицы с мол. массой 60, 52 и 45 кДа фосфорилированы по остаткам серин/треонина и гликозилированы. Кроме того, мы показали, что субъединицы с мол. массами 60 и 45 кДа фосфорилированы *in vivo* и по остаткам тирозина. Фосфорилированный по остаткам тирозина определена также субъединица с мол. массой 38 кДа. Субъединицы с мол. массами 60, 45 и 38 кДа, по данным Сентенака (1985), относятся к субъединицам собственно РНК-полимеразы III человека. Субъединица 52 кДа, вероятно, принадлежит одному из базальных транскрипционных факторов. Известно, что гликозилирование, как и фосфорилирование, происходит по остаткам серина и треонина. Согласно представлениям Харта (1995), модификация белков O-N-ацетилглюкозамином может реципрокно вы-

теснять фосфорилирование, как в случае протоонкобелка с-Мус, гликозилированного по остатку треонина в положении 58, которое известно не только как сайт фосфорилирования, но и как горячий сайт мутаций в лимфомах. Такие конкурентные отношения О-гликозилирования и фосфорилирования указывают на возможность для ряда белков существовать во множестве функционально различных изоформ, детерминированных посттрансляционными модификациями. Однако на основании наших данных нельзя утверждать, что идентифицированные нами модификации имеют место по одним и тем же аминокислотным остаткам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-48497) и С.-Петербургского научного центра РАН.

**ПЕРВИЧНАЯ КУЛЬТУРА НЕЙРОНОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС.** © *Е. В. Миронова, А. А. Евстратова, С. М. Антонов.* Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, Санкт-Петербург.

Сложная организация мозга затрудняет исследование как индивидуальных нервных клеток, так и их взаимодействия в нейронной сети. Наиболее удобным подходом для изучения нейронных взаимодействий является использование клеточных культур. Данный метод позволяет расширять экспериментальные возможности исследователя при работе с млекопитающими и перспективен для изучения физиологических особенностей человеческих тканей в норме и при патологии. Для приготовления первичной культуры нейронов коры головного мозга использовали эмбрионы крыс на 16-е сут пренатального развития. Известно, что к этому времени структура коры зародышей уже достаточно сформирована, но при этом нейроны еще обладают способностью к дифференцировке и пролиферации. При использовании эмбрионов более ранних сроков культура не будет обладать структурной специфичностью, а в случае использования эмбрионов более поздних сроков значительно снижается жизнеспособность нейронов. Приготовление первичной культуры нейронов включает в себя следующие этапы: 1) выделение необходимой ткани на этапе эмбрионального развития, когда она полностью сформировалась; 2) диссоциация выделенной ткани на отдельные клетки механически или с использованием ферментов; 3) использование ингибиторов ферментативного процесса и ДНКазы для предотвращения коагуляции клеток; 4) промывка и центрифугирование с целью осаждения клеток; 5) подсчет количества живых клеток на единицу объема; 6) посев клеток определенной плотности на стекла, обработанные поли-D-лизином. Исходно после посева нейроны представляют собой сферы без выраженных отростков. Показано, что отростки в культуре изолированных незрелых нейронов образуются только у клеток, прикрепляющихся к субстрату, и что при этом условия клетки способны образовывать совершенно нормальный набор дендритов и аксонов. Дифференцировка клеток наблюдается уже на следующие сутки после посева и выражается в появлении коротких отростков, при этом не наблюдается признаков формирующейся нейронной сети. Через 1 нед обнаруживаются заметный рост дендритного дерева и формирование аксодендротических и аксосоматических синаптических контактов между нейронами —

появляется нейронная сеть. Существенно, что нейроны в культуре обладают всеми необходимыми функциональными свойствами, характерными для целостного мозга. Помимо дифференцировки происходит пролиферация клеток, и на 14-е сут после посева образуется плотный слой нейронов. Таким образом, нейроны в культуре являются удобным объектом исследования молекулярных механизмов функционирования нейронных сетей, анализ которых в экспериментах *in vivo* и на срезах затруднен.

**ПРОТЕАСОМЫ КАК ВОЗМОЖНЫЕ МЕДИАТОРЫ КОММУНАЛЬНОГО ЭФФЕКТА ПРИ РЕНТГЕНОВСКОМ ОБЛУЧЕНИИ КЛЕТОК ЭПИДЕРМАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА A431.** © *А. Г. Мумменберг,<sup>1, 2</sup> Т. Н. Мусеева,<sup>1</sup> И. В. Пугачева,<sup>1</sup> М. Перала,<sup>2</sup> О. В. Беляков.<sup>2</sup>* <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, agm@mail.cytspb.rssi.ru, и <sup>2</sup> Центр ядерной и радиационной безопасности (STUK), Хельсинки, Финляндия.

Согласно «мишенной» теории вызванных радиацией эффектов, которая формирует центральное ядро радиационной биологии, повреждение клетки происходит во время или вскоре после облучения ядер клеток-мишеней, и потенциал для биологических последствий может быть выражен в пределах одного или двух поколений клеток. Этот феномен также включает в себя индуцированный радиацией коммунальный эффект, определяемый как возникновение клеточных эффектов в необлученных клетках, соседних с облученной клеткой (или клетками). Механизм эффекта ближайшего окружения еще неизвестен. Однако есть основания полагать, что эффект ближайшего окружения может иметь по крайней мере два способа для передачи повреждения от облученных клеток к их необлученным соседям: через межклеточные контакты или посредством факторов, экскретируемых клетками в среду. Основная цель работы состояла в изучении влияния 26S-протеасом на индукцию коммунального эффекта в клетках эпидермоидной карциномы A431 после рентгеновского облучения клеток. Протеасомы, располагающиеся обычно в ядре и цитоплазме, в стрессовых условиях способны мигрировать во внеклеточное пространство и могут быть импортированы соседними клетками. Нами была выдвинута гипотеза о том, что 26S-протеасомы могут выступать в качестве медиаторов вызванного радиацией коммунального эффекта. В ходе работы было обнаружено, что малые дозы рентгеновского облучения (0.5—3.0 Гр) вызывают в клетках A431 значительное (приблизительно двукратное) повышение синтеза протеасом. Методом иммуноблоттинга нами были выявлены также изменения субъединичного состава протеасом после облучения клеток, выражавшиеся в модификации этих белков. В частности, наблюдаемые изменения касались статуса фосфорилирования субъединиц протеасом по тирозину, серину и треонину. Добавление протеасом из облученных клеток в среду к контрольным клеткам также привело к изменениям субъединичного состава цитоплазматических протеасом, сравнимым с таковыми после рентгеновского облучения клеток. Таким образом, протеасомы могут рассматриваться как возможный медиатор коммунального эффекта при малых дозах рентгеновского облучения клеток A431.

Работа выполнена при финансовой поддержке Европейской комиссии по программе поддержки сотрудничества с третьими странами (грант 016698) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49606).

**ВВЕДЕНИЕ ЗАРОДЫШЕЙ ЛИЛИИ *Lilium regale* Wils. В КУЛЬТУРУ IN VITRO.** © А. А. Мухаметвафина, Р. К. Байбурина, Л. Н. Миронова. Ботанический сад-институт Уфимского научного центра РАН.

В литературе существует мнение о том, что у ряда видов растений (например, пиона уклоняющегося) эндосперм замедляет развитие зародыша. Для проверки этого явления был проведен эксперимент с семенами *Lilium regale*. Были использованы незрелые семена, находящиеся в еще зеленой и нераскрывшейся семенной коробочке (от момента завязывания должно пройти не менее 40—50 сут). Лучшее развитие эксплантатов происходит в варианте опыта с эндоспермом (вариант I). В варианте без эндосперма (вариант II) идет некроз, задерживается прорастание, образование луковички также задерживается на 1 нед. Рост побега и корня проростков в варианте II в отличие от варианта I идет слабее, листья недоразвитые, темные, скрученные. Луковички, образовавшиеся в культуре *in vitro*, начинают развиваться, давать побеги и корни. Так, 2-месячные проростки с эндоспермом и без него имели побеги длиной 3.48 и 2.25 см соответственно и корни длиной 2.13 и 1.40 см соответственно.

**МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК В ИНТЕРФАЗНЫХ КЛЕТКАХ.** © Е. С. Надеждина,<sup>1, 2</sup> И. Б. Бродский,<sup>1</sup> А. В. Бураков,<sup>2</sup> О. Н. Жаппарова,<sup>3</sup> О. В. Коваленко,<sup>2</sup> В. И. Родионов,<sup>4</sup> Н. А. Шанина,<sup>3</sup> А. А. Шпильман.<sup>5</sup> <sup>1</sup> Институт белка РАН, Пущино, elena.nadezhdina@gmail.com, <sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии Московского государственного университета, <sup>3</sup> Биологический факультет Московского государственного университета, <sup>4</sup> Медицинский центр университета Коннектикута, Фармингтон, США, и <sup>5</sup> Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета.

В интерфазных клетках млекопитающих микротрубочки (МТ) нередко образуют радиальную систему с центром в центросоме («звезду»). Звезда МТ, в которой минус-концы МТ собраны в центре, а плюс-концы находятся на периферии, создает анизотропию цитоплазмы, обеспечивающую направленное перемещение и позиционирование клеточных органелл. Принято считать, что звезда образуется из МТ, отрастающих от центросомы и связанных с ней, а тянущие силы, приложенные к плюс-концам МТ в клеточном кортексе, определяют симметричное расположение звезды в клетках. Однако получено немало фактов, противоречащих этому представлению. Для изучения механизмов формирования звезды МТ мы создали компьютерную модель динамики клеточных МТ и добились того, чтобы динамика виртуальных МТ соответствовала динамике реальных клеточных МТ. Модельные эксперименты показали, что в радиальной организации МТ определяющую роль играет процесс закоривания МТ в центре клетки, а не их нук-

леация на центросоме. Кроме того, оказалось, что важную роль играет взаимодействие МТ с клеточным кортексом. Мы решили выявить роль различных белков в образовании звезды МТ. Ранее было показано, что ингибирование моторного белка динеина, его кофактора динактина и протеинкиназы LOSK вызывает распад звезды МТ. В наших экспериментах оказалось, что инъекции в клетки Vero ингибирующих антител к динеину или инъекции белка динамитина, разрушающего динактиновый комплекс, действительно приводят к быстрой (в течение 40—60 мин!) хаотизации МТ, но не влияют на способность центросомы нуклеировать МТ. Антитела к динеину также не влияют на сборку МТ на центросоме *in vitro*. Ингибирование протеинкиназы LOSK, хаотизирующее МТ, не снижает способность центросомы нуклеировать МТ *in vitro*. Хаотизацию МТ наблюдали, кроме того, при ингибировании взаимодействия динеина с динактином при синтезе в клетках СС1-фрагмента белка динактина p150Glued, но нуклеирующая активность центросомы при этом воздействии еще недостаточно изучена. В целом можно утверждать, что нуклеация МТ на центросоме недостаточна для образования звезды МТ. В бесцентриолярных цитопластах клеток BS-C-1 и HeLa нередко сохраняется радиальная система МТ. Было высказано предположение о том, что МТ организуются аппаратом Гольджи. Однако диспергирование аппарата Гольджи брэфелдином А не привело к распаду звезды МТ. Хаотизация МТ в бесцентриолярных цитоплазмах происходила при действии на них оокадаевой кислоты, и это действие подавлялось брэфелдином А, что косвенно говорит об участии ERGIC (Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment) в организации МТ. Мы также обнаружили, что в стареющих (17 ч после энуклеации) цитопластах культивируемых клеток Vero система МТ хаотична. Однако центросома в них находится в геометрическом центре и сохраняет свою нуклеирующую активность. Причиной хаотизации системы МТ в данном случае оказалось нарушение взаимодействия плюс-концов МТ с клеточным кортексом. Таким образом, силы, располагающие центросому в центре клетки, приложены не к концам МТ, а действуют по всей их длине. Наши исследования показывают, что для формирования радиальной системы МТ в интерфазных клетках необходима активность динеин/динактинового комплекса, причем, вероятно, локализованного на них, помимо центросомы и аппараты Гольджи, органеллах.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 05-04-49015), по программе президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и по программе FIRCA.

**ПЕНТРАКСИНЫ В ПРОЦЕССАХ АПОПТОЗА.** © П. Г. Назаров, А. А. Бутюгов, А. П. Пронина. Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, p nazarov@pn.spb.edu.

Пентраксины — класс консервативных сывороточных и клеточных белков, участвующих в регуляции гомеостаза и защитных реакций млекопитающих и человека. Сывороточные пентраксины С-реактивный белок, сывороточный Р-компонент амилоида (SAP), белки РТХ-3 и РТХ-4 — защитные факторы врожденного им-

мунитета, участники и «маркеры» острого воспаления. Нейрональные пентраксины (NP-1, NARP) действуют в синапсах, регулируя сборку и активность глутамальных NMDA- и AMPA-рецепторов. Наиболее изученный пентраксин, С-реактивный белок (CRP), связывает микробные антигены, нейтрализует токсины, активирует комплемент. С клетками иммунной системы CRP взаимодействует через Fc-gamma-рецепторы. Этот пентраксин обладает сродством с фосфорилхолину, благодаря чему угнетает фосфолипазы, действуя как ингибитор неконкурентного типа (Назаров, 1997, 2001, 2005). Связываясь с лигандами, CRP вызывает их элиминацию путем фагоцитоза или отложение в тканях. Например, комплексы CRP с липопротеинами низкой плотности депонируются в сосудах, индуцируя апоптоз окружающих клеток, способствуя атерогенезу. По нашим данным, эффекты CRP в культуре клеток *in vitro* зависят от типа клеток. В первичной культуре нормальных лимфоидных клеток (мононуклеаров из крови человека и селезенки мышей) CRP стимулировал пролиферацию, синтез цитокинов, NK-активность. По отношению к нейтрофилам человека он вел себя как хемоаттрактант, усиливал продукцию активных форм кислорода, стимулировал экспрессию адгезионных интегринов и адгезию нейтрофилов к субстрату. В то же время в культурах клеток трансформированных линий (фибробластов L929 и L41) CRP вызывал гибель путем апоптоза. Индукция апоптоза зависела от определенных сайтов молекулы CRP и могла быть отменена при добавлении в культуральную среду лигандов CRP, связывающихся с пентраксином и нейтрализующих его. Отмену апоптоза клеток L929 под влиянием пентамерного CRP дозозависимо вызывал даже такой его лиганд, как поробразующий стрептококковый токсин стрептолизин O, сам способный вызывать апоптоз клеток. При эквивалентном соотношении CRP и стрептолизин O полностью нейтрализовали друг друга, и их смесь не вызывала гибели клеток. Имела значение и общая структура молекулы CRP: апоптогенной была нормальная пентамерная молекула, имеющая пять сайтов связывания, тогда как свободные мономерные субъединицы CRP, полученные диссоциацией при низких значениях pH, не вызывали апоптоза. Это свидетельствует о необходимости многоочечного связывания CRP с клеткой и перекрестной сшивки мембранных молекул. Мы показали, что лигандом CRP является также ацетилхолин (АХ), медиатор парасимпатической нервной системы и вненейрональной (автономной) холинергической регуляции иммунокомпетентных клеток. Наши данные свидетельствуют о том, что CRP связывает АХ и ингибирует его физиологическую активность. При введении CRP крысам вместе с АХ снижался гипотензивный эффект АХ и отменялась характерная для АХ брадикардия. Известно, что АХ и его аналоги обладают цитопротективным действием — снижают апоптоз и повышают жизнеспособность клеток (кардиомиоцитов, олигодендроцитов, нейронов), отменяя активацию каспазы-3 и падение мембранного потенциала митохондрий. АХ снижает эсайтотоксичность глутамата и окиси азота (NO) и подавляет индуцируемый этими факторами апоптоз нейронов. И наоборот, нехватка АХ (при холинергической денервации, болезнях Альцгеймера и Паркинсона) усиливает апоптоз в мозге за счет нарушения баланса между АХ и другими нейромедиаторами. Можно предполагать, что обнаруженное нами связывание АХ представляет собой механизм, с помощью которого пентраксин CRP вмешивается в регуля-

цию жизненных процессов многих типов клеток в острой фазе воспаления, в частности отменяя антиапоптотические эффекты этого АХ и способствуя апоптозу. Мы показали также, что введение CRP животным подавляло развитие сенсибилизации к антигену и снижало проявления анафилаксии при повторном контакте с антигеном (Нежинская, Назаров, 2004, 2005). Противоаллергические, антианафилактические эффекты CRP могут быть связаны с ингибирующим влиянием на функции тучных клеток — через FcγR и активацию ITIM-мотива и через холинергический путь, за счет инактивации АХ и ограничения его возбуждающего действия. Другие пентраксины также участвуют или могут участвовать в регуляции апоптоза. Это доказано для нейрональных пентраксинов, действующих в ЦНС, и, возможно, для SAP, который участвует в образовании амилоидных отложений в ЦНС и других органах при болезни Альцгеймера, что также сопровождается гибелью (апоптозом) клеток нервной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49629a).

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ АНТИОКСИДАНТ MitoQ ВЛИЯЕТ НА ЦИТОСКЕЛЕТ И ПОДВИЖНОСТЬ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ. © О. К. Непряхин,<sup>1</sup> Е. Н. Попова,<sup>2</sup> О. Ю. Плетьюшкин.<sup>3</sup> <sup>1</sup> Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета, [perpan@mail.ru](mailto:perpan@mail.ru), <sup>2</sup> Кафедра физиологии микроорганизмов Московского государственного университета и <sup>3</sup> НИИ физико-химической биологии Московского государственного университета.

Протоонкоген Ras, как известно, играет важную роль во многих клеточных процессах, в том числе в пролиферации, дифференцировке и организации цитоскелета. Было показано на различных типах клеток, что онкогенный эффект Ras, включающий в себя сильное изменение морфологии клеток, связан с продукцией активных форм кислорода. Для изучения их роли мы применяли митохондриально-направленный антиоксидант MitoQ (10-6'-убихинолил)децилтрифенилфосфоний). Была исследована структура активного цитоскелета клеток линии крысиного почечного эпителия IAR2 и линии IAR-C4, трансформированной мутантным онкогеном *N-Ras*, а также белки межклеточных и фокальных контактов. Экспрессия *N-Ras* приводит к сильным изменениям актинового цитоскелета, и преинкубация с антиоксидантами оказывает существенное влияние на этот эффект. Изучение распределения β-катенина показало, что митохондриальный антиоксидант MitoQ стимулирует переселение данного белка в ядро клетки. Как известно, β-катенин помимо участия в межклеточных взаимодействиях служит также транскрипционным фактором для ряда генов. Кроме того, мы ожидали, что преинкубация клеток линии IAR-C4 с антиоксидантом будет приводить к нормализации их морфологии и появлению межклеточных E-кадгериновых контактов, которые исчезают при гиперэкспрессии *N-Ras*. Данный результат в наших экспериментах получить не удалось. Мы наблюдали изменение подвижности эпителиальных клеток после обработки антиоксидантом. Было показано, что обработка эпителиальных клеток MitoQ приводит к значительному ускорению

заживления экспериментальной раны. Аналогичный эффект наблюдали у клеток, обработанных кондиционированной средой, собранной от клеточных культур, предварительно обработанных MitoQ. Мы предполагаем, что клетки после обработки MitoQ начинают выделять в среду факторы, изменяющие цитоскелет и подвижность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49062).

**ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ЛОКАЛИЗАЦИИ БЕТА-КАТЕНИНА В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ МЫШИ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ОНКОГЕНАМИ E1A И cHa-RAS, ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ HDAC.** © Ф. П. Никуленков,<sup>1, 2</sup> М. В. Абрамова,<sup>1</sup> С. Б. Светликова,<sup>1</sup> В. А. Поселов.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup> С.-Петербургский государственный политехнический университет, nikked@list.ru.

Известно, что многие ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDAC) способны останавливать пролиферацию трансформированных и опухолевых клеток. Это обусловлено изменением экспрессии генов, вовлеченных в клеточную пролиферацию, а также модуляцией активности различных сигнальных каскадов. Анализ литературных данных, а также результаты ранее проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что в индуцированной ингибиторами HDAC остановке пролиферации эмбриональных фибробластов мыши, трансформированных онкогенами E1A + cHa-ras, задействован Wnt/бета-катениновый сигнальный путь. Wnt/бета-катениновый сигнальный каскад играет важную роль в пролиферации, дифференцировке, межклеточной адгезии и трансформации клеток. Ранее было показано, что в упомянутых трансформированных фибробластах мыши происходит модуляция Wnt/бета-катенинового пути в ответ на действие ингибиторов HDAC за счет повышения стабильности цитоплазматического бета-катенина. Бета-катенин является центральным участником Wnt/бета-катенинового сигнального пути и вместе с транскрипционными факторами TCF/LEF участвует в регуляции транскрипции. С другой стороны, находясь на мембране, бета-катенин задействован в межклеточной адгезии и является структурным адапторным белком, который соединяет кадгерин с актиновым цитоскелетом. Таким образом, в зависимости от своей локализации бета-катенин модулирует активность Wnt/бета-катенинового сигнального пути. Для того чтобы проследить за влиянием ингибиторов HDAC на внутриклеточную локализацию бета-катенина, был использован иммунофлуоресцентный анализ. В пролиферирующих эмбриональных фибробластах мыши, трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras, обнаруживается незначительное количество бета-катенина, который практически весь расположен на плазматической мембране и участвует в межклеточных контактах. Обработка клеток ингибитором HDAC бутиратом натрия в течение 24 ч вызывает некоторое накопление бета-катенина в цитоплазме и ядре. При этом подавляющая часть бета-катенина остается на плазматической мембране. Действительно, полученные ранее данные иммуноблотинга показывают, что происходит

увеличение содержания как общего пула бета-катенина за счет повышения его стабильности в цитоплазме, так и увеличения ядерного. Известно, что фосфорилирование бета-катенина киназой Gsk3бета приводит к его протеасомной деградации. Химический ингибитор Bio IX подавляет активность киназы Gsk3бета и тем самым увеличивает стабильность не связанного с мембраной бета-катенина. Как и ожидалось, Bio IX также вызывает увеличение бета-катенина в цитоплазме и ядре, но этот эффект является более выраженным. Также бутират натрия вызывал некоторое увеличение содержания плазматического белка межклеточной адгезии, N-кадгерина. Клетки, трансформированные онкогенами E1A и cHa-ras, характеризуются дезорганизацией актинового цитоскелета. В пролиферирующих трансформантах E1A + Ras актин обнаруживается только в примембранном пространстве, колокализированный с бета-катенином. При этом бутират натрия параллельно с накоплением цитоплазматического бета-катенина приводит к появлению окрашивания актина и в цитоплазме. Таким образом, в E1A + cHa-ras-трансформантах ингибиторы HDAC вызывают увеличение доли бета-катенина в цитоплазме и ядре за счет повышения его стабильности и тем самым осуществляют модуляцию активности Wnt/бета-катенинового сигнального пути.

**РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ РОСТА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ В КУЛЬТУРЕ.** © Н. А. Одинцова, К. В. Яковлев, В. А. Дячук. Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток.

В отличие от клеток постоянных линий, обладающих способностью к безграничному делению, при культивировании клеток морских беспозвоночных удается прожить не более 3 пассажей, затем клетки деградируют в течение 3—4 мес, и культуры погибают (Ellis et al., 1985). Главная причина неудач находится в слабой пролиферативной активности клеток морских беспозвоночных. Вероятно, это связано с существованием сильного контроля процессов дифференциации. Так, например, описания истинных новообразований с неограниченным потенциалом роста у морских беспозвоночных очень редки (Steward, 1977). Однако диапазон исследований, проводимых на первичных культурах этих животных, достаточно широк, что связано с возможностью направленного воздействия на различные типы дифференцировки. Для стимуляции пролиферативной активности клеток мы применили два подхода: экзогенное введение факторов роста и использование генно-инженерных конструкций, содержащих чужеродные гены. Объектами исследования были клетки эмбрионов, личинок и регенерирующих тканей морских беспозвоночных. Ранее в тканях некоторых морских беспозвоночных нами обнаружен специфичный ростовой фактор, сходный с эпидермальным фактором роста. Способность этого фактора стимулировать рост клеток как позвоночных, так и беспозвоночных животных может отражать общие для них механизмы запуска синтеза ДНК. Мы установили, что экзогенное добавление этого фактора роста, а также некоторых известных факторов роста позвоночных значительно увеличивает уровень синтеза ДНК и число клеток в культуре как у моллюсков, так и у иглокожих. Кроме того, обнаружено, что чужеродные гены — дрожжевой ген *gal4* и агробактериальные онкогены (*rolB* и *rolC*) могут быть встро-

ены в геном морских ежей и оказывать сильное влияние на эмбриональное развитие этих животных. Доказана экспрессия этих генов в эмбриональных клетках трансгенных морских ежей, при этом достоверно увеличивается пролиферативная активность таких клеток. Впервые установлена возможность переноса генов Т-ДНК агробактерий в геном эмбрионов морских ежей в результате простого сокультивирования агробактерий с эмбрионами морских ежей. На электронно-микроскопическом уровне обнаружены контакты между агробактериями и эмбриональными клетками морских ежей, указывающие на пили-опосредованный механизм переноса. Предварительные эксперименты показали, что использование конструкции, содержащей ген *gal4* из дрожжей, может значительно повысить пролиферативную активность не только эмбриональных клеток, но и клеток регенерирующих тканей иглокожих. Нами разработаны условия культивирования, приводящие к миогенной дифференцировке в первичных культурах клеток мидии, полученных из личинок премиогенных стадий развития, а также исследован ряд их структурно-функциональных свойств. Варьируя условия культивирования (тип сыворотки, определенные лектины, субстраты), мы селективно культивировали различные типы клеток иглокожих и колониальных асцидий. Начата работа по анализу факторов, вовлеченных в детерминацию и поддержание плюрипотентности стволовых клеток этих животных в культуре. Управление процессами роста дифференцировки клеток морских беспозвоночных открывает перспективу их широкого применения в морской биотехнологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-96039) и президиума ДВО РАН (проекты 06-II-CO-06-025 и 06-III-B-06-214).

**ИЗУЧЕНИЕ СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЛИНИЙ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ.** © Т. Г. Орлова,<sup>1</sup> Г. Л. Минткевич,<sup>2</sup> Л. Л. Миронова,<sup>3</sup> О. И. Конюшко,<sup>3</sup> В. Д. Панова.<sup>3</sup>  
<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии РАМН, <sup>2</sup> Онкологический научный центр РАМН и <sup>3</sup> Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва.

В течение ряда лет проводилось всестороннее изучение функционирования системы интерферона (ИФ) в норме и патологии, что послужило основой исследований закономерностей индукции, продукции и действия этого важного цитокина с применением клеток человека и животных (Орлова и др., 2000). Это имеет отношение к теме симпозиума «Использование клеточной терапии». Впервые наряду со стандартной линией диплоидных клеток эмбриона человека М-19 для исследования интерферонового статуса у людей были использованы линия перевиваемых клеток семенника новорожденной зеленой мартышки 2688С и линия перевиваемых клеток почки телят Таурус-1. Кроме этого, эксперименты проводили с лейкоцитами здоровых доноров и больных, с монукулеарами (МН), с различными ИФ и их индукторами — вирусом болезни Ньюкасла (ВБН) и фитогемагглютинином (ФГА). При заражении культуры применяли вирус энцефаломиокардита (ЭМК), вирус везикулярного стоматита (ВВС) и вирус простого герпеса (ВПГ). В серии опытов были установлены зависимость

киллерного эффекта от количества добавленных в монослойную культуру МН, проявление цитопатогенного действия вирусов и их титрование после культивирования в смешанных культурах. Величина киллерного эффекта зависела от количества добавленных МН, а также от их состояния (активированные или нормальные). Показано влияние киллерного эффекта на репродукцию ВПГ, но не отмечено такового для ЭМК и ВВС. Это позволяет считать киллерный эффект одним из механизмов элиминации некоторых вирусов из организма. Были проведены лабораторные клинические определения ИФ-статуса у 62 детей, больных пиелонефритом, которых лечили антибиотиками и препаратом «Виферон». Действие оценивали на линиях клеток М-19, 2688С и Таурус-1. Клетки линии Таурус-1 оказались более чувствительными к альфа-ИФ (61.5 % детей). Также изучали ИФ-статус у 23 больных герпесом. Линия 2688С выявила высокую чувствительность к заражению ВПГ. ИФ-статус характеризовался как нормальными, так и сниженными показателями продукции альфа- и гамма-ИФ. Обследованы 34 больных хроническими гепатитами В и С, которые длительно применяли «Виферон» (в его состав входит реферон). Титрование остаточной ИФ-активности проводили на вышеуказанных линиях при использовании стандартных препаратов реферона. Наиболее чувствительными были системы Таурус-1 + ВВС и М-19 + ВВС. Несколько менее чувствительными оказались клетки 2688С. В результате проделанной работы получены новые данные, имеющие как теоретический интерес, так и возможность практического применения. Были выявлены наиболее чувствительные альфа-ИФ и линии перевиваемых клеток обезьян и телят, что очень важно для изучения проблемы альфа-ИФ, а также для титрования производственных препаратов этого белка и определения стандартных титров ИФ в международных единицах. Это особенно относится к линии клеток Таурус-1, так как не требуется предварительной инактивации вирусов-индукторов в пробах. Отсутствие видовой специфичности альфа-ИФ человека при титровании на клетках обезьян и телят не удалось подтвердить в отношении гамма-ИФ. Этот тип ИФ способен взаимодействовать только с клетками человека. Применение «Виферона» благоприятно влияло на функционирование системы ИФ обоих типов.

**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ СВОБОДНОГО КАЛЬЦИЯ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ IN VITRO.** © М. А. Осипенко,<sup>1</sup> Р. Р. Петрова,<sup>1</sup> Л. М. Межевикина,<sup>1</sup> О. М. Жерелова.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Институт биофизики клетки РАН и <sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, minj@mail.ru.

На эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) проводятся работы по двум основным направлениям: 1) исследование молекулярных и клеточных механизмов поддержания плюрипотентных свойств в течение длительного периода культивирования, 2) получение в культуре монукодифференцировки с применением различных экзогенных факторов и(или) методов генетической модификации. В большинстве работ отмечается, что в культуре *in vitro* в гетерогенной популяции ЭСК процент дифференцированных клеток в каком-то одном направлении очень

незначителен. На наш взгляд, для успешного решения проблемы управления развитием и дифференцировкой ЭСК, а также для повышения выхода клеток определенного фенотипа необходимо в первую очередь обратить внимание на ионный состав сред, в которых эти клетки культивируются. Особенно важно учитывать влияние ионов  $\text{Ca}^{2+}$  — универсальных вторичных мессенджеров сигнальных путей, участвующих во всех внутриклеточных процессах. В связи с этим целью наших исследований было выявление роли внеклеточного кальция в регуляции развития плюрипотентных ЭСК в условиях культуры *in vitro*. В качестве модели использовали ЭСК мыши линии R1. Их культивировали в среде DMEM с добавлением 10 нг/мл рекомбинантного цитокина LIF и 15 % фетальной сыворотки телят. Культивирование проводили в течение 2—3 сут при 37 °С в атмосфере 5 %  $\text{CO}_2$ . Для исследования роли кальция в среду добавляли EGTA- $\text{Ca}^{2+}$  — буферные растворы в концентрациях  $10^{-3}$ — $10^{-5}$  и  $10^{-7}$  М, а также  $10^{-3}$  М ЭГТА (для полного связывания ионов кальция в среде),  $10^{-7}$  М A23187 — активатора кальциевых каналов,  $10^{-7}$  М нифедипина — блокатора кальциевых каналов. Результаты культивирования клеток линии R1 оценивали по пролиферативной активности, времени удвоения популяции, скорости роста, а также по способности развиваться в плюрипотентном состоянии в виде отдельных монослойных колоний. Метаболическую активность ЭСК линии R1 оценивали с помощью МТТ-теста. Показано, что плюрипотентные клетки линии R1 способны развиваться в виде колоний без признаков дифференцировки и сохранять высокую пролиферативную и метаболическую активность при стабильном поддержании в среде культивирования ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации  $10^{-3}$ — $10^{-7}$  М. Оптимальная концентрация кальция для этой линии клеток —  $10^{-5}$  М. При такой концентрации клетки R1 развиваются так же активно, как и при использовании  $10^{-7}$  М активатора кальциевых каналов — ионофора A23187, который открывает вводящие  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы плазматической мембраны и таким образом увеличивает концентрацию внутриклеточного кальция подмембранного слоя. Стимулирующее влияние  $10^{-5}$  М  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA-буфера и ионофора A23187 на развитие клеток линии R1 выражалось в стабилизации клеточных циклов, увеличении скорости роста колоний, а также в защите клеточных мембран от повреждений. Блокатор кальциевых каналов дигидропиридинового ряда нифедипин в концентрации  $10^{-7}$  М, а также полное отсутствие ионов кальция в среде культивирования при добавлении  $10^{-3}$  М EGTA, напротив, подавляли пролиферативную активность клеток линии R1 и препятствовали адгезии, в результате чего плюрипотентные клетки не развивались в виде монослойных колоний, теряли метаболическую активность и быстро погибали. Таким образом, наши исследования показывают, что направление развития плюрипотентных ЭСК можно регулировать с помощью изменения ионного состава среды, использования активаторов, а также блокаторов кальциевых каналов. Эмбриональные стволовые клетки чувствительны к изменениям ионного баланса свободного кальция в среде культивирования. Этот ион можно рассматривать как потенциальный индуктор процессов пролиферации и поддержания ЭСК в плюрипотентном состоянии *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49521).

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ РОСТА ПЕРВИЧНЫХ ТКАНЕВЫХ КУЛЬТУР ВЗРОСЛЫХ ЖИВОТНЫХ. © В. П. Пащенко. Кафедра медицинской и биологической физики Северного государственного медицинского университета, Архангельск, pashenkov@mail.ru.

Изучение роста культур от микрофрагментов тканей животных различного возраста показало, что количество образующихся клеточных колоний и интенсивность их роста зависят от возраста, при его увеличении наблюдалось снижение роста культур, что могло свидетельствовать об уменьшении в тканях камбиальных клеток, способных к делению. В связи с этим представляет определенный интерес изучение количественных особенностей и закономерностей роста первичных тканевых культур от тканей взрослых животных. Для оценки этих особенностей мы провели изучение роста культур от кусочков ткани почек размером 0.2—0.3 мм<sup>2</sup>, полученных от мышей массой 18—20 г. Культивирование проводили в пробирках на поверхности подложки в 1 мл среды 199 с 10 % бычьей сывороткой и антибиотиками. Культуры фиксировали в смеси Буэна и окрашивали гематоксилином—эозином по Карацци. Для установления особенностей роста нами использован метод множественных культур на перфорированной подложке (Millipore), который обеспечивал случайный отбор эксплантируемых микрофрагментов (более 30), что позволяло оценить характер распределения роста культур, их вариабельность и другие статистические параметры (п.А11785530). Общий объем выборки составлял 540 микрофрагментов. Оценку площади зоны роста культур проводили с помощью рисовальной насадки и с последующей компьютерной обработкой. Результаты исследования показали, что образование клеточных колоний от микрофрагментов ткани происходит не одновременно. На 5-е сут культивирования только у 65 ± 5 % микрофрагментов образуются клеточные колонии, которые различались по площади и интенсивности роста. Наиболее интенсивно растущие клеточные колонии (3—5 %) имели площадь до 0.6 ± 0.2 мм<sup>2</sup>, в то время как у слабо растущих микрофрагментов наблюдалась миграция единичных клеток или образование колоний, не превышающих 0.20 ± ± 0.02 мм<sup>2</sup>. По мере увеличения срока культивирования процент растущих колоний увеличивался, однако не достигал 100 %. Интенсивно растущие клеточные колонии состояли преимущественно из эпителиоподобных клеток, растущих однослойно. Многослойный рост клеток наблюдался лишь вблизи центрального эксплантата. Единичные клетки фибробластоподобного типа располагались чаще всего на периферии клеточной колонии или образовывали небольшие включения в монослое эпителиоподобных клеток. Митотическая активность эпителиоподобных клеток в наиболее интенсивно растущих культурах достигала 17.7—18.9 %. Оценка площади клеточных колоний и распределение их по величине позволили проанализировать особенности их распределения. Проведенный анализ показал, что распределение частот размеров культур в случайной выборке характеризуется резкой положительной асимметрией ( $A = 1.46$ ), при этом средняя величина распределения близка к среднему квадратическому отклонению. В связи с этими признаками поиск наиболее адекватного закона их распределения показал, что распределение роста первичных тканевых культур достаточно хорошо аппроксимируется

резко асимметричным экспоненциальным распределением. Справедливость этого вывода была подтверждена при сопоставлении эмпирического и теоретического распределений. Таким образом, данная закономерность роста первичных культур в случайной выборке от микрофрагментов ткани аналогична процессам, которые также моделируются этим законом распределения, в частности долговечности технических изделий, продолжительности жизни биологических организмов, атомному распаду радиоактивных веществ. Полученные результаты и используемая методика позволяют более обоснованно использовать статистические критерии для изучения и оценки роста первичных тканевых культур, анализировать их возрастные особенности роста и оценивать количественные параметры, а также характер распределения в тканях клеток, сохраняющих высокую пролиферативную активность, в зависимости от возраста организма и патологических состояний.

**РАСПЛАСТЫВАНИЕ КАК АТРИБУТ КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ. I. ДВУХФАЗНОСТЬ РАСПЛАСТЫВАНИЯ КЛЕТОК.** © Ю. П. Петров, Т. А. Крылова, Н. В. Цупкина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, jpetrov@fromru.com.

Нетрудно предположить, что процесс распластывания клеток на твердой подложке должен описываться S-образной кривой (адаптация к новым условиям, логарифмическая фаза, выход на плато), поскольку распластываться беспредельно клетки не могут. Такие кривые можно получить, например, измеряя площадь подложки, занимаемую клеткой (area). Действительно, в первом приближении можно получить именно S-кривые. Однако оказалось, что реальные кривые распластывания отличаются от ожидаемых. На большинстве из них можно обнаружить некоторое промежуточное плато. Оно проявляется приблизительно через 60—90 мин после посадки клеток на субстрат. Проверая реальность этого феномена, мы использовали разные клетки (A-431, HEP-2, STO, человеческие эмбриональные мезенхимные клетки). В той или иной форме результаты были сходными. Это давало основание полагать, что явление это не случайно и характеризует процесс распластывания клеток на уровне популяции. Факт промежуточного плато на кривых распластывания говорит либо о двух механизмах распластывания, либо о двух относительно независимых фазах одного и того же процесса, что принципиально, вероятно, не имеет значения. Несмотря на то что это явление устойчиво и всеобщно, в конкретных случаях можно наблюдать преобладание одной из фаз. Например, попадая на «благоприятный» для себя субстрат, клетки начинают распластываться быстро. В этом случае создается впечатление, что первая фаза отсутствует. Мы не нашли в литературе работ, в которых исследовался бы обнаруженный нами феномен. Однако в работе, посвященной исследованию актопаксина, на одном из графиков можно увидеть то же самое явление (Clarke et al., *J. Cell Biol.*, 2004, **166** : 901—912). Исходя из своих задач авторы исследовали клетки, посаженные на коллаген. Из этих данных тоже следует, что промежуточное плато проявляется в пределах 60—90 мин. Нет сомнения, что процесс распластывания сложен и в нем участвуют различные системы и компоненты клетки, однако, как мы полагаем, корни этого процесса надо искать в свойствах

актина, которые детерминируют реорганизацию цитоскелета.

**РАСПЛАСТЫВАНИЕ КАК АТРИБУТ КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ. II. ТИП ПОДЛОЖКИ НЕ ОКАЗЫВАЕТ КАЧЕСТВЕННОГО ВЛИЯНИЯ НА ХАРАКТЕР РАСПЛАСТЫВАНИЯ КЛЕТОК.** © Ю. П. Петров, Т. А. Крылова, Н. В. Цупкина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, jpetrov@fromru.com.

Принимая во внимание тот факт, что в литературе имеется достаточно много данных, указывающих на зависимость формы клеток от типа подложки, мы рассчитывали обнаружить на уровне популяции группы клеток с преобладанием той или иной формы. Полагая, что форма и размер (area) клетки тесно связаны, были исследованы соотношения клеток с разной area (или perimeter) в зависимости от степени их распластности при различных условиях (пластик, матригель, ВКМ, кондиционированная среда). О степени распластности судили по предложенному нами коэффициенту распластывания (соотношение радиусов, полученных при измерении perimeter и area клетки). Исследуя большие выборки (до 1—2 тыс. клеток на точку), мы не выявили ожидаемой кластерности ни в одном случае. Однако было обнаружено, что взаимосвязь размера клетки со степенью ее распластности описывается одной и той же линейной зависимостью, которая детерминирована типом клеток и не зависит от условий, в которых находятся клетки, т. е. мы не обнаружили качественных различий в распластывании клеток в зависимости от субстрата. При этом были выявлены количественные различия — тип подложки влиял на скорость распластывания. Например, одни и те же клетки на матригеле распластываются быстрее, чем на пластике, но и в обоих случаях не изменяется линейный характер взаимосвязи между размером клетки и коэффициентом распластности, присущий данному типу клеток. Повлиять на скорости распластывания клеток можно, однако, не только подложкой, но и, например, изменением концентрации клеток при посеве. Увеличение количества клеток при посеве способствует ускорению распластывания клеток. Значительное влияние на скорость распластывания клеток оказывают условия предварительного культивирования. При этом для одного и того же типа клеток упоминаемая выше характерная для этих клеток линейная зависимость сохраняется.

**РАСПЛАСТЫВАНИЕ КАК АТРИБУТ КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ. III. ДИНАМИКА ПОЛИМЕРИЗАЦИИ И КРИТИЧЕСКАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ АКТИНА — ОСНОВА МЕХАНИЗМА РАСПЛАСТЫВАНИЯ.** © Ю. П. Петров, Т. А. Крылова, В. П. Першина. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, jpetrov@fromru.com.

Природная особенность актина одновременно и полимеризоваться, и диссоциировать позволяет клетке не только двигаться, но и распластываться. Как было сказано в предыдущих наших тезисах (см. выше), клетки любой клеточной популяции имеют свой специфический тип распластывания. Мы полагаем, что он в первую очередь детерминируется спецификой сборки и разборки актиновых филаментов у данного типа клеток. Однако у актина есть еще одно свойство. Только при достижении

некоторой концентрации (критической) глобулярный актин начинает полимеризоваться. Можно показать, что при увеличении концентрации глобулярного актина происходит постепенное, но линейное увеличение вязкости раствора. Вязкость раствора, характеризующая степень полимеризации актина на steady state, также увеличивается линейно в зависимости от концентрации мономерного актина. Поскольку обе линейные зависимости имеют разные углы наклона, место их пересечения (критическая концентрация актина) говорит о резком переходе одного процесса в другой. Надо полагать, что этот процесс имеет место и в клетках. Значит, должен существовать его феноменологический эквивалент, связанный, в частности, с клеточным распластыванием. Мы обнаружили, что на начальных этапах распластывания, когда форма клеток близка к кругу, они бывают двух типов — круглые мелкие и круглые большие. На уровне клеточной популяции такая кластерность определяется отчетливо. Она однозначно говорит о том, что переход клеток от одного состояния (мелкие) к другому (большие) очень быстрый, т. е. все промежуточные формы неустойчивы. Мы полагаем, что такой переход клеток от одного состояния к другому как раз и детерминируется «переключателем», в основе которого должен лежать феномен критической концентрации актина.

**БЫСТРЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ СИСТЕМЫ АКТИНОВЫХ МИКРОФИЛАМЕНТОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ, ПОДВЕРГНУТЫХ ДЕЙСТВИЮ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ.** © Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, pinaev@mail.cyt-spb.rssi.ru.

Многочисленными исследованиями показано, что белки внеклеточного матрикса, ростовые факторы и ряд других биологически активных молекул, взаимодействуя с поверхностными рецепторами адгезивных культивируемых клеток, образуют лиганд-рецепторные комплексы, с которыми связываются цитоскелетные белки, и формируют актинсодержащие структуры. Действующие на клетки в культуре белки и пептиды могут находиться в среде в растворенном состоянии или быть иммобилизованными на субстрате, на котором растут клетки. Наши многолетние исследования показали, что характер пространственной организации формируемого актинового цитоскелета при распластывании нормальных и трансформированных клеток на иммобилизованных белках специфичен для каждого типа лиганда. При действии на клетки с развитым цитоскелетом растворенных в среде брадикинина, лизофосфатидиловой кислоты и эпидермального фактора роста, активирующих малые ГТФазы (Rho, Rac и Cdc42), происходит быстрая (в течение 10 мин) разборка цитоскелета с последующим его восстановлением через 30 мин. Подобная быстрая реорганизация актинового цитоскелета наблюдается также при действии на клетки конканавалина, трихостатина, TNF $\alpha$  и ряда других биологически активных молекул. В тех случаях, когда при действии длительного сывороточного голодания в клетках происходит разборка сформированного цитоскелета, те же растворенные молекулы, напротив, вызывают восстановление актиновых структур. В неадгезивных клетках, например в макрофагах, под действием активирующих молекул также происходит формирование структур цитоскелета. Представля-

ют интерес данные, свидетельствующие о том, что действие одних и тех же молекул на реорганизацию цитоскелета зависит от того, находятся они при взаимодействии с клетками в растворенном состоянии или иммобилизованы на субстрате. В первом случае они вызывают обратимую разборку системы микрофиламентов. Во втором случае они способствуют формированию специфичных актиновых структур. Особенности характера действия на клетки одних и тех же растворенных и иммобилизованных лигандов определяется, по-видимому, различием их конформации. На начальных этапах быстрой реорганизации цитоскелета под влиянием растворенных лигандов активное участие в формировании новых структур принимают  $\beta$ -актин и Agr2/3, которые в 1-е мин после внесения лиганда в среду концентрируются на периферии клетки под плазматической мембраной и в раффлах. Совокупность полученных данных приводит к следующим заключениям. Действие любых внешних биологически активных молекул, регулирующих поведение клеток в культуре, сопровождается быстрой реорганизацией актинового цитоскелета. Иммобилизованные лиганды или внеклеточный матрикс, на которых распластываются культивируемые клетки, играют определяющую роль в характере пространственной организации системы актиновых микрофиламентов. В связи с тем что многие актинсвязывающие белки помимо участия в организации структуры цитоскелета исполняют роль матриц, на которых собираются молекулы сигнальных каскадов, можно предположить, что быстрые перестройки цитоскелета под влиянием внешних лигандов приводят к перепрограммированию внутриклеточных сигнальных систем. Определение состава белковых комплексов, связанных со структурами цитоскелета, формирующихся в клетках под влиянием внешних лигандов, даст возможность проверить справедливость высказанного предположения.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 03-04-48251), и по программе поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-1244.2003.4).

**ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ПОЧКИ ПРИ ИШЕМИИ/РЕОКСИГЕНАЦИИ.** © Е. Ю. Плотников, А. К. Васильева, Д. Б. Зорков. НИИ физико-химической биологии Московского государственного университета.

Воздействие на клетки гипоксии и последующей реоксигенации является мощным стрессорным фактором при трансплантации органов, образовании тромбов, а также при сильно выраженной артериальной гипотензии. Такое чередование гипоксии и реоксигенации приводит к состоянию «окислительного стресса», который является сильно выраженным и в значительной мере необратимым деструктивным процессом, ограничивая, таким образом, стратегию вмешательства в жизнедеятельность органа. В настоящей работе окислительный стресс исследовали на модели ишемии/реоксигенации первичной смешанной культуры почки крыс, поскольку острая почечная недостаточность, спровоцированная ишемией, а также необходимость хирургических вмешательств делают чрезвычайно востребованным изучение механизмов окислительного повреждения и стратегий защиты от него применительно именно к почечной ткани. Было об-

наружено, что воздействие на клетки только гипоксии (до 24 ч) с последующей реоксигенацией не приводит к существенной гибели клеток, тогда как сочетание гипоксии (24 ч) с лишением клеток питательных субстратов (ишемия) приводит к гибели в ходе дальнейшей реоксигенации до 50—60 % клеток. Исследование клеток с помощью окраски 2,7-DCF-зондом на активные формы кислорода (АФК) и конфокальной микроскопии выявило вспышку АФК, происходящую в клетках непосредственно после ишемии и затухающую к 60 мин реоксигенации в основной массе клеток. При этом особенно важным представляется изменение структуры митохондриальной сети в клетках, генерации в клетках, подвергшихся ишемии/реоксигенации. Конфокальная микроскопия после окраски митохондриальным красителем TMRE показала, что во многих клетках сеть митохондрий распадается на мелкие фрагменты, сохраняющие мембранный потенциал. Эта фрагментация выражена преимущественно в клетках, длительно и активно продуцирующих АФК в ходе реоксигенации. Колоколизация красителей DCF и TMRE указывает на преимущественную генерацию АФК в митохондриях, особенно во фрагментированном хондриоме. Оказалось также, что клетки почки, подвергшиеся ишемии/реоксигенации, начинают более активно генерировать оксид азота. Причем при двойном окрашивании TMRE и зондом на оксид азота DAF-2 выявлено, что продукция NO ассоциирована также с митохондриями. Начато исследование потенциальных способов защиты культуры клеток почки от повреждающего действия ишемии/реоксигенации. Исследовали фармакологическое preconditionирование хлоридом лития и инсулином. Эти агенты подавляют открытие неспецифической митохондриальной поры через инактивацию киназы GSK-3 $\beta$ . В ряде экспериментов обработка клеток хлоридом лития или инсулином перед ишемией предотвращала фрагментацию митохондриального ретикула. Однако эти результаты требуют дальнейшего подтверждения, поскольку в ряде случаев предобработка хлоридом лития или инсулином снижала генерацию АФК во время реоксигенации, но не предотвращала фрагментацию. Таким образом, в настоящем исследовании было показано нарушение работы митохондриального аппарата клеток почки при ишемии/реперфузии, в том числе фрагментация митохондрий. Обнаружено усиление продукции АФК и NO в клетках почки, подвергшейся ишемии/реперфузии. Кроме того, показано митохондриальное происхождение АФК и NO. Эти данные подтверждают центральную роль митохондрий в механизмах развития окислительного стресса в условиях ишемии. Очевидно, именно митохондрии могут служить мишенями фармакологического воздействия для предотвращения негативных последствий ишемии и снижения деструктивного влияния окислительного стресса. Полученные результаты могут явиться основой для дальнейшей разработки фармакологических препаратов, способных уменьшать или предотвращать патологические изменения при острой почечной недостаточности или оперативных вмешательствах.

**СРАВНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛИЯ И НАТРИЯ В МЫШЕЧНОЙ КЛЕТКЕ СЕРДЦА В ТКАНИ И ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ.** © М. А. Погорелова,<sup>1,2</sup> А. М. Аксиров,<sup>1</sup> А. Г. Погорелов.<sup>1,3</sup> <sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Pogorelov@iteb.ru,

<sup>2</sup> Биологический факультет Московского государственного университета и <sup>3</sup> Факультет биофизики и биомедицины Пущинского государственного университета.

Культивируемая клетка является перспективной моделью для изучения прямого действия лекарств и биологически активных веществ на клеточную функцию. Однако возникает вопрос о соответствии нормальной физиологии клетки ее состоянию в культуре. Данная проблема связана с тем, что при получении культур и их поддержании исключается естественный нейрогуморальный контроль, что вызывает неконтролируемое изменение клеточного гомеостаза. Например, для гепатоцита (Warley et al. In: Science of biological specimen preparation. 1986, Chicago) и нейрона (Pogorelov et al. Scanning Microsc., 1994, 8: 101—108) показано, что концентрация основных цитоплазматических катионов (K<sup>+</sup> и Na<sup>+</sup>) в культуре отличается от их внутриклеточного содержания в ткани. Целью настоящей работы был сравнительный анализ концентрации калия в цитоплазме кардиомиоцита в первичной культуре и в ткани сердца. Концентрацию калия в мышечной клетке сердца крысы Wistar определяли на срезах толщиной 2 мкм электронно-зондовым микроанализом (Pogorelov et al. J. Microsc., 1991, 12: 24—38). При подготовке образцов использовали низкотемпературную фиксацию. Показано, что первичная культура кардиомиоцитов содержит три типа клеток, различающихся по концентрации элементов, форме и размеру. Предполагается, что различие в Na/K-балансе у разных типов миоцитов обусловлено нарушением клеточной мембраны при дезинтеграции сердечной ткани во время методики выделения первичной культуры. Клетки прямоугольной формы, которые при электрофизиологических измерениях классифицированы как «нормальные», показывают содержание калия, близкое по величине к внутриклеточной концентрации элемента в ткани. Результаты электронно-зондового анализа позволяют сделать вывод о том, что цитоплазматическая концентрация калия является параметром, который наиболее быстро реагирует на изменение статуса клетки. Популяция клеток в первичной культуре кардиомиоцитов неоднородна. Только прямоугольные клетки могут быть адекватной моделью интактного состояния по критерию цитоплазматического Na/K-баланса. При работе с культурой следует учитывать возможность трансформации клетки, обусловленной несоответствием культуральной среды той природной нише, в которой клетка развивается и функционирует в условиях ткани.

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РАЗЛИЧНЫХ ЦИТОКИНОВ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ В ПРОЦЕССЕ ИХ ПАССИРОВАНИЯ.** © Р. Я. Подчерняева,<sup>1</sup> Г. А. Данлыбаева,<sup>1</sup> И. М. Сургучева,<sup>2</sup> М. В. Мезенцева.<sup>2</sup> <sup>1</sup> ГУ НИИ вирусологии РАМН, cells@rambler.ru, и <sup>2</sup> ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии РАМН, Москва.

Целью работы было изучение особенностей экспрессии генов цитокинов в клеточных культурах при длительном пассировании. Мы исследовали диплоидные клетки легкого человека (ЛЭЧ) и перевиваемые клеточные линии A<sub>549</sub> (клетки легкого человека), L<sub>41</sub> (клетки костного мозга, выделенные от больного лейкемией, клон J<sub>96</sub>), HeLa (клетки, выделенные от больной раком шейки мат-

ки), МДСК (почки собаки) и L<sub>929</sub> (фибробласты мыши) после 1-го и 10-го пассажей культивирования. В этих линиях клеток в динамике определяли мРНК 11 цитокинов (ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12 и ИЛ-18). Известно, что в отличие от перевиваемых клеточных линий диплоидные клетки млекопитающих в процессе пассирования претерпевают ограниченное число клеточных делений, перед тем как переходят в нечувствительное непролиферирующее состояние. Они имеют ограниченную продолжительность жизни и не растут после определенного числа пассажей, прекращая делиться, и в конце концов погибают. В течение процесса «старения» эти клетки претерпевают как количественные, так и качественные изменения. Нами показано, что в отличие от клеток ЛЭЧ 1-го пассажа после 15 последующих пассажей у них наблюдалось угнетение синтеза ИЛ-8, а после 23 пассажей угнетался синтез ИЛ-10 и ИЛ-18. Помимо диплоидных клеток нами изучен ряд перевиваемых клеточных линий, в том числе клетки легкого человека A<sub>549</sub> до и после 10 пассажей. Перевиваемая клеточная линия легкого человека (A<sub>549</sub>) 1-го пассажа продуцировала почти все интерлейкины, за исключением ИФН- $\gamma$ , ИЛ-10 и ИЛ-12. После 10 пассажей этой линии наблюдалось угнетение синтеза ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-18 и ФНО. Таким образом, отмечено различие в экспрессии генов цитокинов на разных стадиях культивирования клеток в зависимости от линии. Так, при пассировании клеток L<sub>41</sub> угнетался синтез мРНК противовоспалительного цитокина ИЛ-4, но активировались мРНК ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8 и ИЛ-18, секретируемые клетками макрофагального типа. Особенно заметно изменялся цитокиновый профиль в культуре клеток МДСК после 10-го пассажа, в том числе не обнаруживалось конститутивно вырабатываемых мРНК ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12 и ИЛ-18, которые ответственны также и за процессы апоптоза. При длительном пассировании клеток L<sub>929</sub> была дополнительно отмечена экспрессия гена провоспалительного цитокина ИЛ-6. Полученные результаты свидетельствуют об изменении продукции цитокинов в клеточных культурах в зависимости от длительности их культивирования. При этом отмечено снижение чувствительности к ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  практически у всех клеточных культур на поздних пассажах. Возможно, это связано с изменением профиля цитокинов в клеточных линиях.

**ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИИ КЛЕТОК МЫШИ NIH/3T3 С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ БЕЛКА ЯДРЫШКА SURF-6.** © М. А. Ползиков, Р. В. Корец, А. А. Прудкогляд, О. В. Зацепина, Л. Г. Романова. Институт биоорганической химии РАН. Москва, polzikov@ibch.ru

Белок SURF-6 относится к одним из наименее изученных множественных белков ядрышек клеток млекопитающих. Он был открыт в 1996 г. как продукт экспрессии гена *Surf-6*, являющегося одним из членов локуса *Surfeit* в геноме мыши (Magoulas, Fried, 1996). У млекопитающих белок SURF-6 относится к эволюционно-консервативным белкам «домашнего хозяйства», а в клетках мыши линии NIH/3T3, по-видимому, принимает участие в процессинге рибосомной РНК (рРНК) и регуляции клеточного цикла (Гурченков и др., 2005; Polzikov et al., 2005). Однако роль белка SURF-6 в метаболизме клеток высших эукариот до сих пор остается неизвестной. Для ответа на этот вопрос в настоящей работе мы разработа-

ли методику получения линии клеток мыши NIH/3T3, стабильно трансфицированных плазмидой, кодирующей полноразмерный ген *Surf-6* мыши, с использованием Tet-On-системы экспрессии генов в культивируемых клетках млекопитающих (Clontech, США). Были использованы две плазмидные конструкции. Первая плазида обеспечивала устойчивость клеток к G418 (неомицину) и кодировала транскрипционный трансактиватор белок rtTA (Urlinger et al., 2000), который, связываясь в клетке с доксициклином, способен активировать двунаправленный тетрациклинзависимый элемент второй плазмиды, рBI-SURF-6. Вторая плазида рBI-SURF-6, созданная нами в ходе работы, содержала кДНК белка SURF-6 и ген зеленого флуоресцирующего белка EGFP, а также последовательность ДНК, обеспечивающую устойчивость клеток к пурамицину. Получение линии клеток NIH/3T3 с повышенным содержанием SURF-6 производилось в два этапа. Сначала с помощью реактива для трансфекций (Invitrogen, США) и 30-суточного культивирования в присутствии G418 были получены клетки, стабильно трансфицированные плазмидой, кодирующей rtTA. Затем такие клетки трансфицировали вектором рBI-SURF-6 и культивировали в среде, содержащей G418 и пурамицин, в течение 30 сут. В результате были получены клоны клеток NIH/3T3, нечувствительные к двум селективным антибиотикам, присутствующим в культуральной среде. Под воздействием доксициклина в этих клетках проявлялась экспрессия EGFP, причем доля GFP-положительных клеток составляла более 90 % от всей клеточной популяции. ПЦР с использованием геномной ДНК, выделенной из полученной стабильной линии клеток, подтвердила наличие встроенной в геномную ДНК плазмиды рBI-SURF-6. Иммуноблоттинг тотальных лизатов трансфицированных клеток с использованием специфических антител к SURF-6 выявил многократное увеличение содержания белка на 2-е сут после добавления доксициклина по сравнению с клетками, выращиваемыми без индуктора. Иммуноцитохимический анализ трансфицированных клеток показал увеличение интенсивности окрашивания ядрышек антителами к белку SURF-6, причем общий характер мечения ядрышек совпадал с таковым у клеток, в которых происходит сверхэкспрессия другого ядрышкового белка — фибрилларина (Sheval et al., 2005). Таким образом, фибробласты мыши линии NIH/3T3 оказались адекватной моделью для использования системы «Tet-On» в культуре клеток млекопитающих. С их использованием нам удалось впервые получить линию стабильно трансфицированных клеток, пригодных для направленной регуляции сверхэкспрессии гена белка ядрышка SURF-6. Полученную линию в дальнейшем предполагается использовать для изучения влияния повышенного содержания белка SURF-6 на пролиферативный статус клеток, прохождение клеточного цикла и процессы, связанные с биогенезом рибосом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-48391).

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КАРИОТИПИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ В ДВУХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ПОЧКИ КЕНГУРОВОЙ КРЫСЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ИММОБИЛИЗОВАННОМ ФИБРОНЕКТИ-**

НЕ. © Г. Г. Полянская, Т. С. Горячая, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Образование постоянных клеточных линий, их длительное существование вне организма происходят посредством адаптации клеточной линии к измененным условиям, которая, в частности, выражается в определенных количественных и структурных изменениях кариотипа, в результате чего создается сбалансированная кариотипическая структура, обеспечивающая оптимальный генный баланс в клеточной популяции *in vitro* как целостной системе. Сбалансированная кариотипическая структура характеризуется определенным набором маркерных хромосом («маркерные») линии или соответствием кариотипу донора («безмаркерные») линии, выраженной в большей или меньшей степени частотой клеток с модальным числом хромосом, частотами клеток с другими числами хромосом, определенными пределами изменчивости по числу хромосом. Клетки с выраженным числом хромосом имеют преобладающий структурный вариант кариотипа (СВК — число гомологичных хромосом каждого морфологического типа) и дополнительные СВК. Клеточные линии являются динамичными системами и, лишившись многоступенчатого организменного контроля, в значительной степени подвержены влиянию внешних факторов. Первопричиной всех наблюдаемых кариотипических изменений, безусловно, являются различные изменения в клеточном метаболизме, обусловленные нарушениями в проведении сигналов с поверхности клеток на ядро. Поэтому представляется существенным связать свойства клеточной поверхности с кариотипическими характеристиками клеток. Перспективным подходом к выяснению возможных конкретных связей между рецепторами клеточной поверхности и кариотипической структурой является исследование влияния разных субстратов, на которых культивируются клетки, на кариотипическую изменчивость клеточных линий. Клетки растут на субстрате, покрытом внеклеточным матриксом, состоящим из разных белков, синтезируемых самими клетками. Известно, что белки внеклеточного матрикса различаются по своим свойствам и по тому влиянию, которое они оказывают на клетки. В предыдущих исследованиях был показан разный характер кариотипической изменчивости при культивировании на ламинине двух клеточных линий почки кенгуровой крысы, различающихся по числу гомологичных хромосом (гипотриплоид и гиподиплоид). В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ кариотипической изменчивости в этих линиях при культивировании на фибронектине. Показано, что при культивировании клеточной линии NBL-3-17 (гипотриплоид) на поверхности, покрытой фибронектином, в течение 1, 2, 4 и 8 сут существенно изменяется характер количественной кариотипической изменчивости по сравнению с контрольными вариантами. Усиление количественной кариотипической гетерогенности клеточной популяции происходит за счет достоверного изменения общего распределения клеток по числу хромосом, обусловленного достоверным снижением частоты клеток с модальным числом хромосом и достоверным увеличением клеток с меньшими числами хромосом. Анализ распределения индивидуальных хромосом показал, что при культивировании на фибронектине в течение 1—8 сут имеет место существенное увеличение типов дополнительных СВК, что также свидетельствует об усилении кариотипической гете-

рогенности. При культивировании клеточной линии NBL-3-11 (гиподиплоид) на поверхности, покрытой фибронектином, в течение 1—8 сут существенных изменений в характере количественной кариотипической изменчивости по сравнению с контрольными вариантами не обнаружено. Наблюдается только небольшое увеличение кариотипической гетерогенности на 4-е и 8-е сут, связанное с увеличением типов дополнительных СВК. При культивировании линии NBL-3-17 на фибронектине в течение 1—8 сут частота хромосомных аберраций не отличается от соответствующих контролей, а в линии NBL-3-11 существенно увеличивается. Увеличение составляет в среднем 40 %. Причина наблюдаемых различий в характере кариотипической изменчивости между клеточными линиями NBL-3-17 и NBL-3-11, возможно, состоит в изменении генной экспрессии, а именно дозы некоторых генов, так как результат полимеразной цепной реакции со случайными праймерами свидетельствует о сходстве первичной структуры ДНК в них. Следовательно, линии различаются только числом гомологичных хромосом (гипотриплоид и гиподиплоид).

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНТАМИНАЦИИ ПОСТОЯННЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ. © А. П. Пономарев, Б. Л. Манин, В. Н. Герасимов. ФГУ Федеральный центр охраны здоровья животных. Владимир.

При крупномасштабном культивировании постоянных клеточных культур, предназначенных для производства противовирусных вакцин, выявление контаминирующих агентов и их устранение остается наиболее актуальной проблемой. К одной из форм бактериального загрязнения культур клеток, не вызывающей банального пророста, но требующей пристального внимания, относятся микоплазмы. Многочисленными исследованиями установлено, что основным источником контаминации является сыворотка крупного рогатого скота (КРС), используемая в больших количествах в производственных условиях. В задачу настоящих исследований входило выявление контаминирующих агентов в содержимом коммерческих серий сывороток, используемых для культивирования клеток, крови КРС и в 12 клеточных линиях из коллекции культур клеток нашего центра с использованием метода электронной микроскопии. При закладке в музей для длительного хранения при температуре  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  культуры клеток контролируются различными методами на наличие контаминирующих агентов. Благодаря тому что музейные культуры клеток поддерживаются с использованием фетальных сывороток известных фирм (Serva, Bioclot и др.), контаминация в их содержимом выявляется редко. После размораживания первый пассаж также проводится на эмбриональной сыворотке. После того как клеточная культура набирает нормальный ритм пролиферации, фетальную сыворотку заменяют сывороткой крови КРС. При снижении пролиферации клеточных культур контаминирующие агенты, находящиеся в сыворотке крови, активизируются, что сопровождается их адгезией на мембране клеток с формированием колоний. Морфологически это выражается в увеличении зернистости клеток, межклеточные пространства плохо контрастируются, появляются волокнистые образования. Под люминесцентным микроскопом это выглядит в виде зернистых скоплений зелено-оранжевого цве-

та. Для электронной микроскопии использовали образцы сывороток крови, культуральные жидкости и собственно клетки, снятые со стекла. Методика подготовки образцов для электронной микроскопии изложена ранее в работе Пономарева и Мищенко (2005). Исследования в течение ряда лет содержимого культуральных жидкостей и сывороток крови показали присутствие наряду с клетками микоплазм в отдельных образцах повышенных концентраций агента, которые первоначально мы охарактеризовали как вирусоподобные частицы. Морфологически выявляемые структуры были представлены сферическими частицами диаметром от 20—30 до 100—150 нм в концентрации от  $10^6$  до  $10^9$  частиц в 1 мл. Данные структуры выявлялись преимущественно в содержимом клеточных линий коровьего происхождения. Для более обстоятельного анализа данного феномена наряду с сыворотками были исследованы образцы крови. Установлено, что в крови от отдельных особей КРС выявляются своеобразные клетки, которые по морфологическим признакам были нами отнесены к микоплазмам. Клетки отличались выраженным плеоморфизмом: сферы диаметром от 20 до 100—150 нм, нити и палочки различной протяженности, структуры гантелевидной формы, торы и др. Сферические структуры диаметром 50 нм и более имели выраженное двухкомпонентное строение: цитоплазматическое ядро, окруженное мембраной толщиной 15—20 нм. В структуре клеток с отчетливо выраженными признаками бинарного деления цитоплазматическое вещество распределялось по полюсам. Диаметр палочковидных клеток на стадии, предшествующей делению, составлял 80 нм при общей длине 280—320 нм. В структуре нитей диаметром 50—60 нм и длиной до 1 мкм иногда отчетливо просматривалась фрагментация внутреннего содержимого как стадия, предшествующая распаду нити на элементарные тельца. По морфологическим признакам данный вид размножения типичен для большинства прокариот. Неоднократные попытки идентифицировать данный вид микроорганизмов из содержимого крови и сывороток КРС, а также из культур клеток коровьего происхождения (МДБК, почки телят и др.) с применением полимеразной цепной реакции на их принадлежность к семейству микоплазм не привели к успеху. Из анализа литературы следует, что в сыворотке крови телят может присутствовать недавно открытый патоген — нанобактерии. Этот вид бактерий специфичен и культивируется в крови и сыворотке млекопитающих. Сегодня это мельчайшая бактериальная форма, известная науке. Нанобактерии отличаются плеоморфизмом, диаметр сферических клеток от 20—30 до 500 нм, т. е. по морфологии они соответствуют выявляемым нами структурам. Исследователи считают, что нанобактерии относятся к одному из агентов, контаминирующих клеточные культуры (Folk, 1998; Баранник, 2002). Считаю, что данная проблема заслуживает самого пристального внимания, она активно разрабатывается в наших исследованиях.

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЕМЫХ ИНГИБИТОРАМИ ГИСТОН-ДЕАЦЕТИЛАЗ, В КЛЕТКАХ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ОНКОГЕНАМИ *E1A* И *cHa-ras*.** © В. А. Пошлов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Одна из причин резистентности опухолевых клеток связана с дефектами работы негативных регуляторов

клеточного цикла (тумор-супрессоров p53, pRb и др.), вызванных мутациями или инактивацией вирусными онкогенами. Ингибиторы гистон-деацетилазной активности (ИГДА) способны модулировать в опухолевых клетках с deregулированным клеточным циклом транскрипцию достаточно большой группы генов, которые являются как позитивными, так и негативными регуляторами пролиферации, что приводит к супрессии пролиферации, блоку клеточного цикла или апоптозу. Процесс опухолевой трансформации включает в себя различные формы ремоделинга структуры хроматина, который связан с обратимыми локальными переходами его из активного состояния в неактивное. Баланс гистон-ацетилазной (НАТ) и гистон-деацетилазной (HDAC) активности, определяющий степень ацетилирования нуклеосомных гистонов и соответственно доступность хроматина для транскрипции, представляет собой один из основных механизмов эпигенетического контроля. Ингибиторы гистон-деацетилазы влияют на баланс активности НАТ/HDAC и тем самым способны видоизменять параметры эпигенетического контроля экспрессии генов. В настоящей работе показано, что ИГДА бутират натрия вызывают  $G_1/S$ -блок клеточного цикла и подавление пролиферации клеток REF, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras*. Антипролиферативное действие сопровождается подавлением экспрессии ряда позитивных регуляторов — циклинов D1, E, A и активности циклин-киназных комплексов, а также активацией таких негативных регуляторов клеточного цикла, как p21/Waf1. Для выяснения роли ингибитора циклин-киназных комплексов p21/Waf1 в антипролиферативном действии ИГДА были получены трансформанты из клеток с нокаутом по этому гену. Поскольку ИГДА индуцируют блок клеточного цикла в клетках с нокаутом по гену p21/Waf1, можно сделать вывод о том, что существуют Waf1-независимые пути антипролиферативного действия ИГДА. В развитие этого направления мы показали, что ИГДА подавляют транскрипцию гена *e2f1*, который является ключевым регулятором перехода  $G_1 \Rightarrow S$ . Кроме того, бутират натрия вызывает накопление важного регулятора Wnt-сигнального пути — бета-катенина, что оказывает влияние как на межклеточные взаимодействия, так и на транскрипционную регуляцию Wnt-зависимых генов. В докладе приводятся данные о функциональной взаимосвязи этих событий. Кроме того, будут представлены результаты иммунофлуоресцентного анализа внутриклеточного распределения бета-катенина и кадгеринов. Полученные данные демонстрируют новые подходы для изучения антипролиферативного действия ингибиторов гистон-деацетилазы на трансформированные клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49058) и CRDF (грант RB1-2511-ST-03).

**АНАЛИЗ СООТНОШЕНИЯ ГОМЕОЛОГИЧНЫХ ХРОМОСОМ В МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДНЫХ КЛЕТКАХ, ПОЛУЧЕННЫХ СЛИЯНИЕМ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК *MUS MUSCULUS* И СПЛЕНОЦИТОВ *MUS CAROLI*.** © И. Е. Пристяжнюк, О. И. Солдаткина, С. А. Темирова, О. Л. Серов. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, olalaylay@gmail.com.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), выделенные в культуру из бластоцист разных видов животных, обладают плюрипотентными свойствами и способны сохранять их даже при длительном культивировании *in vitro*. При перенесении ЭСК в морулу или бластоцисту они способны участвовать в формировании химер, давая вклад во все ткани и гаметы. ЭСК широко используются при изучении процессов дифференцировки и регуляции раннего развития. Для изучения репрограммирования генома соматических клеток используются гибриды между ЭСК и соматическими клетками. В такой гибридной клетке два генома в различном функциональном состоянии объединяются в одном ядре, но, несмотря на присутствие дифференцированного генома, подобные гибриды сохраняют плюрипотентные свойства (Matveeva et al., 1998; Tada et al., 2001). Для изучения репрограммирования соматического генома в гибридной клетке необходимо знать реальное соотношение хромосом родительских геномов. В Лаборатории генетики развития нашего института была получена серия клонов межвидовых гибридных клеток от слияния ЭСК *Mus musculus* и спленоцитов мышей *M. caroli* (Матвеева и др., 2001; Серов и др., 2003; Пристяжнюк и др., 2005). При цитогенетическом анализе хромосомного состава внутривидовых гибридов и гибридов, полученных слиянием клеток близкородственных видов, методом дифференциального окрашивания затруднение вызывает определение видовой принадлежности хромосом. Метод гибридизации *in situ* с видо- и хромосомоспецифическими зондами дает представление о соотношении хромосом родительских видов в целом и соотношении гомологов индивидуальных хромосом. Целью настоящей работы является исследование в клетках межвидовых гибридных клонов соотношения индивидуальных хромосом методом двухцветной FISH-гибридизации с использованием зонда, специфичного для сателлитной ДНК *M. musculus*, и *paint*-проб на индивидуальные хромосомы. В первую очередь для анализа были выбраны хромосомы 6, 11 и 17. Такой выбор был обусловлен тем, что в этих хромосомах локализованы основные известные гены *Nanog*, *Stat3* и *Oct4*, ответственные за поддержание плюрипотентности. В результате анализа соотношения гомологов хромосом 6, 11 и 17 была выявлена преимущественная потеря хромосом плюрипотентного партнера. Однако несколько клонов имели равное соотношение гомологов *M. musculus* и *M. caroli*, а в некоторых клонках наблюдалось преобладание гомологов соматического партнера (*M. caroli*), т. е. шла двухсторонняя сегрегация хромосом. На данный момент проводятся исследования плюрипотентности проанализированных клонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49383).

**ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛИНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ИМЕЮЩИХ ХРОМОСОМНЫЕ АБЕРРАЦИИ.** © М. А. Прохорович,<sup>1</sup> М. А. Лагарькова,<sup>1</sup> Т. В. Карамышева,<sup>2</sup> А. И. Железова,<sup>2</sup> А. Г. Шилов,<sup>2</sup> Н. Б. Рубцов,<sup>2</sup> С. Л. Киселев.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт биологии гена РАН, Москва, [xmarr@mail.ru](mailto:xmarr@mail.ru), и <sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

В настоящее время большое внимание уделяется анализу генетической стабильности линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека. Ранее нами был получен ряд линий ЭСК человека. В процессе работы с клеточными линиями на различных пассажах нами были отмечены изменения целого ряда параметров культивирования и дифференцировки линий ЭСК человека ESM01 и ESM03. Проведенный цитогенетический анализ позволил выявить ряд появившихся генетических aberrаций. Для выяснения биологической значимости генетических изменений был проведен анализ изменения способностей ЭСК к дифференцировке *in vivo*. Полученные в результате проведенных исследований данные говорят о необходимости постоянного контроля генетической стабильности линий ЭСК в культуре.

**РЕГУЛЯЦИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЭНДОРИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАСОМ ПРИ ИНДУКЦИИ ЭРИТРОИДНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ K562.** © И. В. Пугачева,<sup>1</sup> А. Г. Миттенберг,<sup>1</sup> Т. Н. Мусеева,<sup>1</sup> В. А. Куличкова,<sup>1</sup> А. С. Цимоха,<sup>1</sup> Л. Н. Гаузе,<sup>2</sup> И. М. Константинова.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [agm@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:agm@mail.cytspb.rssi.ru), и <sup>2</sup> Институт биологии развития РАН, Москва.

Регуляция срока жизни, или стабильности, молекул информационных РНК является одним из важнейших этапов контроля экспрессии генов в эукариотической клетке. Вклад этого этапа в образование конечного продукта — белка — во многих случаях превышает вклад транскрипции. Стабильность молекул информационных РНК регулируется при изменении функционального состояния клеток, и выявлен ряд специфических эндорибонуклеаз, ответственных за расщепление индивидуальных мРНК. Однако в большинстве случаев РНКазы, осуществляющие деградацию информационных РНК, изучены недостаточно. Селективный контроль стабильности специфических информационных РНК наблюдается и при дифференцировке клеток. Кроме того, несмотря на значительный прогресс в изучении протеасом, некоторые вопросы, в частности РНКазная активность этих частиц и ее регуляция, остаются малоисследованными. Обнаружено, что специфичность эндорибонуклеазной активности, ассоциированной с 26S-протеасомами, изменяется при действии на клетки K562 индуктора эритроидной дифференцировки (гемина). Так, при индукции дифференцировки способность протеасом к нуклеолизу одних информационных РНК повышается (мРНК p53, c-myc), а других (мРНК c-fos) — снижается, т. е. происходит изменение специфичности РНКазной активности протеасом. Кроме того, специфичность РНКазной активности изменяется под влиянием катионов Ca и Mg, а также дефосфорилирования протеасом. Выявлены изменения статуса фосфорилирования протеасом и изменения субъединичного состава этих частиц при действии гемина. Делаются выводы о влиянии индукции дифференцировки на способность протеасом к нуклеолизу различных видов нуклеотидных последовательностей, т. е. на специфичность РНКазной активности, а также о том, что механизм регуляции специфичности этой активности связан с изменением субъединичного состава и статуса фосфорилирования протеасом, а также катионного гомеостаза в клетке.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49606) и С.-Петербургского научного центра РАН.

**ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ X-ХРОМОСОМ СПЛЕНОЦИТОВ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ГИБРИДНЫХ КЛЕТКАХ.** © М. В. Пузаков,<sup>1</sup> Н. Р. Баттулин,<sup>1</sup> О. Л. Серов.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, puzakov@ngs.ru.

Эмбриональные гибридные клетки, получаемые слиянием эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и дифференцированных клеток, сохраняют высокие плюрипотентные свойства на уровне ЭСК. Такое доминирование генома ЭСК предполагает репрограммирование генома дифференцированного партнера. В настоящее время имеется ряд сообщений об изменении профиля генной активности соматического партнера в ядре гибридных клеток, главным образом на уровне отдельных генов (*Oct-4* и *Nanog*). Работа посвящена анализу экспрессии генов *Gla* и *Xist* после индукции инактивации X-хромосомы в условиях дифференцировки *in vitro* межвидовых гибридных клеток, полученных от слияния ЭСК мыши *Mus musculus* и спленоцитов азиатской мыши *M. caroli* и межвидовых гибридных клеток. Также проведен анализ экспрессии родительских аллелей генов *Oct-4*, *Nanog* и *Lmna*. Транскрипционные факторы *Oct-4* (*Pou5f1*) и *Nanog* являются молекулярными маркерами ЭСК, тогда как экспрессия гена *Lmna* характерна для дифференцированных клеток. Показано, что во всех 20 клонх гибридных клеток присутствуют транскрипты генов *Oct-4* и *Nanog*, что свидетельствует о сохранении плюрипотентности. Уровень же экспрессии гена *Lmna* в гибридных клетках сравним с уровнем экспрессии в ЭСК и значительно ниже, чем в дифференцированных клетках, например в фетальных фибробластах. Для дискриминации транскриптов родительских аллелей генов нами были определены первичные структуры фрагментов генов *Oct-4*, *Nanog*, *Lmna*, *Gla* и *Xist* *M. caroli* и выявлены видоспецифичные сайты рестрикции. Используя рестрикционный полиморфизм, мы показали реактивацию соматических аллелей генов *Oct-4* и *Nanog*, ранее неактивных в геноме дифференцированного партнера, тогда как уровень экспрессии *Lmna* снижается. Для оценки репрограммирования на хромосомном уровне мы изучали характер инактивации родительских X-хромосом при дифференцировке гибридных клеток. Следует отметить, что на момент слияния X-хромосома ЭСК находилась в эмбриональном, активном состоянии, тогда как X-хромосомы спленоцита, уже прошедшего дифференцировку, несут различные эпигенетические модификации, более того, одна из X-хромосом спленоцита была инактивирована. Дифференцировка гибридных клеток была индуцирована через образование эмбрионидных телец. Метод получения эмбрионидных телец широко используется для изучения потенциала клеток в условиях *in vitro*. Нами эта модель была выбрана, поскольку в эмбрионидных тельцах часть клеток находится в дифференцированном состоянии, формируя закладки трех зародышевых листков, а также происходит случайная инактивация X-хромосом. Анализ эмбрионидных телец позволяет сравнить, каким образом осуществляется инактивация X-хромосом *M. musculus* и *M. caroi* — случайно, как в естественных гибридах F<sub>1</sub>, или же имеются отклонения от случайного. Для анализа

инактивации X-хромосомы мы изучали активность генов *Gla* и *Xist*, локализованных в X-хромосоме, профиль их экспрессии меняется в процессе инактивации X-хромосомы, причем альтернативным способом: ген *Xist* активен в неактивной X-хромосоме и является ее маркером, а ген *Gla* активен только в активной X-хромосоме. Анализ экспрессии аллелей генов *Gla* и *Xist* показал, что при дифференцировке гибридных клонов *in vitro* инактивации подвергается X-хромосома как дифференцированного партнера, так и плюрипотентного. Полученные данные позволяют предположить, что происходит стирание различий между X-хромосомами, происходящими от ЭСК и спленоцита, а значит, имеет место репрограммирование X-хромосом спленоцита.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-49383 и 02-04-49319).

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ ИНТАКТНОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК В СИСТЕМЕ ДВУХ ЖИДКИХ ФАЗ.** © К. А. Пухов, Н. А. Абрамова, И. В. Воронкина, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, shuniata1@yandex.ru.

Исследование внеклеточного матрикса (ВКМ) в настоящее время приобретает все большее значение для понимания механизмов, позволяющих клеткам сохранять стволовое состояние или запускающих дифференцировку клеток. Несмотря на расширяющийся круг работ, посвященных биохимии ВКМ, пока не существует способа получения интактного ВКМ, синтезированного клетками в культуре. При использовании ферментов для снятия клеток с субстрата синтезированный клетками ВКМ неизбежно повреждается, что вносит ошибки в дальнейшую работу с таким матриксом. В настоящей работе предпринята попытка отделения ВКМ от клеток без применения ферментов, что позволяет получить его максимально неповрежденным. ВКМ может быть выделен в количествах, достаточных для идентификации компонентов методом электрофореза. Для выделения ВКМ разработан метод культивирования фибробластов на границе двух жидких фаз. Основа метода состоит в использовании в качестве субстрата для клеток перфторированных алканов и третичных аминов (перфторанов). Проведено сравнение различных перфторанов по пригодности для культивирования клеток. После культивирования клеток в течение 1—2 сут на поверхности перфторана отделение интактного ВКМ проводили при ультрацентрифугировании в полифазной системе, это позволяет выделить компоненты ВКМ с минимальными повреждениями. Такой результат достигается путем создания дополнительной, промежуточной между перфтораном и средой, фазы со средними значениями плотности. В работе были использованы первичные и трансформированные фибробласты человека. Перед центрифугированием клетки, вносимые в систему, окрашивали антителами против коллагена I и ламинина, проверяя синтез этих элементов ВКМ. После центрифугирования состав полученного ВКМ определяли методом электрофореза и Вестерн-блота с окраской антителами к основным белкам ВКМ. Было проведено сравнение ВКМ, полученного при снятии клеток с применением ферментов и полученного вы-

шеуказанным способом. Полученные результаты показывают, что при наличии достаточно малых количеств клеток можно изучать компоненты ВКМ, получая их неповрежденными.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект ОФИ-А 05-04-08017).

**ИНГИБИТОРЫ ЦИКЛИНЗАВИСИМЫХ КИНАЗ P21<sup>Waf1</sup> И P16<sup>Ink4a</sup> НЕОБХОДИМЫ ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ В E1A-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ТРАНСФОРМАНТАХ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ БУТИРАТА НАТРИЯ.** © В. С. Романов, Н. В. Аксенов, С. Г. Зубова, В. А. Поспелов, Т. В. Поспелова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, vsromanov@hotmail.com.

Ингибиторы циклин-киназных комплексов p21<sup>Waf1</sup> и p16<sup>Ink4a</sup> являются основными регуляторами перехода клетки из фазы G<sub>1</sub> клеточного цикла в фазу репликации ДНК и, согласно литературным данным, играют важную роль в реализации программы ускоренного клеточного старения в нормальных и опухолевых клетках. Целью настоящего исследования было изучение роли ингибиторов циклин-киназных комплексов в регуляции программы старения E1A-экспрессирующих трансформантов с использованием нокаутов по генам-ингибиторам. Для этого были получены стабильно трансформированные клеточные линии путем переноса онкогенов E1A и cHa-ras в эмбриональные фибробласты мыши дикого типа (линия mERAS) и в фибробласты, нокаутированные по генам p21<sup>Waf1</sup> (линия p21<sup>-/-</sup>) и p16<sup>Ink4a</sup> (линия p16<sup>-/-</sup>). Старение вызывали, действуя на клетки ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия (NaB, 4 мМ). О реализации программы судили по необратимости блоков клеточного цикла и экспрессии SA-β-GAL-активности. Анализ клеточного цикла методом проточной цитометрии показал, что все три линии трансформантов реализовали блок клеточного цикла уже через 1 сут после добавления NaB, однако только в трансформантах дикого типа mERAS блок после длительной обработки NaB был необратим. Удаление NaB из среды культивирования трансформантов p21<sup>-/-</sup> и p16<sup>-/-</sup> приводит к увеличению доли S-фазных клеток до уровня, сопоставимого с контрольным, даже через 7 сут культивирования с NaB. Это свидетельствует о том, что программа клеточного старения в трансформантах E1A + cHa-Ras с нокаутами по генам-ингибиторам невозможна, так как блок клеточного цикла у них обратим. Так как основными мишенями ингибитора p21<sup>Waf1</sup> являются циклин-киназные комплексы CyclE-Cdk2 и CyclA-Cdk2, была исследована CyclE- и CyclA-ассоциированная киназная активность *in vitro*. Показано, что во всех трех исследуемых линиях наблюдается падение активностей киназ, ассоциированных с CyclE и CyclA, после добавления бутирата натрия, которое может быть следствием снижения содержания CyclA и CyclE (но не киназы Cdk2), что было показано методом иммуноблотинга. Эти факты говорят о том, что падение активности комплексов CyclE/A-Cdk2 после действия NaB может происходить в отсутствие ингибитора p21<sup>Waf1</sup>. Сходное снижение содержания мишеней ингибитора p16<sup>Ink4a</sup> — циклина D1 (CyclD1) и циклин-зависимой киназы Cdk 4 — после действия NaB выявлено во всех трех клеточных линиях. Таким образом, уже

сейчас можно говорить о том, что ингибиторы циклин-киназных комплексов p21<sup>Waf1</sup> и p16<sup>Ink4a</sup> необходимы для реализации программы клеточного старения в E1A + cHa-Ras-трансформированных клетках, так как в их отсутствие она не идет. Однако, по всей видимости, они регулируют программу старения не за счет подавления активности своих основных мишеней — комплексов CyclE-Cdk, а действуя через альтернативные метаболические пути.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49766) и CRDF (грант RB 1-2511-ST-03).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА СТАБИЛЬНОСТЬ КОЛЛАГЕНОВЫХ ФИБРИЛЛ И АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В КОЛЛАГЕНОВЫХ ГЕЛЯХ.** © И. В. Савинцева,<sup>1, 2</sup> Т. В. Суханова,<sup>1, 2</sup> И. И. Селезнева,<sup>2</sup> Г. А. Давыдова,<sup>2</sup> М. Г. Фомкина.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Пущинский государственный университет, savintseva\_irina@mail.ru, и <sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, selezneva\_i@mail.ru.

Дигидрохверцетин (ДГК) — высокоактивный полифенол флаваноидного ряда — как вещество, близкое по строению молекулы к рутину и кверцетину, обладает выраженной Р-витаминной активностью, а следовательно, ингибирует процессы перекисного окисления липидов клеточных мембран и тормозит преждевременное старение клеток. Как известно, данный препарат оказывает противоопухолевое, антимуtagenное, антиаллергическое и противовоспалительное действие, что делает его привлекательным для использования в клеточных технологиях и тканевой инженерии. Целью настоящей работы было исследование влияния ДГК на стабильность коллагеновых фибрилл и активность клеток, культивируемых в коллагеновых гелях. Для исследования был взят ДГК отечественного производства (препарат «Флавокон» производства ООО «Биофлавоны», Обнинск, Калужская обл.). Работа была проведена с использованием модельных систем (бислойные липидные мембраны, коллагеновый гель) и эмбриональных фибробластов человека. Оценка прямого цитотоксического эффекта ДГК на культуру эмбриональных фибробластов человека показала, что в диапазоне концентраций 10<sup>-3</sup>—10<sup>-4</sup> мг/мл препарат стимулирует адгезию и не является токсичным для клеток. При содержании дигидрохверцетина 10<sup>-2</sup> мг/мл наблюдалась гибель 20 % клеток, доля гибнущих клеток возрастала с ростом концентрации. Исследования, проведенные с помощью искусственных бислойных липидных мембран, показали, что ДГК в концентрации 10<sup>-3</sup>—10<sup>-4</sup> мг/мл стабилизирует липидный бислой (бислойные мембраны выдерживают высокие значения подаваемого напряжения — до ± 200 мВ). При увеличении концентраций препарата до 3 · 10<sup>-2</sup> мг/мл проницаемость мембран увеличивается в 1000 раз по сравнению с контролем. Мы предполагаем, что цитотоксическое действие на клетки высоких концентраций ДГК может быть обусловлено его протонифицирующими свойствами. Исследование взаимодействия ДГК с коллагеном типа I было проведено с использованием метода дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. Показано значительное возрастание температуры плавления коллагеновых

волокон (на 10° C и более по сравнению с контролем) и увеличение кооперативности фазового перехода, что говорит о стабилизации структуры коллагена. Устойчивость к действию коллагеназы определяли поляризационно-оптическим методом. Данное исследование показало, что введение ДГК значительно снижает скорость биодegradации коллагеновых гелей. Характерно, что при концентрации ДГК  $10^{-3}$ — $10^{-4}$  мг/мл наблюдались как стимулирующее влияние на клетки, так и стабилизирующее воздействие на модельные бислойные мембраны и коллагеновые волокна. При более низких концентрациях ДГК ( $10^{-5}$  мг/мл) практически не наблюдалось различий между опытом и контролем во всех сериях экспериментов. При более высоких концентрациях ( $10^{-2}$  мг/мл) протонфорная активность ДГК приводила к гибели клеток. Это позволяет сделать вывод о том, что  $10^{-3}$ — $10^{-4}$  мг/мл является оптимальным диапазоном концентраций, в котором проявляется стабилизирующая активность ДГК и который может быть рекомендован в использовании препаратов ДГК в тканеинженерных конструкциях.

**ЦИТО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС НЕЗРЕЛОГО ЗАРОДЫША ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В ФАЗЕ РАЗВИТИЯ, ОПТИМАЛЬНОЙ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ МОРФОГЕННОГО КАЛЛУСА IN VITRO.** © О. А. Сельдмирова, А. А. Катасонова. Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Kruglova@anrb.ru.

Одно из перспективных направлений изучения биологии клетки в культуре *in vitro* состоит в использовании изолированных незрелых зародышей, формирующих морфогенный каллус. Цель исследования состояла в выявлении фазы развития незрелого зародыша, оптимальной для индукции формирования морфогенного каллуса, а также цито-гистологической оценке статуса такого зародыша. Объектом исследования послужили сорта яровой пшеницы. Основой для выявления фазы развития зародыша пшеницы послужила периодизация эмбриогенеза злаков, разработанная Батыгиной (1997). Согласно этой периодизации, в развитии зародыша выделяют две фазы: бластомеризация (первичная дифференциация) — образование критической массы клеток зародыша, которая заканчивается дифференциацией эмбриодермы; органогенез — обособление зачатков органов и последующая их тканевая дифференциация. Кроме того, использовали работу Кругловой и Сельдмировой (2001), в которой зародыш со всеми сформированными органами назван сформированным. Оптимальную фазу развития зародыша пшеницы выявили эмпирически. Для этого незрелые зародыши, извлеченные из зерновок через 10—12, 15—17 и 20—22 сут после опыления, инокулировали на питательную среду, составленную по прописи Мурашиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962). Зародыши размещали на питательной среде щитком вниз, т. е. щиток находился в тесном контакте с питательной средой. Установлено, что через 10—12 сут после опыления зародыши всех сортов находятся в начале фазы органогенеза. В таком зародыше обособлен апекс побега, начинается формирование колеоптиля, происходит дифференциация прокамбия в щитке. Эндогенно в базальном полюсе зародыша обособляется зародышевый корень. Происходит заложение эпибласта, колеоризы и корневого чехлика. При культивировании таких незрелых зародышей наблюдалось формирование обводненных каллусов желто-

ватого цвета, неопределенной формы, мягкой консистенции, состоящих из рыхло расположенных вытянутых клеток. При культивировании такого каллуса в нем не удалось индуцировать процесс морфогенеза ни в одном из вариантов эксперимента. Такой каллус был оценен нами как неморфогенный. Незрелые зародыши пшеницы всех сортов через 15—17 сут после опыления находятся в завершении фазы органогенеза. В таком зародыше происходят обособление зачатков органов и их тканевая дифференциация. Все органы незрелого зародыша, в том числе щиток, представлены активно развивающимися меристематическими клетками. Важно подчеркнуть, что клетки эпидермиса щитка такого зародыша не покрыты плотной оболочкой. При культивировании таких незрелых зародышей пшеницы всех сортов отмечено формирование каллусов плотной, компактной консистенции, матового белого цвета, узловой формы. В ходе дальнейших экспериментов было установлено, что в таких каллусах отмечаются процессы морфогенеза, поэтому такие каллусы были обозначены нами как морфогенные. Как свидетельствуют данные цито-гистологических исследований, морфогенный каллус в данном случае формируется из эпидермальных клеток щитка, находящегося в контакте с питательной средой. Через 20—22 сут после опыления незрелые зародыши пшеницы всех сортов можно отнести к сформированным зародышам, поскольку они содержат все сформированные органы: щиток, лигула (вырост щитка), колеоптиль, эпибласт, колеориза, дифференцированная почечка, состоящая из апекса побега и примордия первого листа. Незрелые сформированные зародыши пшеницы в процессе культивирования давали начало проросткам. По-видимому, стадия развития сформированного зародыша пшеницы соответствует так называемой стадии автономности зародыша (Батыгина, 1987). Таким образом, в условиях выполненных экспериментов во все годы исследования при прочих равных условиях к формированию морфогенного каллуса у всех изученных сортов приводила инокуляция незрелых зародышей в оптимальной фазе органогенеза на 15—17-е сут после опыления.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 05-04-97911 и 05-04-08114), по программе поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-4834.2006.4) и по Государственной научно-технической программе Республики Башкортостан «Воспроизводство биоресурсного потенциала РБ» (проект 3/3).

**ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ И ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕЙРОКЛЕТОК ИЗ ОЛЬФАКТОРНОЙ ЛУКОВИЦЫ ПОСТНАТАЛЬНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.** © В. М. Семенова, В. В. Медведев, Л. П. Стайно. Институт нейрохирургии АМН Украины, Киев.

В неврологии и нейрохирургии с клеточной терапией нейральными стволовыми клетками (НСК) связываются перспективы повышения эффективности лечения ряда нейродегенеративных заболеваний. В связи с этим важное значение приобретает изучение в эксперименте потенциальных свойств нейроцитов, полученных из ольфакторной луковицы (ОЛ), которая рассматривается как резервуар прогениторных/стволовых нейроцитов,

мигрирующих в нее из субвентрикулярной зоны мозга на протяжении постнатального периода млекопитающих и человека. Преимущества получения НСК из ОЛ перед другими регионами их генерации в головном мозге человека обусловлены ограниченным объемом, анатомически автономной топографией, доступностью и безопасностью одностороннего хирургического удаления этого образования без возникновения вторичного неврологического дефицита обонятельной функции. Проведено культивирование нейроцитов ОЛ, удаленных у больших с базальными немозговыми опухолями (менингиомами), в следующих средах: 1) в полной среде ДМЕМ с наличием эмбриональной сыворотки; 2) в бессывороточной среде; 3) в среде полного состава с добавлением ретиноевой кислоты как известного индуктора нейробластной дифференцировки. В 1-м варианте опытов в динамике наблюдения культур нейроцитов ОЛ установлена возможность идентификации НСК, которые длительно и стабильно сохраняют недифференцированный фенотип, идентичный таковому в нативной ткани ОЛ (*in vivo*). Они проявляют тенденцию к формированию колоний и мелких компактных сфероидных микроагрегатов, которые состоят из виментин-положительных прогениторных нейроцитов, что отражает стимулирующее влияние факторов сыворотки на их пролиферацию. При количественной оценке содержания и жизнеспособности нейроцитов ОЛ в суспензионных культурах на протяжении 30 сут подтверждается визуально наблюдаемое постепенное снижение доли жизнеспособных нейроцитов (от 61.9 до 20.8 %) за счет элиминации короткоживущей популяции при сохранении пролиферативных потенциалов многочисленной фракции в составе кластеров и сфероподобных структур. В процессе их культивирования моделируется самовоспроизведение небольшой части нейроцитов, предположительно НСК, которые длительно сохраняют недифференцированный (минимальный) фенотип. При культивировании в бессывороточной питательной среде на подложке (2-й вариант опытов) проявляются эффект блокирования пролиферации нейроцитов ОЛ и их способность к спонтанной мультипотентной дифференцировке в униполярные нейроны с короткими конусовидными отростками и глиоциты. Среди глиальной популяции этих культур наблюдается формирование фенотипа протоплазматических и фиброзных астроцитов с признаками глиофибриллообразования в виде сетчатых структур. В отличие от этого присутствие ретиноевой кислоты ( $2 \cdot 10^{-3}$  M; Sigma) в питательной среде культур (3-й вариант опытов) способствует проявлениям дифференцировки НСК в зрелые формы нейроцитов мультиполярного фенотипа с длинными ветвящимися отростками. При этом благодаря направленному росту аксонов и образованию межклеточных контактов нейроцитов, дифференцирующихся в нейроны, формируются гистотипические нейрональные ансамбли в виде характерных сетчатых структур, в составе которых отдельные дифференцированные нейроны сохраняли способность к переживанию на протяжении 46—50 сут наблюдения. В этом варианте опытов обеспечивается также оптимальная выживаемость большего количества нейроцитов по сравнению с остальными модификациями, что может указывать на протекторный эффект ретиноевой кислоты. Таким образом, различный состав питательной среды, обеспечивающий специфическое микроокружение для нейроцитов из ОЛ человека в условиях культивирования, оказывает неоднозначное

модифицирующее влияние на процессы пролиферации и дифференцировки популяции НСК из ОЛ постнатального мозга человека.

РОЛЬ КИНАЗЫ GSK3 $\beta$  И В-КАТЕНИНА В ПРОЦЕССАХ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ.  
© Г. С. Синёва, М. С. Лянгузова, И. А. Чуйкин, В. А. Поспелов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, galsin2209@yahoo.com.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) млекопитающих — это плюрипотентные клетки, обладающие способностью неограниченно долго пролиферировать в культуре. Недавно появились данные о том, что Wnt-сигналинг может поддерживать самообновление и плюрипотентное состояние ЭСК мыши и человека. Активация Wnt-сигналинга сопровождается стабилизацией  $\beta$ -катенина, его транспортом в ядро и активацией транскрипции генов-мишеней, в частности регуляторов клеточного цикла *c-myc* и *cyclin D1*. К такому же эффекту приводит ингибирование киназы GSK3 $\beta$ , негативного регулятора Wnt-пути. Мы исследовали влияние ингибитора GSK3 $\beta$  ВЮ на пролиферацию и дифференцировку ЭСК мыши линии IOUD2. Было показано, что ВЮ дозозависимо подавляет рост популяции ЭСК мыши. Этот эффект не был вызван остановкой ни в одной из контрольных точек клеточного цикла (G<sub>1</sub>/S или G<sub>2</sub>/M), так как при обработке ВЮ не наблюдалось существенных изменений в распределении ЭСК по фазам клеточного цикла. С другой стороны, в обработанных ингибитором клетках повышен уровень апоптоза, что может объяснять замедление роста клеточной популяции. Согласно данным Вестерн-блоттинга и иммунофлуоресценции, после обработки ЭСК ВЮ количество  $\beta$ -катенина возрастает, но не происходит его транспортировки в ядро. Таким образом, подавление роста популяции ЭСК в результате инактивации GSK3 $\beta$  не сопровождается транслокацией  $\beta$ -катенина в ядро. Как в контрольных, так и в обработанных ВЮ клетках  $\beta$ -катенин локализуется на мембране с E-кадгеринами, участвуя в гомотипических межклеточных контактах. При воздействии ВЮ клетки округлялись и образовывали более компактные колонии. Полученные данные позволяют предполагать, что  $\beta$ -катенин, стабилизированный в результате инактивации GSK3 $\beta$ , направляется не в ядро, а к цитоплазматической мембране, что приводит к усилению межклеточных контактов. Поскольку обработанные ВЮ клетки имеют более выраженный недифференцированный фенотип, мы решили исследовать, как ингибирование GSK3 $\beta$  влияет на процесс дифференцировки. Для этого была проведена дифференцировка ЭСК ретиноевой кислотой в присутствии ВЮ. На ранних этапах дифференцировки (первые 3 сут) наблюдалось сохранение недифференцированной морфологии в обработанных ВЮ клетках, но затем клетки начинали расплываться, а на 6-е сут они приобретали дифференцированный фенотип. Хотя ВЮ не препятствовал снижению экспрессии *Oct-4* (маркера недифференцированных ЭСК), он влиял на индукцию маркеров дифференцировки: экспрессия *коллагена 4* снижалась, а экспрессия виментина заметно повышалась в клетках, дифференцированных в присутствии ВЮ. Хотя при действии ингибитора GSK3 $\beta$  стабилизированный  $\beta$ -катенин не накапливается в ядре, при дифференцировке ЭСК ре-

тиновой кислотой  $\beta$ -катенин обнаруживается в ядре. Таким образом, ядерная локализация  $\beta$ -катенина не нужна для пролиферации ЭСК, но, вероятно, имеет большое значение при дифференцировке.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной по программе президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**РОЛЬ БЕЛКА STIM1 В ДЕПУПРАВЛЯЕМОМ ВХОДЕ КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ A431.** © А. Ю. Скопин, Л. Н. Глушанкова, О. А. Зимица, В. А. Алексеенко, Г. Н. Можалева, Е. В. Казначеева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В невозбудимых клетках активация мембранных рецепторов, сопряженных с фосфолипазой С (PLC), инициирует каскад событий, приводящий к опустошению инозитол-1,4,5-трифосфат ( $IP_3$ )-чувствительных кальциевых депо и последующему входу  $Ca^{2+}$  через плазматическую мембрану, так называемому емкостному  $Ca^{2+}$ -входу. Емкостной  $Ca^{2+}$ -вход обеспечивается  $Ca^{2+}$ -каналами плазматической мембраны, известными как депоуправляемые  $Ca^{2+}$ -каналы (SOC). Механизм передачи сигнала от опустошенного кальциевого депо к  $I_{SOC}$ -каналам до конца неясен. Недавно было показано, что трансмембранный кальцийсвязывающий белок STIM1, большая часть которого локализована в мембране эндоплазматического ретикулума, является необходимым компонентом в запуске депоуправляемых  $Ca^{2+}$ -каналов. Эти данные указывали на то, что STIM1 может быть сенсором уровня кальция в кальциевых депо и опустошение депо приводит к перераспределению белка в область, прилежащую к плазматической мембране, что является сигналом для активации  $I_{SOC}$ . Нами показано, что инкубация клеток A431 в среде, содержащей антитела к N-концевому кальцийсвязывающему участку STIM1, блокирует депоуправляемый вход  $Ca^{2+}$ . Полученные данные указывают на то, что пул STIM1, локализованного в нативной клетке в плазматической мембране, необходим для активации депоуправляемого входа кальция.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной по программе президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», по программе «Ведущие научные школы» (НШ-4904.2006.4) и Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 04-04-49053 и 04-04-49057).

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИБРОЦИТОВ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА.** © Е. В. Скоробогатая,<sup>1</sup> Н. В. Калмыкова,<sup>1</sup> О. М. Моисеева,<sup>2</sup> М. И. Блинова,<sup>1</sup> Г. П. Пинаев.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, rev22@mail.cytspb.rssi.ru, и <sup>2</sup> НИИ кардиологии, Санкт-Петербург.

В результате повреждения кожного покрова начинается ряд взаимосвязанных процессов: воспаление, образование грануляционной ткани, ангиогенез, сокращение раны и ее реэпителизация. На конечном этапе восстановления кожного покрова основную роль выполняют фибробласты, которые мигрируют из краев раны и синтезируют элементы внеклеточного матрикса. Долгое время

оставался неизученным процесс появления фибробластоподобных клеток непосредственно в ране, куда фибробласты не могли мигрировать самостоятельно. В 1994 г. Букала и соавторы заметили присутствие в ране большого числа веретенообразных клеток. Данные клетки, названные фиброцитами, появляются в ране из кровяного русла, синтезируют большое число разнообразных факторов, принимая участие в запуске регенерационных процессов. Интерес к изучению дифференцировки и поведения фиброцитов обусловлен развитием технологий заместительной клеточной терапии и, в частности, созданием клеточных продуктов для заживления ран различной этиологии. В связи с вышеизложенным целью работы являлось выделение фиброцитов из цельной периферической крови человека, а также их идентификация с помощью набора различных антител. Общую лейкоцитарную фракцию крови получали путем градиентного центрифугирования на Histopaque 1077 (Sigma). Клетки культивировали на пластике или на фибронектине из плазмы крови в среде DMEM с 20%-ной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. Через 5—7 сут культивирования появлялась морфологически гетерогенная популяция прикрепленных клеток, в составе которой присутствовали как одиночные фибробластоподобные клетки, так и целые кластеры. Для идентификации фиброцитов их окрашивали моноклональными антителами CD34 (B&D Pharmingen) — маркером стволовых клеток и CD31 (Sigma) — маркером эндотелиальных клеток. Было показано, что фиброциты окрашиваются CD34, т. е. являются стволовыми клетками, и не окрашиваются CD31. Опыты по включению бромдезоксипуридина продемонстрировали, что среди прикрепленных клеток только фибробластоподобные синтезируют ДНК. Для исследования поведения клеток лейкоцитарной фракции мы использовали фибриновый гель как 3-мерную модель фибринового сгустка, образующегося в ране. По-видимому, фибрин стимулирует дифференцировку и миграцию фиброцитов, так как мы наблюдали появление фибробластоподобных клеток уже через 2 сут и их быструю миграцию внутрь геля. На основании полученных данных мы можем сделать заключение о том, что при определенных условиях культивирования клетки лейкоцитарной фракции крови дифференцируются в фиброциты, что позволит в дальнейшем использовать их в терапевтических целях.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной в рамках Государственного контракта № 02.435.11.3020 «Метод восстановления эпителиально-мезенхимальных дефектов с помощью стволовых клеток» (лот 2005-ЖС-13.1/001).

**ЭКСПРЕССИЯ VEGF-R3 ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЛИНИИ EA.Hy926.** © Д. И. Соколов, А. В. Колобов, И. М. Кветной, С. А. Сельков. ГУ НИИ акушерства и гинекологии, Санкт-Петербург.

Цель настоящего исследования — сравнительный анализ изменений экспрессии VEGF-R3 эндотелиальными клетками плаценты в норме и при гестозе, а также сравнительный анализ изменений экспрессии VEGF-R3 человеческими эндотелиальными клетками линии EA.Hy926 при их культивировании в присутствии надосадочных жидкостей, полученных при культивировании эксплан-

тов плацент беременных с нормальным течением беременности или с гестозом. Всего обследовано 10 плацент беременных с нормальным течением беременности (контроль) и 10 плацент беременных с гестозом. Родоразрешение проводилось путем кесарева сечения. Кусочки плацент фиксировали в формалине для последующего иммуногистохимического анализа экспрессии VEGF-R3. Другие кусочки этих же плацент культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 10 % сыворотки в течение 24 ч, после чего собирали надосадочные жидкости. Затем человеческие эндотелиальные клетки линии EA.Hy926 культивировали в присутствии полученных надосадочных жидкостей в течение 24 ч, после чего клетки фиксировали формалином и проводили иммуногистохимический анализ экспрессии VEGF-R3. Для проведения иммуногистохимической реакции с антителами к VEGF-R3 (1 : 50, Novocastra, UK) использовали стандартный одноэтапный протокол. Анализ полученных данных проводили при помощи компьютерной системы анализа микроскопических изображений и программы «Морфология 4.0» (Видеотест). При иммуногистохимическом исследовании гистологических препаратов плаценты отмечено, что экспрессия VEGF-R3 клетками синцитиотрофобласта и децидуальными клетками базальной пластики была достоверно ниже при гестозе, чем при нормальной беременности. При цитологическом и иммуногистохимическом исследовании установлено, что количество клеток линии EA.Hy926, проинкубированных в присутствии надосадков, полученных при культивировании эксплантов плацент беременных с гестозом, уменьшалось в поле зрения, клетки увеличивались в размерах и деформировались, их ядра становились вытянутыми и гиперхромными, экспрессия VEGF-R3 достоверно снижалась по сравнению с контролем. При этом надосадочные жидкости, полученные при культивировании эксплантов плацент здоровых беременных, не изменяли нормальной морфологии клеток линии EA.Hy926 и базового уровня экспрессии VEGF-R3. Таким образом, снижение экспрессии VEGF-R3 эндотелиальными клетками плаценты при гестозе может быть обусловлено как функциональным дефектом эндотелиальных клеток, так и их гибелью.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной по программе поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-5268.2006.7).

**СИНТЕЗ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ И ПРОТИВОвосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO ПРИ СТИМУЛЯЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫМ АНГИОГЕНЕЗОМ II.**  
© А. Г. Соловьёв,<sup>1</sup> Л. Л. Резников,<sup>2</sup> П. Г. Назаров,<sup>3</sup> Чарльз А. Динарелло.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Центр гемокоррекции ГУЗ Городская больница № 12, Санкт-Петербург, <sup>2</sup> Школа медицины Университета штата Колорадо, Денвер, США, и <sup>3</sup> Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург.

В последнее время в литературе активно обсуждается новый подход к некоторым общеизвестным регуляторным гормонам, таким как ангиотензин II (Ang II), как к истинным цитокинам. Накопленный объем фактических данных позволяет утверждать, что повреждение органов и систем при многих патологических состояниях может быть реализовано посредством этих регулятор-

ных пептидов. Так, активация ренин-ангиотензиновой системы может приводить к неспецифическому повреждению почечной паренхимы (Ruiz-Ortega et al. *Kidney Int. Suppl.*, 2003, **86**: S21—S26). Помимо общеизвестных физиологических механизмов действия (вазоконстрикция и др.) Ang II участвует в развитии CCl<sub>4</sub>-индуцированного фиброза печени у крыс, причем его медиаторная роль реализуется через цитокиновую сеть и отменяется введением противовоспалительного цитокина IL-10 (Wang et al. *World J. Gastroenterol.*, 2003, **9**: 539—543). Также показано, что Ang II посредством своих специфических рецепторов 1-го типа (AT 1) участвует в LPS-индуцированном синтезе IL-1 $\beta$  и IL-6 *in vivo* и *in vitro* (Miyoshi et al. *Amer. J. Physiol. Regulat. Integr. Comp. Physiol.*, 2003, **284**: R1092—R1097). Новые свойства Ang II как истинного цитокина, его способность непосредственно выступать индуктором синтеза цитокиновых каскадов остаются малоизученными. Неизвестно, например, как влияет Ang II на продукцию провоспалительных цитокинов, необходимых как для развития, так и для ограничения воспалительного процесса. С целью выяснения этих вопросов мы изучили влияние препарата Ang II на продукцию нескольких про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-1Ra и IFN $\gamma$ ) клетками крови человека *in vitro*. Моделью для эксперимента была выбрана разбавленная в стерильной теплой среде RPMI 1640 донорская кровь, 24-часовую культуру которой по окончании инкубации центрифугировали, полученный супернатант анализировали на содержание интерлейкинов IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-1Ra и IFN $\gamma$  методом жидкостной хемоэлектрорлюминесценции. В качестве стимулирующего агента применяли рекомбинантный человеческий Ang (Sigma) в различных концентрациях (250, 500 и 1000 нМ). Как показали полученные данные, препарат Ang II человека стимулировал синтез всех исследуемых цитокинов. Стимуляция синтеза цитокинов в культурах клеток крови человека была пропорциональна применяемой дозе. Максимальный уровень прироста продукции цитокинов (в 3—10 раз выше, чем в контроле,  $P < 0.05$ ) достигался при концентрации Ang II 1000 нМ, что значительно выше референс-уровня Ang II, принятого для плазмы крови здорового человека (van de Wal et al. *Int. J. Cardiol.*, 2006, **106**: 367—372). Таким образом, результаты нашего исследования показали, что Ang II человека обладает способностью непосредственно индуцировать синтез как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов в лейкоцитах крови человека. Это подтверждает многочисленные литературные данные об участии Ang II в патогенезе воспалительных процессов, указывая на то, что провоспалительные свойства Ang II могут осуществляться путем прямого воздействия на пути цитокиновой регуляции воспаления. Полученные данные указывают на более сложный патогенез гипертонической болезни, где наряду с вазоконстрикторными свойствами Ang II, определяющими нарушения системной гемодинамики, можно говорить о воспалительном компоненте, способном индуцировать местные воспалительные изменения сосудистой стенки, определять активацию и миграцию клеток крови и т. д. Учитывая это, лечение гипертонических состояний может требовать присоединения умеренной противовоспалительной терапии.

**ПОДАВЛЕНИЕ ЗАВИСИМОЙ ОТ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ**

ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ СОВМЕСТНОМ ПРИМЕНЕНИИ ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТА С ВИТАМИНАМИ  $V_{12}$  И С. © М. Е. Соловьева, В. В. Соловьев, А. А. Фасхутдинова, А. А. Кудрявцев, В. С. Акатов. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, groupakatov@rambler.ru.

Образование адгезивных контактов клеток с субстратом и с окружающими клетками значительно влияет на их метаболизм и повышает выживаемость в неблагоприятных условиях. Как известно, при возрастании плотности клеточных культур, росте клеток в мультислоях или сфероидов отмечается снижение эффективности повреждающего воздействия облучения и химиопрепаратов. Разрыв межклеточных контактов устраняет резистентность, что позволяет говорить о зависимой от адгезии множественной лекарственной устойчивости (cell adhesion-mediated drug resistance, CAMDR) опухолевых клеток. Механизм CAMDR остается неизвестным. Выяснение причин зависимой от межклеточной адгезии резистентности опухолевых клеток к цитотоксическим агентам и поиск способов ее преодоления являются актуальной задачей и имеют очевидное практическое значение. Мы установили многократное повышение устойчивости клеток карциномы гортани человека HEP-2 при возрастании плотности культуры до конfluence к повреждающему действию винкристина, доксорубина, перекиси водорода, прооксидантной каталитической системы, включающей в себя сочетание витаминов  $V_{12}$  и С, которая испытывается в качестве противоопухолевого препарата, к диэтилдитиокарбамату (DDC), являющемуся ингибитором  $Cu, Zn$ -СОД и ряда других ферментов, хелатором меди и метаболитом лекарственного препарата «Дисульфирам». Одним из способов преодоления устойчивости клеток к химиотерапии является использование сочетания препаратов с различными механизмами действия. Мы попытались преодолеть CAMDR клеток HEP-2 путем комбинированного воздействия несколькими препаратами. Было обнаружено, что  $LC_{50}$  доксорубина для резистентной конfluence культуры снижается в 3—4 раза при совместном применении с DDC в нетоксичной дозе. Сочетание доксорубина с витаминами  $V_{12}$  и С не способствовало преодолению CAMDR. Величина  $LC_{50}$  DDC в конfluence и неконfluence культурах различалась в 300 раз. Применение DDC совместно с витамином  $V_{12}$  в нетоксичной концентрации позволило уменьшить  $LC_{50}$  DDC в конfluence культуре в 4 раза, а при совместном применении с нетоксичным сочетанием витаминов  $V_{12}$  и С — в 15 раз. DDC в нетоксичных дозах устраняет резистентность конfluence клеток к действию перекиси водорода и прооксидантным сочетаниям витамина С с органокомплексами кобальта. В работе рассматриваются возможные механизмы снижения резистентности клеток при совместном применении DDC с витаминами  $V_{12}$  и С: окислительный стресс, возникновение повреждений ДНК на ранних этапах действия, снижение репарационного потенциала клетки. Синергизм цитотоксического действия DDC с витаминами  $V_{12}$  и С, с цитостатиками представляет интерес для химиотерапии солидных опухолей, устойчивых к известным противоопухолевым препаратам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-97285).

ПРООКСИДАНТНОЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ТИОЛОВ В СОЧЕТАНИИ С ВИТАМИНОМ  $V_{12}$ . © М. Е. Соловьева, А. А. Фасхутдинова, В. В. Соловьев, А. А. Кудрявцев, В. С. Акатов. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, groupakatov@rambler.ru.

Тиолсодержащие соединения играют важную роль в защите белков клетки от окислительного стресса, в восстановлении их дисульфидных групп и перехвате активных кислородных метаболитов. Они являются компонентами буферных систем при изучении свойств белковых молекул, активности ферментов и роли дисульфидов в их структуре. Тиолы широко применяются в медицине как радиопротекторы и антиоксиданты. Вместе с тем при использовании тиолов необходимо учитывать их потенциальные прооксидантные свойства, которые могут привести к повреждающему эффекту. Известно, что тиолы в сочетании с металлами переходной валентности могут продуцировать активные формы кислорода. В связи с этим актуальным является изучение прооксидантных и цитотоксического эффектов тиолов в сочетании с органокомплексами, содержащими металлы с переходной валентностью. Мы обнаружили, что тиолы N-ацетилцистеин (NAC), глутатион (GSH) и дитиотреитол (DTT) в сочетании с витамином  $V_{12}$  являются прооксидантами. Установлен синергизм токсического действия этих тиолов в сочетаниях с витамином  $V_{12}$  на клетки карциномы гортани человека в культуре. Показано, что сочетания тиолов в физиологических концентрациях с  $V_{12}$  инициирует апоптоз. Обнаружено, что тиолы в сочетании с  $V_{12}$  восстанавливают молекулярный кислород с образованием перекиси водорода во внеклеточной среде до 100 мкМ и выше. Показано, что экстраклеточный окислительный стресс, вызванный сочетаниями тиолов с  $V_{12}$ , сопровождается внутриклеточным окислительным стрессом и появлением однонитевых разрывов ДНК. Установлено, что накопление нерепарированных повреждений ДНК, выявляемых с помощью комет-анализа, является причиной инициации апоптотической гибели клеток, вызываемой тиолоами в сочетании с  $V_{12}$ . Хелаторы железа фенантролин и дефероксамин не предотвращают прооксидантного действия сочетаний тиолов с  $V_{12}$ , но достоверно ингибируют повреждение ДНК и гибель клеток, вызываемую сочетаниями. Прооксидантный и цитотоксический эффекты сочетаний тиолов с  $V_{12}$  полностью устраняются нетиоловыми антиоксидантами каталазой и пируватом. Таким образом, цитотоксическое действие сочетаний тиолов с  $V_{12}$  обусловлено генерацией перекиси водорода, которая вызывает повреждение ДНК при участии внутриклеточного железа. Полученные результаты указывают на важность правильного подбора антиоксидантов и представляют интерес для клеточной биологии, онкологии и фармакологии.

АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ NF- $\kappa$ B И AP-1 В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМ КАНЦЕРОГЕНОМ БЕНЗ/А/ПИРЕНОМ. © Н. А. Соломатина, А. В. Гаспарьян, Т. К. Дубовая, В. А. Кобляков. Российский онкологический научный центр РАМН, Москва, kobliakov@rambler.ru.

В процессе химического канцерогенеза выделяют стадии инициации и промоции. Стадия инициации ката-

лизируется активными метаболитами канцерогена, вызывающими мутации в онкогенах или генах-супрессорах. На стадии промоции инициированные клетки должны получить дополнительное воздействие, стимулирующее избирательный рост этих клеток. Принято считать, что необходимыми свойствами промоторов являются способность стимулировать пролиферацию и блокировать апоптоз. Этот вывод сделан при изучении модели двухстадийного канцерогенеза, при котором стадии инициации и промоции вызываются различными соединениями. Однако то, как реализуется стадия промоции при действии «полных» канцерогенов, веществ, сочетающих одновременно функции инициатора и промотора, неизвестно. Непонятно, в какой форме — исходной или метаболитизированной — действует канцероген. Распространенными канцерогенными загрязнителями окружающей среды являются полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). В настоящий момент известны два пути реализации биологического действия этих веществ.

1. В клетке ПАУ метаболизируются в монооксигеназной ферментной системе на цитохроме P450 с образованием высокоактивных эпоксидов и фенолов, которые взаимодействуя с макромолекулами, влияют на клеточные функции.

2. Исходная, химически инертная молекула ПАУ активирует Ah-рецептор. Активированный Ah-рецептор, являясь транскрипционным фактором, вызывает транскрипцию генов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков; помимо этого, он взаимодействует с регуляторным белком ретинобластомы, активирует белок src и др. Транскрипционные факторы AP-1 и NF-kB принимают участие в передаче митотического и антиапоптотического сигналов. Активация этих транскрипционных факторов является необходимым фактором промоции. В настоящей работе мы исследовали влияние канцерогенного ПАУ бенз/а/пирена (БП) и его неканцерогенного аналога бенз/е/пирена (БеП) на активацию транскрипционных факторов AP-1 и NF-kB в культуре клеток гепатом 27 и Нер G2. Эти культуры отличаются тем, что в клетках гепатомы Нер G2 экспрессируются как ферменты метаболизма ксенобиотиков, так и Ah-рецептор; в клетках гепатомы 27 не обнаружено экспрессии ни изоформ цитохрома P450, ни Ah-рецептора. БП в отличие от БеП вызывает значительное увеличение связывания NF-kB с узнающим участком ДНК в клетках гепатомы 27 и очень слабое в клетках гепатомы Нер G2. В случае с транскрипционным фактором AP-1 наблюдалась другая картина: более эффективно происходит связывание с узнающим участком ДНК в клетках гепатомы Нер G2 и более слабо в клетках гепатомы 27. Активация NF-kB в клетках гепатомы 27, в которой отсутствуют как система метаболизма ПАУ, так и Ah-рецептор, свидетельствует о том, что помимо этих двух известных факторов, реализующих биологическое действие канцерогенов, существует третий, до настоящего времени неизвестный компонент, через который происходит действие неметаболизированной молекулы ПАУ. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что и ранее были получены эффекты ПАУ на клетки, которые нельзя объяснить традиционными представлениями о механизмах действия этого класса веществ. Более выраженный эффект БП на активацию AP-1 в клетках гепатомы Нер G2 по сравнению с клетками гепатомы 27 свидетельствует о том, что активация этого транскрипционного фактора реализуется через образования активного метаболита БП или взаимодействуя с Ah-рецептором.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48350).

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ P63-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК В ПОПУЛЯЦИЯХ БАЗАЛЬНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ОТСЕЛЕКТИРОВАННЫХ ПУТЕМ АДГЕЗИИ НА БЕЛКАХ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА.** © О. Г. Спичкина, Н. В. Калмыкова, И. В. Воронкина, Л. В. Кухарева, М. И. Блинова, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, olga\_spichkina@mail.ru.

Культивирование и трансплантация выращенных *in vitro* эпидермальных кератиноцитов давно применяется в клинической практике для восстановления пораженного кожного покрова. Использование культивируемых клеток существенно сокращает сроки, повышает эффективность заживления ран различной этиологии. Популяция эпидермальных кератиноцитов в культуре, как и в организме, весьма гетерогенна по степени дифференцировки, пролиферативному потенциалу, морфологии и т. д. (Lavker, Sun, 1982; Parkinson et al., 1983, и др.). По степени дифференцировки среди них можно выделить стволовые клетки, транзисторные, находящиеся на пути к дифференцировке, и дифференцированные клетки. За счет деления стволовых клеток происходит постоянное обновление эпидермиса. При получении кератиноцитов из кожи человека выделяется гетерогенная популяция, состоящая преимущественно из клеток базального слоя. Целью настоящей работы являлась идентификация стволовых клеток в популяциях базальных кератиноцитов кожи человека, отселектированных путем адгезии на белках внеклеточного матрикса. В качестве субстрата для селекции использовали коллагены I и IV типов и фибронектин. Идентификацию стволовых клеток проводили по их окраске на транскрипционный фактор p63. Оказалось, что динамика содержания p63-положительных клеток на разных сроках адгезии (10—30 мин) сильно варьирует в зависимости от матрикса и индивидуальных особенностей доноров. Избранный подход к селекции кератиноцитов может быть использован в дальнейших исследованиях для выделения популяции стволовых клеток кожи.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной в рамках Государственного контракта № 02.435.11.3020 «Метод восстановления эпителиально-мезенхимных дефектов с помощью стволовых клеток» (лот 2005-ЖС-13.1/001).

**ВЛИЯНИЕ ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ МИГРАЦИИ МОНОЦИТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ ТНР-1 НА СВОЙСТВА ЭТИХ КЛЕТОК.** © Э. А. Старикова,<sup>1</sup> Д. И. Соколов,<sup>2</sup> С. А. Сельков,<sup>2</sup> Е. И. Амчиславский,<sup>1</sup> А. А. Чернова,<sup>3</sup> И. С. Фрейдлин.<sup>1</sup> <sup>1</sup> ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, <sup>2</sup> ГУ НИИ акушерства и гинекологии, Санкт-Петербург, и <sup>3</sup> С.-Петербургский государственный университет.

Процесс трансэндотелиальной миграции лейкоцитов является одним из ключевых событий в осуществлении защитных реакций организма. Он не только обеспечива-

ет доставку лейкоцитов в участки воспаления, но также изменяет свойства мигрирующих в субэндотелиальное пространство клеток. Известно, что мононуклеарные фагоциты, мигрируя в ткани, дифференцируются в зрелые тканевые макрофаги или дендритные клетки. Механизмы, лежащие в основе этого процесса, изучены недостаточно. Цель настоящего исследования состояла в оценке способности эндотелиальных клеток влиять на фенотип мононуклеарных фагоцитов при их трансэндотелиальной миграции. Для создания модели трансэндотелиальной миграции *in vitro* использовали человеческие моноцитоподобные клетки линии THP-1 и человеческие эндотелиальные клетки линии EA.hy926. Фенотип клеток THP-1 оценивали при следующих ситуациях: 1) при трансмиграции их через интактный монослой эндотелиальных клеток; 2) при трансмиграции их через монослой эндотелиальных клеток, предварительно инкубированных в присутствии TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-4; 3) при культивировании этих клеток в присутствии цитокинов; 4) при трансмиграции их в присутствии TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-4 в субэндотелиальном пространстве. Экспрессию поверхностных молекул CD11b, HLA-DR и CD14 на клетках THP-1 оценивали методом проточной цитометрии. Молекулы CD11b, HLA-DR и CD14 конститутивно экспрессировались на клетках THP-1. Трансэндотелиальная миграция приводила к изменению фенотипа клеток линии THP-1, что выразилось в достоверном повышении уровня экспрессии молекул CD11b и HLA-DR. Уровень экспрессии исследуемых поверхностных молекул (CD11b, HLA-DR и CD14) был достоверно выше на клетках THP-1, которые прошли трансэндотелиальную миграцию в присутствии TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-4 в субэндотелиальном пространстве, по сравнению с уровнем экспрессии этих молекул на клетках THP-1, инкубируемых в присутствии тех же цитокинов. Трансэндотелиальная миграция в присутствии TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  вызвала достоверно более сильные изменения уровня экспрессии всех исследуемых маркеров по сравнению с уровнем экспрессии этих маркеров на клетках THP-1, которые трансмигрировали через интактный эндотелий. Уровень экспрессии исследуемых поверхностных молекул на клетках линии THP-1, прошедших трансмиграцию через интактный эндотелий, достоверно не отличались от уровня экспрессии этих молекул на клетках THP-1, прошедших трансмиграцию через монослой эндотелиальных клеток после преинкубации с цитокинами и последующей отмывки. Уровень экспрессии исследуемых маркеров на фракции клеток THP-1, которые не прошли трансэндотелиальной миграции (остались над монослоем эндотелиальных клеток), не отличается от уровня экспрессии этих маркеров на интактных клетках THP-1. Таким образом, наши исследования показали, что трансэндотелиальная миграция приводит к изменениям свойств клеток THP-1, что выражается не только в изменении фенотипа, но и в усилении чувствительности клеток THP-1 к действию цитокинов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48110).

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ХРОМОСОМ КЛЕТОК ЛИНИИ СПЭВ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ДЕКОНДЕНСИРУЮЩИМИ АГЕНТАМИ. © В. Н. Стефа-

нова. ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт разведения и генетики сельскохозяйственных животных РАСХН, vestefan@mail.ru.

Для изучения структурных изменений хромосом под воздействием неинтеркалирующих агентов, специфичных к АТ-парам ДНК, были использованы клетки линии СПЭВ, произошедшие из эмбриональной почки свиньи. В этой линии клеток прицентромерный гетерохроматин акроцентрических хромосом обогащен АТ-парами оснований, а суб- и метацентрических хромосом — как АТ-так и ГЦ-парами. В качестве агентов, вызывающих задержку конденсации определенных районов хромосом, были опробованы Х $\chi$ ст 33258, дистамицин А и ДАФИ. В ходе экспериментов было установлено, что структурные изменения хромосом, вызываемые этими агентами, зависят от концентрации и времени воздействия вещества. Несмотря на сходный механизм взаимодействия с ДНК и слабый мутагенный эффект, отмеченный у всех использованных агентов, вызываемые ими структурные изменения хромосом были специфичными и проявлялись в виде наличия межхромосомных связей между акроцентрическими хромосомами (ДАФИ), задержки конденсации прицентромерных и теломерных районов хромосом (Х $\chi$ ст 33258) и задержки конденсации прицентромерных районов акроцентрических хромосом с одновременным проявлением в них С-дисков. Обсуждаются механизмы задержки конденсации определенных районов хромосом. Полученные данные сопоставляются с результатами работ по воздействию деконденсирующих веществ на хромосомы других объектов.

СОСТОЯНИЕ КОРТИКАЛЬНОГО АКТИНА В КЛЕТКАХ K562 И U937 ПРИ ЧАСТИЧНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА. © А. В. Сударикова, Е. А. Морачевская, Ю. А. Негуляев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Холестерин является одним из основных липидных компонентов клеточных мембран, и его функциональным эффектам придают первостепенное значение в физиологии и медицине. Достоаточно давно установлено, что динамические свойства липидного бислоя во многом определяются составом и концентрацией стеролов как в модельных, так и в клеточных системах. В настоящее время накапливаются данные, свидетельствующие о латеральной гетерогенности биомембран: в плоскости бислоя выделяются микродомены, характеризующиеся более плотной упаковкой и повышенным содержанием холестерина, сфинголипидов и насыщенных жирнокислотных остатков. Ассоциация с липидными доменами, по-видимому, является одним из критических факторов, определяющих функциональную активность многих мембранных белков, в том числе ионных каналов и транспортеров. Таким образом, расширяются представления о значении липидов, в частности мембранного холестерина, для процессов передачи сигнала и клеточной регуляции. Результаты биохимических работ позволяют предполагать, что липидные микродомены имеют важное значение для связи интегральных белков плазматической мембраны и кортикального цитоскелета. Эти предположения базируются на косвенных данных по экстракции компонентов мембран с использованием различных детергентов, т. е. зависят от методических под-

ходов. Вопросы о структурной организации и функциональной значимости мембранных микродоменов в нативных клетках остаются открытыми. Работа направлена на изучение состояния и выявление перестроек кортикального актинового цитоскелета в культивируемых клетках в условиях деструкции богатых холестерином мембранных микродоменов. Основные исследования выполнены на клетках хронической миелогенной лейкемии человека K562 и клетках гистиоцитарной лимфомы U937 (Российская коллекция клеточных культур). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина. Для визуализации микрофиламентов применяли стандартные методики фиксации клеток и окраски F-актина с помощью флуоресцентного красителя родамин-фаллоидина (2 мкг/мл, TRITC-phalloidin, Sigma). Поскольку клетки K562 и U937 являются суспензионными, для повышения адгезивности и удержания на субстрате их пересевали на покровные стекла, обработанные L-полилизинном (1 мг/мл H<sub>2</sub>O), не менее чем за 30 мин до начала окраски. Для получения изображений использовали флуоресцентный микроскоп Carl Zeiss IM 35 (объектив 100 × 1.3), возбуждая и регистрируя флуоресценцию при длинах волн 546 и 590 нм, и цифровую камеру Alta U2000. Для частичной экстракции холестерина клетки инкубировали в присутствии метил-β-циклодекстрина (МβCD, 5 мМ, 1 ч) в среде без сыворотки. Обработка МβCD считается наиболее эффективным и адекватным методом для модификации стерольного состава мембран; снижение уровня холестерина приводит к деструкции липидных доменов в плазматической мембране. В контрольных препаратах в клетках K562 и U937 наблюдали типичный для суспензионных клеток кортикальный актиновый слой в виде четкого кольца под мембраной. После обработки МβCD обнаружены явные нарушения структур кортикального актина в клетках K562, но не в клетках U937. Следует отметить, что выявленные изменения актиновой сети в клетках K562, обусловленные частичной экстракцией холестерина и, возможно, деструкцией микродоменов, по своему характеру отличаются от действия цитохалазинов и от известных эффектов ингибиторов фосфатаз.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48209) и президиума РАН по программе «Молекулярная и клеточная биология».

**О ВОЗМОЖНОМ УЧАСТИИ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННОГО ГЕТЕРООРГАННОГО АНТИГЕНА В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА.** © Н. П. Терюкова, А. С. Дешева, Г. И. Блинова, Ю. М. Розанов, В. А. Иванов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Одним из наиболее типичных проявлений неопластической трансформации является синтез опухолевыми клетками антигенов, присущих дефинитивным тканям органов, не гомологичных исследуемой опухоли, так называемых гетероорганных антигенов. Ранее с помощью органоспецифической иммуносыворотки, полученной против «клеточных теней» почек крыс и трижды истощенной гомогенатом печени (т. е. антипочечной сыворотки), в составе наружных мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела, рабдомиосаркомы РА-2, культивируе-

мых клеток гепатомы НТС, миогенных клеток L6J1 и L8 выявлены опухолеассоциированные гетероорганные антигены, присущие дефинитивной ткани почек. Использование олигоспецифической антипочечной сыворотки позволяет доступными иммунологическими методами быстро улавливать изменения антигенного состава поверхностного аппарата клеток, которые, в частности, могут быть связаны с активной пролиферацией опухолевых клеток. Однако органоспецифическая иммуносыворотка содержит широкий спектр, что затрудняет интерпретацию результатов и ограничивает возможности ее применения. Для увеличения специфичности иммуносыворотки в отношении гетероорганных мембранно-связанных антигенов, ассоциированных с клетками гепатоцеллюлярных карцином, кроликов иммунизировали преципитатами, образованными в агаре между лизатами фракций, обогащенных плазматическими мембранами клеток гепатомы Зайдела, и антипочечной сывороткой. Исследование специфичности иммуносыворотки и ее влияния на пролиферацию крысиных культивируемых клеток проводили с фракцией IgG, очищенной на колонке CNBr-агарозы с иммобилизованным белком А. Методами непрямой иммунофлуоресценции и иммуноферментного анализа показано, что иммуносыворотка преимущественно реагирует с фракциями, обогащенными плазматическими мембранами клеток гепатомы Зайдела и — в меньшей степени — гепатомы НТС; с препаратами культивируемых миогенных клеток иммуносыворотка связывается примерно в 2 раза слабее, чем с препаратами клеток гепатомы Зайдела, и практически не взаимодействует с плазматическими мембранами интактных гепатоцитов. Электрофорез и последующий иммуноблоттинг выявляют белок с мол. массой около 120—130 кДа во фракциях, обогащенных плазматическими мембранами клеток гепатомы Зайдела и НТС, тогда как в миогенных клетках наблюдается лишь слабое окрашивание этих компонентов. Отметим также связывание иммуносыворотки с белком порядка 75—80 кДа клеток гепатомы Зайдела. Влияние иммуносыворотки узкой специфичности на пролиферацию культивируемых клеток определяли по включению <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК и путем анализа клеточного цикла на проточном цитометре. Показано, что при добавлении в культуральную среду 50 мкл иммуносыворотки (концентрация белка во фракции IgG около 4.7 мг/мл) включение <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК культивируемых клеток гепатомы НТС и L8 уменьшается примерно на 25 и 24 %, а при добавлении 100 мкл иммуносыворотки — на 40 и 27 % соответственно по сравнению с контрольными лунками, к клеткам которых добавляли белок фракции IgG, выделенной из плазмы крови неиммунизированного кролика. Иммуносыворотка не влияет на включение метки в ДНК клеток L6. В то же время в присутствии полученной нами иммуносыворотки узкой специфичности наблюдается задержка гепатомы НТС в фазе G<sub>1</sub> — 56.14 ± 0.67 % клеток против 48.99 ± 1.76 % клеток в контрольных лунках, тогда как на миогенных клетках ингибирующий эффект иммуносыворотки выражен значительно слабее или вообще отсутствует: для L8 — 60.45 ± 0.24 и 59.51 ± 0.23 %, для L6 — 71.46 ± 0.33 и 71.08 ± 0.93 % соответственно. Таким образом, возможно участие мембранного гетероорганного опухолеассоциированного антигена с мол. массой около 120—130 кДа в процессе пролиферации клеток гепатомы НТС, а именно в регуляции перехода клеток G<sub>1</sub>-фазы в S-фазу.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49186).

**РОЛЬ ШАПЕРОНА БТШ70 В ЗАЩИТЕ КЛЕТОК НЕЙРОНАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ОТ ГИПОКСИЧЕСКОГО СТРЕССА.** © Н. С. Тихонова, О. С. Москалева, И. В. Гужова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, guzhova@mail.cytspb.rssi.ru.

Кислород используется в живых организмах для осуществления большей части окислительно-восстановительных реакций, в результате чего вырабатывается энергия, необходимая для обеспечения жизненно важных процессов. При нарушении механизма поступления кислорода в организм, процессов его транспортировки и использования в тканях развивается кислородное голодание — гипоксия. Гипоксия/ишемия как стрессорный фактор вызывает гибель клеток (апоптоз), а потому является важнейшим патогенным фактором при развитии различных заболеваний (болезни сердца и головного мозга). Клеточный ответ на гипоксический стресс основан на активации белкового фактора HIF (hypoxia-inducible factor). Транскрипционный фактор HIF — димер, он состоит из двух белков — HIF-1 $\alpha$  и HIF-1 $\beta$ . Оба белка постоянно экспрессируются клетками в условиях нормоксии, но HIF-1 $\alpha$  моментально подвергается деградации. В стабилизации или дестабилизации HIF-1 $\alpha$  принимают участие продукт гена опухолевого супрессора VHL (pVHL), БТШ90, Е3-лигаза и другие белки. Белки теплового шока (БТШ) обладают выраженным защитным эффектом и способны защищать клетку от различных повреждающих факторов. При кислородном голодании экспрессия белков теплового шока также усиливается, что приводит к повышению устойчивости клеток к ишемическому стрессу. Наиболее консервативным из них является семейство БТШ70. Благодаря своей способности узнавать поврежденные, денатурированные или вновь синтезированные белки, препятствовать их агрегации, участвовать в сворачивании белковых молекул, а также в их внутриклеточном транспорте БТШ70 был назван молекулярным шапероном. Шаперонная активность — основное свойство БТШ70, помогающее ему осуществлять его защитную функцию. Взаимодействуя с различными сигнальными молекулами, БТШ70 участвует в различных процессах клеточной физиологии, например в апоптозе. Целью настоящего исследования стало изучение роли основного белка теплового шока — БТШ70 — в защите клеток от гипоксического стресса. В ходе работы нами была выявлена роль БТШ70 в защите клеток нейробластомы SK-N-SH от гипоксии, вызванной действием хлорида кобальта. Клетки были трансфицированы геном *bmi70* под контролем индуцибельного металл-тионеинового промотора. Было показано, что повышенная экспрессия БТШ70 усиливает жизнеспособность клеток нейробластомы SK-N-SH в условиях, моделирующих гипоксию, и защитный эффект БТШ70 имеет дозозависимый характер, т. е. чем выше экспрессия БТШ70, тем более выражен защитный эффект. Помещение клеток SK-N-SH в условия, моделирующие состояние гипоксии, приводит к появлению стабильной формы транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$ , которая преимущественно локализована в ядре. В клетках SK-N-SH с повышенной экспрессией БТШ70 время жизни стабильной формы HIF-1 $\alpha$

увеличено по сравнению со временем жизни HIF-1 $\alpha$  в клетках SK-N-SH дикого типа. С помощью метода иммуноблоттинга и конфокальной микроскопии был определен характер взаимодействия БТШ70 и HIF-1 $\alpha$ . Стабилизация HIF-1 $\alpha$  происходит в результате его физического взаимодействия с БТШ70, при падении уровня накопления БТШ70 в клетке HIF-1 $\alpha$  подвергается деградации. Таким образом, нами была выявлена связь белка HIF-1 $\alpha$ , участвующего в реализации клеточного ответа на гипоксию, с БТШ70.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49237) и президиума РАН по программе «Молекулярная и клеточная биология».

**МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ И ГОРМОНАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНДОКРИННЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ.** © И. С. Турчин, И. И. Дроздович, А. С. Ларин, Л. Н. Сидоренко, Л. А. Кожевникова, О. П. Потиха. Украинский научно-практический центр эндокринной хирургии, трансплантации эндокринных органов, тканей и клеток МЗ Украины и Координационный центр трансплантации органов, тканей и клеток МЗ Украины, Киев.

В последние годы с целью лечения клинических проявлений эндокринопатий достаточно эффективно используется трансплантация клеток и тканей соответствующих эндокринных желез, а именно ауто-, алло- и ксенотрансплантация. В большинстве стран Европы запрещена аллотрансплантация эмбриональных и фетальных клеток, в том числе и эндокринных. Исходя из этого особенно актуальной является проблема ксенотрансплантации, в частности изучение вопросов, связанных с ее эффективностью. В предыдущих наших работах в эксперименте и клинике была показана высокая эффективность ксенотрансплантации клеток и тканей эндокринных желез новорожденных поросят при соответствующих эндокринопатиях. Ксенотрансплантация может быть альтернативной гормонотерапии. При этом важным моментом является степень целостности citoархитектоники ткани эндокринной железы, что способствует высокому уровню гормональной активности эндокринных клеток. В настоящее время нами разработан принципиально новый метод лечения эндокринопатий, основанный на комбинированной трансплантации органных и клеточных культур эндокринных желез. Суть метода заключается в том, что в организм реципиента вводятся «основной» и «вспомогательный» ксенотрансплантаты. Последний выполняет функцию иммунодепрессанта. Следует отметить, что каждый «трансплантат-иммунодепрессант» имеет различный механизм действия. Учитывая, что в организме реципиента-человека невозможно изучение всех тонкостей механизма взаимодействия сотрансплантаты—реципиент, целесообразным является изучение эффекта их действия не только при совместном культивировании, но и при некоторых экспериментальных эндокринопатиях (гипотиреоз, сахарный диабет). На функциональную активность эндокринных клеток в культуре могут влиять некоторые гормоны или гормональные препараты. Глюкокортикоиды благодаря своему влиянию на пролиферацию и белковый синтез угнетают образование клеток-киллеров, плазматических клеток, а также синтез антител. В проведенных исследованиях по-

казано активирующее влияние экзогенного гидрокортизона на функциональную активность тироцитов в культуре, наблюдается выраженное повышение (до 60 %) тироксина в культуральной среде. В результате проведенных морфологических и функциональных исследований показано, что при совместном культивировании щитовидных желез с тканью надпочечника или семенника наблюдается повышение функциональной активности тироцитов (морфологически это проявляется в увеличении их высоты) и уровня тироксина в культуральной среде. У тиреоидэктомированных крыс лечебный эффект после совместной трансплантации культур щитовидной железы и надпочечника или семенника (особенно последнего) более выражен, чем при применении только культуры щитовидной железы, повышение уровня тироксина в крови в последнем случае более значительное и сохраняется таковым дольше. Значительно снижается лейкоцитарная инфильтрация ксенотрансплантата, усиливается его васкуляризация. При совместном культивировании поджелудочной железы с тканью семенника или пулом клеток Сертоли наблюдаются усиление функциональной активности  $\beta$ -инсулоцитов и повышение содержания инсулина в культуральной среде. Совместная трансплантация органной культуры поджелудочной железы с клетками Сертоли, сенсibilизированными антигенами поджелудочной железы крыс, угнетает развитие вторичной специфической иммунной реакции. У крыс со стрептозотоциновым диабетом комбинированная ксенотрансплантация более эффективна, чем одиночная. Комбинированный трансплантат быстрее и дольше нормализует уровень специфических гормонов в крови реципиентов, а также более активно способствует регенераторным процессам в поджелудочной железе.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕСТА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДИКАТИОНА МАГНИЯ С АТФ—Г-АКТИНОМ И СВОБОДНОЙ АТФ В РАСТВОРАХ С ПОМОЩЬЮ УФ-СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ.** © В. Н. Умецкая. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Рассмотрено взаимодействие дикатиона магния с АТФ-содержащим Г-актином в связи с исследованием механизма перехода АТФ—Г-актина в Ф-актин. На основании УФ-спектров поглощения и известных в литературе ЯМР-спектров поглощения показано, что присоединение дикатиона магния к свободной АТФ и к связанной в АТФ—Г-актине в растворе сопровождается изменением спектров поглощения аденинового кольца. Нами был сделан вывод о том, что дикатион магния находится во взаимодействии с кольцом аденина молекулы АТФ, что подтверждают данные ЯМР-спектров поглощения агрегатов деоксинуклеозидов АТФ-ТТФ в растворе, показывающие, что дикатион магния образует координатный комплекс с концевой фосфатной группой трифосфата АТФ и азотом в седьмом положении атомов аденина таким образом, что цепь трифосфата не является линейной. Предполагается, что это взаимодействие приводит к отщеплению конечного фосфата и образованию АТФ—Г-актина, что является начальной стадией полимеризации АТФ—Г-актина с последующим переходом его в Ф-актин. Наше рассмотрение показывает механизм участия низкомолекулярного лиганда в образовании надмолекулярной структуры и подтверждает рассмотрение когерентности на молекулярном уровне как проявление

молекулярных свойств молекул, образующих биополимер, в противоположность развиваемому в настоящее время представлению, согласно которому когерентность рассматривается как возникновение и распространение во времени нескольких суперпозирующих интерферирующих состояний, как показано при рассмотрении начальной стадии сборки тубулина в микротрубочках с помощью квантово-химического расчета, в предположении, что взаимодействие дикатиона магния происходит с линейной трифосфатной цепью ГТФ.

**ДЕФЕКТ ГЕНА СИНДРОМА ВЕРНЕРА ВЕДЕТ К КРАЙНЕЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК К 6-ТИОГУАНИНУ.** © М. В. Филатов, А. В. Иванов. С.-Петербургский институт ядерной физики РАН, 188300, Гатчина, Орлова Роша, anivanov@omrb.pnpi.spb.ru.

Синдром Вернера — аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся ярко выраженным преждевременным старением. Проявляется клинически высоким уровнем гипергликемии и инсулина, задержкой роста, алопецией, преждевременной сединой, катарактой, гипогонадизмом, атрофией мышц и частыми саркомами. Болезнь обусловлена геном *WRN*, мутации которого приводят к феномену преждевременного старения на организменном уровне и повышенной чувствительности клеток к некоторым агентам, интерферирующими с репликацией ДНК. Продуктом этого гена является белок, обладающий геликазной, ДНК-зависимой АТФазной и экзонуклеазной активностями. Однако если на организменном уровне наблюдаемые проявления данного генетического дефекта ярко и несомненно выражены, то на клеточном уровне описанное повышение чувствительности к камптотецину, оксимочевине, арабинозиду цитозина относительно невелико. Обнаружение воздействий, которые приводят к более выраженной специфической чувствительности клеток, гомозиготных по мутации *WRN*, могло бы дать более определенное представление о характере молекулярных событий, существенных для биологической функции данного гена. Нами обнаружено, что перевиваемая клеточная линия AG11395 (фибробласты человека, больного синдромом Вернера), дефектная по гену *WRN*, чрезвычайно чувствительна к низким дозам 6-тиогуанина. Трансфицирование этих клеток плазмидой, несущей ген *WRN* дикого типа под эукариотическим промотором, полностью преодолевает наблюдаемую чувствительность. Подбор концентрации 6-тиогуанина позволяет найти условия, которые абсолютно запрещают рост *WRN*<sup>-/-</sup>-клеток, не препятствуя существенно росту клеток, несущих ген *WRN* дикого типа. Таким образом, может быть осуществлена прямая однократная селекция, клеток, приобретших ген *WRN*, основанная на использовании его в качестве селективного маркера. Такая экспериментально подобранная доза 6-тиогуанина оказалась равной 0.03 мкг/мл. Как вариант был проведен эксперимент с большими дозами 6-тиогуанина (до 20 мкг/мл). При этом воздействие длилось 24 ч и сопровождалось отмывкой и инкубацией в чистой среде. При этом характер гибели клеток различался, но в результате погибали все клетки — как *WRN*<sup>-/-</sup>, так и *WRN*<sup>+/-</sup>. Оказалось, что подобное невозможно при использовании других селективных агентов — камптотецина, арабинозида цитозина, оксимочевины и метатрексата. Хотя во всех этих случаях выживаемость клеток *WRN*<sup>+/-</sup>

превосходила таковую клеток *WRN*<sup>-/-</sup>, полной гибели *WRN*<sup>-/-</sup> при выживании контроля не происходило. Трансфекция клеток геном *WRN*, дефектным только по экзонуклеазной активности, также повышает устойчивость клеток AG11395 к 6-тиогуанину в отличие от трансфекции клеток плазмидным вектором, использованным для клонирования, однако активность вектора существенно ниже, чем таковая полноценного гена дикого типа. Особенность 6-тиогуанина, отличающая его от других агентов, препятствующих нормальному прохождению репликативной вилки, заключается в том, что он делает это не в первом цикле репликации, когда он включается во вновь синтезируемую цепь ДНК, а во втором цикле, когда репликация идет по матрице, содержащей 6-тиогуанин. Высказывается гипотеза о том, что функционирование белка *Wtn* существенно для преодоления препятствий репликации, возникающих вследствие нарушений в матричной ДНК.

**РОЛЬ ЛАМИНИНА В РАСПОЗНАВАНИИ И ЛИЗИСЕ ЕСТЕСТВЕННЫМИ КИЛЛЕРАМИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК.** © Н. А. Филатова, И. И. Тюряева, В. А. Иванов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Несмотря на интенсивное изучение естественных киллеров (ЕК) во многих лабораториях мира, по-прежнему нет ясности в том, какие структуры распознаются на опухолевых клетках и что служит распознающими детерминантами у ЕК. Одним из возможных компонентов, входящих в состав этих детерминант, как предполагают некоторые исследователи, является ламинин. В предыдущих исследованиях нами было показано, что гепатоцеллюлярные опухоли синтезируют ламинин, являющийся компонентом внеклеточного матрикса, который локализован на внешней мембране опухолевых клеток и выявляется нами как опухолеассоциированный антиген. Согласно полученным нами данным, в состав рецепторного комплекса ЕК мышей входит, по-видимому, ламинин, антитела к которому блокируют естественную киллерную активность (ЕКА) независимо от присутствия комплемента. Вероятно, синтез опухолевыми клетками ламинина важен не только для стимулирования пролиферативных потенциалов клеток, в частности гепатоцитов, но и для модуляции чувствительности опухолевых клеток в отношении ЕК. Предобработка спленоцитов мышей антиламининовой сывороткой приводила к тому, что ЕКА спленоцитов в отношении опухолевых клеток была снижена, причем в отношении культивируемых клеток гепатомы крысы НТС наблюдалось двукратное снижение ЕКА, а культивируемых клеток миелолейкоза человека K562 — в 10 раз. Предобработка спленоцитов нормальной неиммунной сывороткой не приводила к изменению ЕКА. Совсем иную картину наблюдали при предобработке опухолевых клеток антиламининовой сывороткой. Предобработка клеток K562 приводила к двукратному уменьшению чувствительности этих клеток к ЕК-лизису, предобработка же клеток НТС, наоборот, делала их более чувствительными к ЕК-лизису (в 2 раза). Электрофоретическое разделение белков плазматических мембран клеток-мишеней и последующий иммуноблоттинг с антиламининовой иммуносывороткой обнаружили присутствие ламинина в плазматических мембранах клеток НТС, но не в плазматических мембранах клеток K562. Предобработка спленоцитов ламинином не приводила к изме-

нению ЕКА в отношении опухолевых клеток K562 и НТС. Предобработка ламинином клеток K562 и НТС снижала ЕКА до нуля. Таким образом, возможным кандидатом в состав рецептора естественных киллеров мышей, участвующим в распознавании опухолевых клеток, является, по-видимому, ламинин, антитела к которому блокируют естественную киллерную активность вне зависимости от присутствия комплемента. В то же время для опухолевых клеток для выполнения естественных киллерных функций важно наличие «открытых» рецепторов к ламинину, поскольку предобработка ламинином опухолевых клеток независимо от происхождения приводит к полной утрате последними чувствительности к естественному киллерному лизису.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49186).

**ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК С РЕПЛИКАТИВНО ИНАКТИВИРОВАННЫМ ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ ОДНОГО ИЗ ПАРТНЕРОВ ПО СЛИЯНИЮ.** © Е. И. Филасова, О. В. Зацепина, О. А. Ларионов, Ю. М. Ходарович. Институт биоорганической химии РАН, Москва, fei@mail.ibch.ru.

Эффективность клеточной терапии во многом определяется свойствами клеток, используемых в трансплантации. Наиболее привлекательным представляется применение аутологичных пациенту клеток с требуемым типом дифференцировки. Однако существующие в настоящее время подходы к получению таких клеток, включая терапевтическое клонирование, основанное на энуклеации ооцитов, использование стволовых клеток костного мозга или жировой ткани, обладают рядом существенных недостатков, к которым, в частности, относятся сложность получения материала и сопряженность с необходимостью решения ряда морально-этических проблем. Поэтому разработка новых технологий получения объектов, пригодных для клеточной терапии, до сих пор остается актуальной. За последние годы опубликовано много работ, подтверждающих дедифференцировки соматических ядер клеток мыши и человека при образовании гибридов эмбриональных стволовых клеток и эмбриональных карциномных клеток. Такие гибриды обладают многими свойствами ЭСК и могут быть дифференцированы в практически любой необходимый для терапии тип клеток, однако наличие в таких гибридах генетического материала обоих партнеров по слиянию не позволяет использовать их в практической медицине. В настоящей работе мы показали возможность получения гибридных клеток после репликативной инактивации ДНК одного из партнеров по слиянию с помощью обработки ДНК-сшивающим агентом митомицином С. Работу проводили на эмбриональных клетках карциномы мыши линии P19 и PCC4aza1. Клетки PCC4aza1 несут дефект в гене *HPRT* и не способны расти в среде, содержащей НАТ. Мы показали, что обработка клеток P19 митомицином С не препятствует образованию жизнеспособных гибридов с интактными клетками PCC4aza1. При этом обработка митомицином С существенно не влияла на эффективность образования гибридов. Хромосомный анализ гибридных клеток показал наличие в них хромосом клеток PCC4aza1. Микросателлитный ПЦР-анализ и

аллель-специфичная ПЦР на митохондриальную ДНК также говорят о том, что в потомках гибридных клеток содержится генетический материал только одного из партнеров по слиянию (PCC4aza1). Представляется, что разработанный метод репликативной инактивации одного из родительских партнеров по слиянию может найти применение в клеточной терапии для получения диплоидных гибридных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке президиума РАН по программе «Молекулярная и клеточная биология».

**РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЦИТОКИНАМИ.** © И. С. Фрейдлин, Э. А. Старикова, А. А. Чернова. ГУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург.

Эндотелиальные клетки принимают непосредственное участие в обеспечении мобилизации лейкоцитов из сосудов в ткани, в очаги инфекции и воспаления. Регуляция этих физиологических функций эндотелиальных клеток опосредована в значительной степени цитокинами, которые продуцируются активированными лейкоцитами и самими эндотелиальными клетками. Для изучения непосредственного влияния цитокинов на свойства и функции эндотелиальных клеток мы использовали экспериментальную модель, основанную на культивировании перевиваемой линии эндотелиальных клеток человека EA.hy926 и совместном культивировании этих эндотелиальных клеток с клетками моноцитоподобной линии THP-1. Мы изучали влияние провоспалительных и противовоспалительных цитокинов на экспрессию адгезивных молекул эндотелиальными клетками линии EA.hy926 и секрецию ими хемокинов, а также на адгезивность и хемоаттрактантную активность этих клеток. Для клеток линии EA.hy926 был характерен низкий спонтанный уровень экспрессии молекул ICAM-1 и VCAM-1. Провоспалительные цитокины TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  индуцировали экспрессию молекул ICAM-1 и VCAM-1, причем IFN $\gamma$  оказывал значительно менее выраженное действие. Противовоспалительный цитокин IL-4 не оказывал самостоятельного влияния на экспрессию адгезивных молекул ICAM-1 и VCAM-1 на клетках EA.hy926, но ингибировал экспрессию этих молекул, индуцированную провоспалительными цитокинами. Изучение адгезивности эндотелиальных клеток для клеток моноцитоподобной линии показало, что влияние цитокинов на экспрессию молекул ICAM-1 и VCAM-1 и на адгезивность клеток линии EA.hy926 для клеток линии THP-1 в некоторых случаях было разнонаправленным. Так, IFN $\gamma$ , индуцированный экспрессию адгезивных молекул на эндотелиальных клетках, ингибировал адгезивность монослоя клеток линии EA.hy926 для клеток линии THP-1. IL-4 не оказывал самостоятельного влияния на экспрессию адгезивных молекул, но ингибировал адгезивность эндотелиальных клеток для клеток линии THP-1. Преинкубация эндотелиальных клеток в присутствии TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  вызывала усиление адгезивности эндотелия. Возможно, что именно провоспалительные цитокины опосредуют повышение адгезивности эндотелиальных клеток для лейкоцитов при инфекциях, так как непосредственное стимулирующее влияние изученных нами мик-

робных компонентов на адгезивность эндотелиальных клеток оказалось значительно менее выраженным. Для реализации адгезии лейкоцитов к монослою эндотелиальных клеток недостаточно усиления экспрессии адгезивных молекул на эндотелиальных клетках, для этого требуется еще участие хемокинов, которые опосредуют все этапы адгезии. Эндотелиальные клетки линии EA.hy926 спонтанно секретировали хемокины IL-8 и MCP-1. Оценка изменений уровня секреции IL-8 и MCP-1 эндотелиальными клетками EA.hy926 под влиянием TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4, а также их комбинаций через 24 ч после отмывки от цитокинов показала, что только TNF $\alpha$  и IL-4 оказывали стимулирующее влияние на секрецию IL-8 и MCP-1 клетками EA.hy926. IFN $\gamma$  достоверно ингибировал спонтанную и стимулированную TNF $\alpha$  секрецию хемокинов. Хемокины выполняют функции хемоаттрактантов для моноцитов. Изучение хемотаксиса клеток линии THP-1 по направлению к монослою эндотелиальных клеток позволило более полно оценить спонтанную и индуцированную секрецию хемоаттрактантов эндотелиальными клетками линии EA.hy926. Выявлена статистически достоверная положительная корреляция между интенсивностью продукции IL-8 и MCP-1 эндотелиальными клетками, преинкубированными с цитокинами TNF $\alpha$  и IL-4, и хемотаксисом клеток THP-1 по направлению к монослою эндотелиальных клеток, преинкубированных с теми же цитокинами. Преинкубация эндотелиальных клеток с IFN $\gamma$  приводила к снижению обоих параметров. Влияние цитокинов на секрецию хемокинов и на адгезивность эндотелиальных клеток линии EA.hy926 для клеток моноцитоподобной линии THP-1 были однонаправленными в случае предобработки эндотелиальных клеток TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  и разнонаправленными в случае предобработки эндотелиальных клеток IL-4. Цитокины TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  IL-4 индуцировали разные варианты активации эндотелиальных клеток, которые могут реализовываться в ходе разных физиологических или патологических процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48110).

**РЕОРГАНИЗАЦИЯ ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА ЭФР-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ.** © М. В. Харченко, А. А. Аксенов, Б. В. Шрамко, Е. С. Корнилова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В ходе эндоцитоза комплексы рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) с лигандом, находящиеся в составе эндосом, перемещаются от периферии клетки в околядерную область. Этот процесс зависит от наличия интактных радиально организованных микротрубочек (МТ). Предполагают, что эндосомы, образующиеся на периферии клетки, движутся в околядерную область по МТ. Этот процесс происходит за счет привлечения моторного белка динеина, обеспечивающего перемещение груза к «минус-концам» МТ, локализованных вокруг центра организации МТ. Считается, что в ходе этого процесса организация тубулинового цитоскелета остается неизменной. Исследуя эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов в клетках линии A431 методом двойной непрямой иммунофлуоресценции, мы обнаружили, что в

ходе этого процесса организация системы МТ претерпевает значительные изменения. В течение первых 15 мин после стимуляции эндоцитоза МТ сохраняли радиальную организацию, при этом количество МТ в периферической зоне цитоплазмы было весьма значительным. Через 30—60 мин после стимулирования эндоцитоза МТ перераспределялись к ядру, а их количество на периферии значительно уменьшалось. Первоначальная радиальная организация тубулинового цитоскелета восстанавливалась лишь на поздних стадиях эндоцитоза, когда основная часть ЭФР-рецепторных комплексов достигала лизосом и подвергалась деградации. В клетках линии HeLa, несмотря на различия в организации радиальной системы МТ, наблюдались аналогичные изменения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49046).

**ВЛИЯНИЕ ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНОЙ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА КРОВΟΣНАБЖЕНИЕ ИШЕМИЗИРОВАННОГО МИОКАРДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.** © Н. В. Цупкина,<sup>1</sup> А. А. Матюков,<sup>2</sup> А. Н. Ялфимов,<sup>3</sup> О. Н. Савченко,<sup>3</sup> Л. А. Тютин,<sup>3</sup> Т. Д. Власов,<sup>2</sup> В. В. Гриценко,<sup>2</sup> В. В. Давыденко,<sup>2</sup> Г. П. Пина.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, natth5@inbox.ru, <sup>2</sup> С.-Петербургский государственный медицинский университет, и <sup>3</sup> Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт МЗ РФ, Санкт-Петербург.

Ишемическая болезнь сердца представляет собой широко распространенное заболевание и является основной причиной летальности в большинстве промышленно развитых стран мира. Используемые в настоящее время для лечения ишемии миокарда консервативные и оперативные методы не всегда эффективны или не могут быть применены по ряду причин. В связи с этим разрабатываются новые подходы к оптимизации процесса регенерации пораженного миокарда с использованием достижений молекулярной и клеточной биологии. Одним из таких подходов является трансплантация клеток. Однако многие вопросы в этой области медицины остаются нерешенными и требуют дальнейшего исследования. В работе представлены результаты исследования по сравнительной оценке влияния аутологичной интрамиокардиальной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга и ядросодержащей фракции костного мозга на кровоснабжение ишемизированного миокарда кролика. Инфаркт миокарда моделировали путем лигирования нисходящей ветви левой коронарной артерии. Забор костного мозга производили путем пункции крыла подвздошной кости, ядросодержащие клетки (ЯСК) выделяли путем фракционирования костного мозга в градиенте плотности Перколл. Культуру ММСК получали после культивирования ядросодержащей фракции костного мозга в среде  $\alpha$ -MEM с 10 % бычьей эмбриональной сыворотки в течение 21 сут. Оценка кровоснабжения миокарда проводили методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии с использованием радиофармацевтического препарата (РФП) <sup>99m</sup>Tc-тетрафосмина (Муовью) перед моделированием инфаркта миокарда и спустя 10 сут, 1.5, 3, 6 и 12 мес. Были сформированы три группы живот-

ных: животным 1-й группы ( $n = 12$ ) в ишемизированную зону вводили ММСК костного мозга ( $2 \cdot 10^6$ ), животным 2-й группы ( $n = 14$ ) вводили ядросодержащую фракцию костного мозга ( $2 \cdot 10^6$ ) и животным 3-й группы ( $n = 15$ , контроль) вводили ростовую среду. У всех животных после введения ММСК и ЯСК через 1.5 мес после операции отмечалось значительное улучшение кровоснабжения. Средние значения накопления РФП составили  $0.92 \pm 0.03$  и  $0.89 \pm 0.03$  соответственно, в контрольной группе —  $0.62 \pm 0.02$ . К 3 мес после операции полная нормализация кровоснабжения отмечалась в опытных группах, где уровень накопления РФП составил  $100 \pm 0.02$  и  $0.98 \pm 0.01$ , тогда как в контрольной группе этот показатель не увеличился и равнялся  $0.61 \pm 0.01$ . Показатели равномерности кровоснабжения в патологической и референтной зонах на 10-е сут после операции составили:  $2.7 \pm 0.2$  и  $2.1 \pm 0.2$  после введения ММСК;  $2.6 \pm 0.2$  и  $1.8 \pm 0.3$  после введения ЯСК;  $2.8 \pm 0.3$  и  $2.1 \pm 0.1$  в контрольной группе. Через 3 мес после моделирования инфаркта в опытных группах эти значения достоверно не различались ( $1.9 \pm 0.1$ ,  $2.0 \pm 0.1$ ,  $2.1 \pm 0.1$  и  $2.0 \pm 0.2$ ); в контрольной группе неравномерность кровоснабжения значительно выросла и составила  $3.5 \pm 0.2$  в пораженном сегменте по отношению к  $2.0 \pm 0.1$  в интактном сегменте. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что интрамиокардиальная ауто-трансплантация ММСК и ЯСК костного мозга приводит к полному восстановлению ишемизированного миокарда в эксперименте. Можно предположить, что трансплантированные ММСК главным образом влияют на процесс неоангиогенеза за счет их дифференцировки в сосудистые структуры и выработки ангиогенных факторов, а ЯСК — за счет секреции ростовых факторов. Однако механизм неоангиогенеза после трансплантации клеток до конца не изучен, что требует проведения дальнейших исследований.

**ПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЕ ПОТЕНЦИИ ОТДЕЛЬНЫХ КЛООНОВ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ММСК) КОСТНОГО МОЗГА.** © Р. К. Чайлахян, Ю. В. Герасимов, Н. В. Лацник, А. И. Куралесова, М. Р. Чайлахян, Е. Н. Генкина. ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии РАМН, Москва.

Представлены результаты исследований пролиферативных и дифференцировочных потенциалов мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), образующих в монослойных культурах костного мозга индивидуальные клоны стромальных фибробластов (КОКф). Пролиферативные потенциалы изучали в монослойных культурах. Клетки, дающие в первичных культурах костного мозга начало большим колониям, содержащим  $3 \cdot 10^3$ — $10 \cdot 10^3$  фибробластов, составляют 10 % популяции КОКф и при пассировании образуют моноклональные штаммы, проходя до 34 удвоений. Моноклональное происхождение штаммов подтвердилось с помощью хромосомной метки. Дифференцировочные потенциалы исследовали при обратной трансплантации в организм таких больших клонов и моноклональных штаммов в системе, открытой для репопуляции клеток (1), либо в системе, закрытой для перемещения клеток (2). В 1-м случае гетеротипную трансплантацию под почечную капсулу фибробластных клонов проводили на

коллагеновой подложке, а взвесь пассированных фибробластов моноклонального происхождения — в пористых каркасах. При этом на месте трансплантата отдельного клона в 5 % случаев формируется костномозговой орган с микроокружением в виде костной и ретикулярной ткани, пригодной для дифференцировки всех трех ростков гемопоэза; в 15 % случаев формировался костный орган, а в 80 % случаев образовывалась ретикулярная ткань. При трансплантации моноклональных штаммов костномозговые органы образуются в 14 % случаев, костные — в 33 % и ретикулярные — в 53 %. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что часть клонов стромальных клеток способна строить кость и при этом обеспечивать формирование микроокружения для всех трех ростков гемопоэза. Наряду с такими ММСК имеется часть предшественников, образующих костную ткань с неограниченным или ограниченным сроком самоподдержания. Наконец, часть ММСК способна к формированию только ретикулярной ткани, не заселяющейся кроветворными клетками. Разница в соотношении клонов с определенной дифференцировочной потенцией при трансплантации первичных клонов и моноклональных штаммов может объясняться как разными условиями для дифференцировки при разных способах трансплантации, так и селекцией потомков ММСК при длительном пассировании. Кроме того, ММСК с разными потенциями могут быть в различных соотношениях представлены среди больших колоний и среди фибробластов моноклональных штаммов, хотя для пассирования тоже выбирали крупные колонии. В закрытой системе — в диффузионных камерах (2), препятствующих репопуляции клеток, — потомки отдельных ММСК формировали костную, хрящевую либо соединительную ткань, причем 25 % ММСК давали потомство, способное делать это одновременно, т. е. получены доказательства, что популяция ММСК во взрослом организме по дифференцировочным потенциям является гетерогенной, но при этом имеются и общие предшественники для костной, хрящевой и ретикулярной тканей, которые претендуют на роль стволовых клеток стромы костного мозга. Для дальнейшего изучения структуры популяций ММСК следует использовать маркеры соответствующих дифференцировочных белков.

**ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК В ТКАНЯХ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS* НА РАННИХ СРОКАХ РЕГЕНЕРАЦИИ.**  
© Н. С. Шарлаимова, О. А. Петухова, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Регенерационные процессы активно исследуются в настоящее время. Наибольший интерес с этой точки зрения вызывают иглокожие, характеризующиеся уникальной способностью восстанавливать различные органы и ткани после ранения. Рассматриваются два основных способа регенерации иглокожих: морфаллаксис, при котором клетки трансдифференцируются или мигрируют из существующих клеточных популяций к месту регенерации, и эпиморфоз, предполагающий восполнение клеточной популяции за счет делений недифференцированных клеток-предшественников. В настоящей работе была предпринята попытка выявить источники делящихся клеток различных тканей морской звезды *Asterias rubens* в ответ на ранение на ранних сроках регенерации.

Предполагаемыми источниками служили аксиальный орган (АО), тидемановы тельца (ТТ) и целомический эпителий (ЦЭ; в том числе отдельно рассматривали ЦЭ раненого луча и клетки смыва ЦЭ), а также клетки целомической жидкости — целомоциты (ЦЦ). Эксперименты проводили на Беломорской биологической станции Зоологического института РАН в сентябре 2004 и 2005 гг. У звезд диаметром 5—6 см отрезали кончик луча, максимально спускали целомическую жидкость, после чего животных содержали в термостатированной камере при 10° С и аэрации в течение 5 ч, 3 и 7 сут. Для оценки пролиферативной активности в тканях использовали включения в ДНК бромдеоксиуридина (БДУ), который вводили звездам за 5 ч до фиксации клеток в концентрации 30 мкМ исходя из объема целомической жидкости. Кроме того, диссоциированные коллагеназой (0.02%-ный раствор) клетки исследуемых тканей переводили в культуру и оценивали пролиферативную активность клеток *in vitro*. Клетки культивировали в модифицированной среде Лейбовича с добавлением 2 % фетальной сыворотки и антибиотиков при 16° С. Включение БДУ было обнаружено в клетках всех исследуемых тканей. Во всех случаях пролиферативную активность обнаруживали клетки с тонким слоем цитоплазмы и круглым ядром диаметром 4—5 мкм либо клетки с продолговатыми ядрами размером 6 × 4—7 × 4 мкм. Пролиферативная активность клеток ЦЭ через 5 ч после нанесения раны увеличивалась с 0.1 до 0.7 %, однако к 7-м сут оказалась на исходном уровне. Включение БДУ в ТТ в среднем колеблется от 10 до 30 % от уровня в контроле и не изменяется со временем. Следует отметить, что в одном из экспериментов через 7 сут после нанесения раны было обнаружено увеличение пролиферативной активности клеток ТТ до 5.5 %. Поскольку функции ТТ изучены недостаточно, можно предположить, что такая варибельность связана именно с функциональными характеристиками ткани. В данном случае БДУ включали крупные клетки с асимметрично расположенным ядром. Для АО выявлено уменьшение пролиферативной активности с 0.30 до 0.02 % через 7 сут регенерации. В ЦЦ контрольных звезд включение БДУ обнаружено не было, в случае регенерации через 5 ч в целомической жидкости появляются клетки, синтезирующие ДНК (до 0.1 %), через 3 и 7 сут доля этих клеток не изменяется. Исследование пролиферативной активности клеток в культуре показало, что через 1 сут культивирования доля клеток, включающих БДУ, остается на том же уровне, который был выявлен в опытах *in vivo*. Однако уже на 2-е сут культивирования включение БДУ обнаружено не было. Таким образом, на ранних сроках после нанесения раны значительного увеличения пролиферативной активности клеток исследованных тканей не происходит. Полученные данные позволяют предположить, что основным источником клеток в этом случае могут являться клеточные депо. При переводе клеток в культуру наблюдается прекращение синтеза ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-08017).

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ КОЛЛАГЕНОВЫХ СУБСТРАТОВ, ПРИКРЕПЛЕННЫХ К ПОЛИМЕРНОЙ ПОДЛОЖКЕ, НА РОСТ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК**

КОЖИ В КУЛЬТУРЕ. © Ю. А. Швед,<sup>1,2</sup> Л. В. Кухарева,<sup>2</sup> М. И. Блинова,<sup>2</sup> А. Ю. Билибин,<sup>1</sup> Г. П. Пинаев.<sup>2,1</sup> Химический факультет С.-Петербургского государственного университета, ulychka@mail.ru, и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Коллаген — важный структурный элемент межклеточного вещества соединительной ткани. Коллаген содержится в тканях всех многоклеточных животных. Особая конформация макромолекулы этого белка и специфическое распределение зарядов и гидрофобных областей на ее поверхности обуславливают способность молекул коллагена к образованию фибриллярных структур межклеточного вещества, которые являются основным строительным материалом каркаса органов и тканей. Оптимальной моделью для исследования свойств коллагена и его взаимодействия с клеточным окружением *in vitro* является коллагеновый гель, структура которого имитирует фибриллообразование макромолекул коллагена *in vivo*. Поэтому в настоящее время коллагеновый гель находит широкое применение в качестве субстрата для культивирования клеток, в частности для роста и пролиферации клеток кожи — кератиноцитов и фибробластов. Целью настоящей работы является исследование влияния структуры различных форм коллагенового субстрата (молекулярной и фибриллярной форм) на адгезию, пролиферацию и рост культивируемых фибробластов и кератиноцитов. В качестве объектов исследования выбраны первичные культуры клеток, выделенных из кусочков кожи человека после пластических операций. Были приготовлены различные коллагеновые субстраты в молекулярной и фибриллярной формах. Подложкой для нанесения и закрепления служил биodeградируемый полимер — полилактид. Для анализа влияния различных форм коллагеновых субстратов на исследуемые клетки в культуре была проведена окраска актинового цитоскелета фибробластов и кератиноцитов с помощью трис-фаллоидина. Кроме того, приводилось прижизненное наблюдение через микроскоп за формированием монослоя кератиноцитов в культуре. Было показано, что способ нанесения коллагенового покрытия на подложку и его форма влияют на организацию актинового цитоскелета фибробластов и формирование монослоя кератиноцитов. После окраски актинового цитоскелета фибробластов оказалось, что на фибриллярном коллагене клетки менее распластаны по сравнению с фибробластами на молекулярном коллагене и образуют определенные упорядоченные структуры в виде цепочек. Для формирования монослоя кератиноцитов в культуре оптимальным является фибриллярный коллаген.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ НА ИНДУКЦИЮ ПРОГРАММЫ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ В НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ГРЫЗУНОВ. © Ж. В. Шитикова, Н. Д. Аксенов, Т. В. Поспелова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Исследована способность негативных регуляторов пролиферации — ингибиторов MEK1/ERK-киназного каскада PD 98059, ингибитора PI3-киназного каскада LY 294002 и ингибитора гистоновых деацетилаз бутирата натрия — индуцировать программу ускоренного старения в нормальных фибробластах крысы REF, тран-

сформантах E1A + Ha-Ras с высокой проапоптотической чувствительностью и трансформантах E1A + E1B, устойчивых к апоптозу после действия ДНК-повреждающих агентов. Старение оценивали по появлению необратимых блоков клеточного цикла и экспрессии маркера старения SA- $\beta$ Gal-активности. Одновременно исследовали корреляцию между их появлением и изменениями актинового цитоскелета, функциональное значение которых оценивали по способности клеток мигрировать из монослоя в рану. Показано, что в нормальных фибробластах REF ингибиторы MEK1-киназного каскада PD 98059, PI3-киназного каскада LY 294002 и бутират натрия не способны вызывать необратимый блок клеточного цикла. Подавление PI3-киназного каскада вызывает необратимый G<sub>1</sub>/S-блок клеточного цикла в устойчивых к апоптозу клетках E1A + E1B, тогда как трансформанты E1A + Ha-Ras гибнут апоптозом. Только ингибитор гистоновых деацетилаз бутират натрия способен индуцировать необратимый блок G<sub>1</sub>/S клеточного цикла, как в чувствительных E1A + Ha-Ras-, так и в устойчивых к апоптозу E1A + E1B-трансформантах. Однако для появления блока в устойчивых клетках требуются более высокие концентрации бутирата натрия и более длительные сроки воздействия, чем для клеток линии E1A + Ha-Ras. Как необратимые блоки G<sub>1</sub>/S, возникающие при действии LY 294002 и бутирата натрия на трансформанты, так и обратимые блоки, возникающие в нормальных клетках REF, сопровождаются экспрессией маркера старения SA- $\beta$ Gal. Это говорит об ограниченной возможности его применения для оценки программы ускоренного старения. Согласно нашим данным, для этой цели более адекватно использовать критерий необратимости блока клеточного цикла после удаления ингибиторов из среды культивирования. Появление необратимого блока клеточного цикла при действии бутирата натрия и LY 294002 совпадает с перестройкой актинового цитоскелета в трансформантах E1A + Ha-Ras и E1A + E1B. В нормальных фибробластах, у которых вызывать необратимые блоки не удается, существенных изменений в реорганизации цитоскелета не происходит. Анализ способности клеток к миграции в рану из монослоя как функционального маркера изменений актинового цитоскелета показал, что нормальные клетки REF прекращают миграцию при действии ингибитора LY 294002 независимо от отсутствия перестроек цитоскелета, однако бутират натрия не влияет на их подвижность. Трансформанты E1A + E1B прекращают миграцию после действия бутирата натрия, а также после действия LY 294002. Наиболее неожиданным оказалось отсутствие эффекта бутирата натрия на подвижность трансформантов E1A + Ha-Ras, пролиферацию которых он необратимо блокирует. Таким образом, в устойчивых к апоптозу трансформантах E1A + E1B, пролиферация которых не подавляется при действии ДНК-повреждающих агентов, можно необратимо блокировать прохождение клеток по циклу при подавлении активности PI3-каскада или при обработке клеток ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия. Полученные данные могут представлять существенный интерес в связи с тем, что действие этих агентов на нормальные клетки обратимо.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТИМУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ПЕПТИДНЫХ ГОРМОНОВ НА АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В КУЛЬТУРЕ ИН-

ФУЗОРИЙ *DILEPTUS ANSER*. © А. О. Шпаков,<sup>1</sup> Л. А. Кузнецова,<sup>1</sup> С. А. Плещева,<sup>1</sup> З. И. Успенская,<sup>2</sup> К. В. Деркач,<sup>1</sup> М. Н. Перцева.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, alex\_shpakov@list.ru, и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Нами впервые обнаружено, что пептидные гормоны релаксин, соматостатин, окситоцин и аргинин-вазопрессин дозозависимо стимулируют активность аденилатциклазы (АЦ) и ГТФ-связывание в культуре инфузорий *Dileptus anser*. При этом эффективность стимулирующего влияния гормонов и диапазон концентраций, в которых они оказывают максимальный эффект, сильно различаются. Показано, что влияние пептидных гормонов на активность АЦ и ГТФ-связывание в гомогенате культуры инфузорий выражено в значительно большей степени, чем во фракции частично очищенных мембран. Наиболее эффективными были релаксин и соматостатин. Их максимальный стимулирующий АЦ-эффект, который наблюдался в случае релаксина (в концентрации  $10^{-8}$  М) и в случае соматостатина (в концентрации  $10^{-6}$  М), составлял в гомогенате 91 и 122 %, во фракции мембран — 35 и 59 % соответственно. Стимулирующие эффекты релаксина ( $10^{-8}$  М) и соматостатина ( $10^{-6}$  М) на ГТФ-связывание также были отчетливо выражены и составляли в гомогенате 77 и 150 %, во фракции мембран — 31 и 39 % соответственно. Окситоцин и аргинин-вазопрессин были менее эффективны и заметно стимулировали активность АЦ и ГТФ-связывание только в гомогенате. Их стимулирующий АЦ-эффект выявлялся только в концентрации  $10^{-7}$  М и не превышал 50 %. Стимулирующее влияние всех гормонов на активность АЦ и ГТФ-связывание как в гомогенате, так и в мембранах в значительной степени подавлялось в присутствии сурамина, селективного ингибитора гетеротримерных G-белков. Для идентификации типа гетеротримерных G-белков, участвующих в регуляторном действии пептидных гормонов, были применены пептидная стратегия и АДФ-рибозилирование G-белков с помощью бактериальных токсинов. С-концевые пептиды  $\alpha_s$ - (385—394) и  $\alpha_{i2}$ -субъединиц (346—355) G-белков млекопитающих, селективно блокирующих сигнальные пути, в которых участвуют G<sub>s</sub>- и G<sub>i</sub>-белки, не оказывали заметного влияния на стимулирующие активность АЦ и ГТФ-связывание эффекты гормонов. АДФ-рибозилирование фракций мембран инфузорий холерным токсином лишь незначительно повышало в них базальную активность АЦ в отличие от позвоночных животных, у которых такая обработка приводит к многократному повышению активности фермента. В то же время обработка холерным токсином отчетливо блокировала стимулирующие эффекты пептидных гормонов на активность АЦ и ГТФ-связывание, что может указывать на участие G<sub>s</sub>-подобного белка в регулируемом пептидными гормонами АЦ-сигнальном каскаде в клетках инфузорий. Обработка коклюшным токсином, блокирующим G<sub>i</sub>-белки, не влияла как на базальную, так и на стимулированную гормонами активность АЦ и ГТФ-связывающую активность G-белков. Активность АЦ и ГТФ-связывание были нечувствительны к токсинам из яда насекомых — мастопарану и мелиттину, мишенями которых в основном также являются G<sub>i</sub>-белки. Полученные данные указывают на то, что влияние пептидных гормонов на функциональную активность АЦ инфузорий осуществляется через гетеротримерные G-белки, структурно близкие G<sub>s</sub>-белкам позвоночных, но отлича-

ющиеся от них своим С-концевым участком. В то же время G<sub>i</sub>-подобные белки у инфузорий либо отсутствуют, либо имеют значительные структурные отличия от соответствующих им G<sub>i</sub>-белков позвоночных, вследствие чего их участие в передаче гормональных сигналов, генерируемых пептидными гормонами, представляется маловероятным.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48809).

РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА БАЗАЛЬНУЮ И СТИМУЛИРОВАННУЮ ГОРМОНАМИ АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ ИНFUЗОРИИ *DILEPTUS ANSER*. © А. О. Шпаков,<sup>1</sup> З. И. Успенская,<sup>2</sup> К. В. Деркач,<sup>1</sup> Л. А. Кузнецова,<sup>1</sup> С. А. Плещева,<sup>1</sup> М. Н. Перцева.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, alex\_shpakov@list.ru, и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Ранее нами в клеточной культуре инфузории *Dileptus anser* была впервые выявлена и охарактеризована аденилатциклазная сигнальная система (АЦ-система) и показано, что гуаниновые нуклеотиды и фторид натрия, негормональные активаторы аденилатциклазы (АЦ), а также гормоны высших позвоночных животных (биогенные амины, пептидные гормоны) влияют на функциональную активность компонентов этой системы. В настоящем исследовании изучена чувствительность АЦ инфузории к присутствию катионов кальция и обнаружено, что Ca<sup>2+</sup> в концентрации 0.5—10.0 мкМ отчетливо стимулирует активность фермента во фракции частично очищенных мембран *D. anser*. Увеличение концентрации катионов кальция до 100 мкМ и выше приводит к полному блокированию стимулирующего эффекта Ca<sup>2+</sup>. В мембранах, обработанных EGTA, активность фермента сильно снижена, но в значительной степени восстанавливается при добавлении Ca<sup>2+</sup>. Антагонисты кальмодулина хлорпромазин, W-7 и W-5 дозозависимо снижают активность фермента, стимулированную 5 мкМ Ca<sup>2+</sup>, со значениями IC<sub>50</sub> 35, 137 и 174 мкМ соответственно. Стимулирующие АЦ-эффекты биогенных аминов (серотонина и октопамина) полностью сохраняются в присутствии 2.5 и 100.0 мкМ Ca<sup>2+</sup>, в то время как эффекты пептидного гормона релаксина и ЭФР слабо меняются в присутствии 2.5 мкМ катионов кальция, но в значительной степени ингибируются 100 мкМ Ca<sup>2+</sup>. В мембранах, обработанных EGTA, АЦ-эффекты биогенных аминов ослабевают, а эффекты релаксина и ЭФР не выявляются. При добавлении Ca<sup>2+</sup> АЦ-эффекты биогенных аминов полностью восстанавливаются, в то время как эффекты релаксина и ЭФР не выявляются или восстанавливаются в незначительной степени. Антагонисты кальмодулина у инфузории слабо влияют на АЦ-эффекты релаксина и ЭФР в концентрациях, эффективных в случае АЦ позвоночных животных, но заметно снижают их в более высоких концентрациях. Эффекты биогенных аминов на АЦ практически не меняются даже при высоких концентрациях антагонистов. Полученные данные свидетельствуют о том, что мишенями действия пептидных гормонов в клеточной культуре инфузории *D. anser* являются формы АЦ, активность которых зависит от катионов кальция и, возможно, регулируется Ca<sup>2+</sup>/кальмодулином, в то

время как мишенями действия биогенных аминов являются кальцийнезависимые формы фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48809).

**ПРОЦЕСС ПЛАВЛЕНИЯ КРИОГЕННОЙ ШУГИ В УСЛОВИЯХ ПОВЕРХНОСТНОГО ТЕПЛОПОВОДА.** © Н. А. Шубин. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В настоящее время использование веществ в шугообразном состоянии в различных областях науки и техники весьма перспективно. Шугообразное вещество представляет собой смесь жидкости с мелкодисперсными кристаллами льда, однородными по составу и стабильными во времени. Достаточно широкое распространение в криогенной технике получает хранение в виде шуги низкотемпературных жидкостей. При решении ряда задач использование атмосферных газов в шугообразном виде имеет ряд преимуществ. Известно, что скорость разложения термолабильных жидкостей значительно уменьшается с понижением температуры, в результате чего в замкнутом объеме замедляется нарастание давления. Кроме того, шуга обладает большой способностью теплопоглощения, высокой плотностью и другими свойствами, позволяющими значительно улучшить рабочие характеристики рабочих систем. Известно, что шугообразный азот применяется в криобиологии в качестве хладагента при низкотемпературной консервации биоматериала. Однако в процессе хранения веществ происходят плавление твердой фазы и нагрев жидкости. В связи с этим важно знать изменение во времени параметров шуга-расплавления системы жидкость—пары и газ свободного объема. Кстати, при этом возникает вопрос создания надежной и экономичной теплоизоляции систем хранения. Это может позволить оценить изменения, происходящие в емкости с исследуемой теплоизоляцией за определенный интервал времени и делать выводы об эффективности изоляции в тех или иных внешних условиях. Исследования показали, что при наличии поверхностного теплопритока к емкости с криогенной шугообразной смесью жидкость расплава и шуга автономно поглощают тепло, поступающее к ним от стенок: тепло, поступающее в жидкость, идет на ее разогрев от температуры плавления, а тепло, подводимое к шуге, идет на плавление твердой фазы. Поэтому можно утверждать, что в процессе плавления шуги между жидкостью и твердой фазой теплообмен не осуществляется. В данном процессе твердая фаза генерирует жидкость, находящуюся при температуре плавления, на границу раздела «расплав—шуга». Эта жидкость обладает большей плотностью (за счет более низкой температуры) в сравнении с плотностью основной массы расплава. При плавлении шуги над поверхностью твердой фазы образуется скользящая граница раздела фаз «шуга—жидкость», экранируемая постоянно образующимся буферным слоем расплава, находящегося при температуре тройной точки. Таким образом, тепло от расплава поглощается буферной жидкостью, не участвуя в расплавлении твердой фазы. Следует отметить, что за счет Архимедовых сил наиболее нагретые слои жидкости поднимаются вверх, а в нижней части температура жидкости незначительно

выше температуры тройной точки. На основании экспериментов выяснено, что в случае большого значения градиента температур на стенке емкости жидкости распределение температуры по высоте в жидкости, как правило, линейное. В итоге в течение всего времени плавления шуги температура буферного слоя практически равна температуре плавления, а именно тепло жидкости стремится «догнать» и расплавить твердую фазу, а твердая фаза «убегает» (проседает), генерируя буферную жидкость. Анализируя полученные результаты, можно утверждать, что шуга имеет постоянную температуру, ее плотность несколько больше плотности жидкой фазы, а коэффициент теплоотдачи к жидкости (или шуге) от стенки емкости и от газа к стенке постоянен.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-48251).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДВИЖНОСТИ НОРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ. РОЛЬ АКТИН-МИОЗИНОВОГО СОКРАЩЕНИЯ.** © М. С. Шутова, А. Ю. Александрова. НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра РАМН, Москва.

Ведущую роль в процессах движения клеток играют перестройки актинового цитоскелета на их активном крае. Активный край клеток состоит из двух структурно и функционально различных зон: узкой краевой ламеллоподии, где идет полимеризация актиновой сети, и более широкой ламеллы, содержащей актин-миозиновые пучки, где происходят дальнейшая перестройка актина с участием миозинзависимой сократимости и формирования зрелых фокальных контактов. Задачей настоящей работы являлось выяснение роли каждого из процессов — полимеризации актина и актин-миозиновых взаимодействий — в движении фибробластов в культуре (линия REF52). Были рассмотрены такие характеристики подвижности, как распластывание клеток на плоском адгезивном субстрате и миграция клеток в экспериментальную рану. Для подавления миозин II-зависимой сократимости были использованы ингибиторы Y27632 (ингибитор активирующей миозин Rho-киназы) и блебистатин (ингибитор АТФазной активности миозина). Полимеризация актина на краю клетки подавлялась низкими дозами латрункулина А (0.5—1.0 мкМ). Обработка клеток ингибиторами сократимости приводила к полному исчезновению актин-миозиновых пучков и зрелых фокальных контактов. У клеток сохранялись лишь точечные инициальные фокальные комплексы по периметру. Активность края таких клеток усиливалась, активный край расширялся. При длительном культивировании фибробластов с Y27632 или блебистатином наблюдалось образование так называемых хвостов, которые клетки оставляли за собой, будучи неспособными к ретракции. Распластывание в присутствии Y27632 и блебистатина происходило значительно быстрее, чем в контроле. Однако конечная площадь клеток достоверно не отличалась от контроля. Скорость и эффективность миграции в рану также значительно увеличивались по сравнению с контролем — выползало большее количество клеток (в 1.2—1.4 раза), дальность их миграции увеличивалась в 1.5 раза. Обработка низкими дозами латрункулина А приводила к исчезновению тонкой актиновой

сети на краю клетки, соответствующей ламеллиподии (иммунофлуоресцентная окраска). При этом сохранялись мощные стресс-фибриллы со встроенным миозином и крупные фокальные контакты. Уже при малых дозах латрункулина существенно нарушался процесс распластывания клеток и их конечная площадь снижалась примерно в 3.5 раза по сравнению с контролем. Такие клетки демонстрировали дозозависимое снижение миграционной способности вплоть до полной остановки движения (при концентрации латрункулина 4 мкМ). Таким образом, при подавлении активности миозина II локомоторная активность фибробластов в культуре не только не снижалась, а, наоборот, усиливалась. Подавление полимеризации актина приводило к существенному угнетению клеточной подвижности как в случае распластывания, так и при направленной миграции. Мы предполагаем, что наиболее существенным фактором для клеточного движения является именно полимеризация актина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48146а).

**ТЕМПЕРАТУРНО-РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСТОЯННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ТКАНЕЙ СИБИРСКОГО ОСЕТРА.** © Т. И. Щелкунова, Ю. П. Колбасова, И. С. Щелкунов. Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства, vniph@mail.ru.

Ускоренными темпами прирастают в последнее время объемы выращивания осетровых рыб в аквакультуре с целью восстановления их природных популяций, а также производства деликатесной пищевой продукции. Одной из главных проблем, тормозящих развитие осетроводства в мире, являются вирусные болезни. Поэтому важность исследований по получению клеточных линий осетровых рыб — ключевого элемента вирусологической диагностики — не вызывает сомнения. Из 21 известной на сегодня постоянной линии клеток осетровых 5 (из тканей сеголетков сибирского осетра *Acipenser baeri*) получено в нашей лаборатории. Это монослойные клеточные линии из пула почки, печени и селезенки (Siberian sturgeon organs: SSO-1, SSO-2 и SSO-3) и плавников рыб (Siberian sturgeon fins: SSF-1 и SSF-2) (Щелкунова и др., 1997; Колбасова и др., 2006). Ростовая среда для культивирования указанных линий клеток состоит из среды Игла-MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (SSO-1, SSO-3 и SSF-1) или среды 199 с 5—10 % сыворотки эмбриона коровы (SSO-2 и SSF-2). Поскольку рыбы — это пойкилотермные организмы, определение температурных параметров роста получаемых от них линий клеток является важным аспектом описания последних. Эффективность роста культур клеток сибирского осетра при температурах 10, 15, 20, 25 и 30 °C оценивали на 155—206-м пассажах *in vitro*. Клетки выращивали в культуральных пробирках, в которые вносили по 1 мл клеточной суспензии. Посевная концентрация составляла 159—355 тыс. клеток в 1 мл ростовой среды. Для подсчета клетки снимали смесью 0.25%-ного раствора трипсина и 0.02%-ного раствора версена и объединяли суспензию клеток из трех пробирок для каждого срока культивирования. Подсчет жизнеспособных клеток вели

в камере Горяева через 0, 1, 4, 7, 10, 14 и 20 сут после посева, определяя их концентрацию по известной формуле (Животная клетка..., 2000). Хотя динамика содержания жизнеспособных клеток в культуре при разных температурах инкубации была несколько схожей для двух пар клеточных линий (SSF-1—SSF-2 и SSO-2—SSO-3), каждая из линий обладала уникальной температурно-ростовой характеристикой. Наивысшую пролиферативную активность показала линия SSF-1, достигнувшая наиболее высоких значений концентрации живых клеток при всех испытанных температурах. Клеточная линия SSO-2 выделялась самым низким пролиферативным потенциалом, уступая другим линиям в урожае клеток в 1.5—3.0 раза, несмотря на то что прирост клеток у нее, как и у линии SSF-1, наблюдали во всем диапазоне температур. При 15—25 °C кривые роста культуры демонстрировали тенденцию выхода на плато, что позволяет предположить наличие у данной линии ярко выраженного феномена контактного торможения деления клеток. Прирост клеток во всем температурном диапазоне был отмечен и у линии SSO-3, тогда как у линий SSO-1 и SSF-2 или 10 и 30 °C наблюдали лишь переживание клеток. Хотя образование клеточного монослоя происходило при всех испытанных температурах, при 30 °C достаточно быстро начиналась его дегенерация, выражавшаяся в округлении клеток и отделении их от стекла. Практически прекращающийся рост клеток за весь период наблюдения был отмечен для всех культур при 15 °C, тогда как при дальнейшем повышении температуры разные линии вели себя по-разному. При 20 °C активно продолжали расти клетки линий SSO-1, SSF-1 и SSF-2, в то время как клетки SSO-2 выходили на плато, а монослой линии SSO-3 на протяжении второй половины срока наблюдения претерпевал сильную дегенерацию. При 25 °C к концу срока наблюдения прирост клеток отмечали только в культуре SSO-1, культура SSO-2 находилась на плато, тогда как клетки трех остальных линий начинали быстро дегенерировать. Если считать оптимальной для роста культуры такую температуру, при которой наибольшее количество живых клеток сохраняется наиболее продолжительное время, то такая температура была: 20 °C для SSO-1, SSF-1 и SSF-2, 25 °C для клеток SSO-2 и 15—20 °C для клеток SSO-3. Толерантность клеточных линий сибирского осетра к пониженным температурам позволяет после образования монослоя значительное время (месяцами) сохранять их без смены среды при 10—15 °C.

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ВИРУСАМ РЫБ ПОСТОЯННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ТКАНЕЙ СИБИРСКОГО ОСЕТРА.** © Т. И. Щелкунова, Ю. П. Колбасова, И. С. Щелкунов. Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства, vniph@mail.ru.

Выращивание осетровых рыб в аквакультуре в нашей стране практикуется на протяжении нескольких десятков лет. Основной целью при этом было восстановление природных запасов осетровых. Для этого отлавливали диких производителей, инкубировали искусственно оплодотворенную икру на специализированных рыбодоводных заводах и подращенную молодь выпускали в естественные водоемы. В последнее время в связи с резким сокращением численности популяций осетровых и ощу-

тимым недостатком диких производителей все большее число предприятий переходит на полносистемную технологию работы, при которой на рыбзаводе содержат собственное ремонтно-маточное стадо рыб. Снятие запрета на вывоз осетровых рыб за рубеж привело к бурной активизации международной торговли наиболее ценными видами отечественных осетровых, а рост цен на пищевую продукцию из них стимулировал товарное выращивание осетровых во всем мире. Интенсификация осетроводства сопровождается появлением болезней, из которых наибольший ущерб наносят вирусные. На сегодня в мире у осетровых рыб выявлено около 10 вирусов, 5 из которых вызывают опасные заболевания. Помимо «собственных» вирусов осетровые могут являться носителями вирусов других видов рыб (Щелкунов, 2000). За рубежом для вирусологических исследований осетровых рыб используют несколько линий клеток, полученных главным образом от американского белого осетра. В нашей стране подобные работы носили эпизодический характер, и появление отечественных линий клеток осетровых рыб будет способствовать расширению таких исследований. Чувствительность полученных в нашей лаборатории 5 линий клеток из органов (SSO-1, SSO-2 и SSO-3) и плавников (SSF-1 и SSF-2) сибирского осетра определяли к 8 широко распространенным вирусам рыб: рабдовирусам инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых (IHNV), вирусной геморрагической септицемии (VHSV), весенней виiremии карпа (SVCV), вирусу европейского угря *Rhabdovirus anguilla*, рабдовирусу мальков щуки (PFRV), вирусу европейской озерной кумжи (ELTV), бирнавирису инфекционного некроза поджелудочной железы (IHNV) и иридовирусу карпа (CCIV). Определение вели по двум критериям: 1) собственно чувствительность определяли параллельным титрованием на всех 5 клеточных линиях суспензии патологического материала от зараженных вирусом рыб или культурального вируса, накопленного на референсной клеточной линии; 2) способность культуры клеток поддерживать репродукцию вируса определяли титрованием на ней культурального вируса, прошедшего на ней не менее 3 последовательных пассажей. Клеточные линии сибирского осетра оказались чувствительными только к рабдовирусам рыб. При этом органные линии клеток были чувствительны ко всем рабдовирусам, а плавниковые — только к 5 (не чувствительны к IHNV). В целом осетровые линии клеток уступали референсным клеточным линиям как по чувствительности обнаружения вирусов в клиническом материале от рыб, так и по их урожаю в культуре клеток. Наилучшие результаты клетки осетровых показали при работе с антигенно родственными между собой вирусами SVCV и PFRV. Регистрируемые при этом титры вирусов приближались к таковым для референсных линий клеток, а нередко и превосходили их. В качестве интегрального показателя для количественного сравнения клеточных линий было взято суммарное значение логарифмов вирусных титров, рассчитанное для каждой линии клеток по каждому из двух вышеназванных критериев. Полученные значения позволили установить, что клеточные линии из органов сибирского осетра были весьма схожи между собой, тогда как плавниковые линии клеток несколько уступали им по данному показателю. В то же время «вирусные профили» всех осетровых линий клеток были в значительной степени индивидуальными. Интересной особенностью клеточных линий SSF-1 и SSF-2 был тот факт, что первая

из них была чувствительна к вирусу VHSV при его выделении от рыб, однако в ходе пассирования цитопатический эффект вируса утрачивался. Вторая линия клеток вела себя прямо противоположным образом.

МИТОТИЧЕСКАЯ КАТАСТРОФА, ЭНДОПОЛИПЛОИДИЯ И АКТИВНОСТЬ КИНАЗЫ АВРОРЫ В ОБЛУЧЕННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ. © Е. А. Эренпрейса,<sup>1</sup> Г. Плакхин,<sup>1</sup> С. Р. Уитли.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Латвийский центр биомедицины, Рига и <sup>2</sup> Центр повреждения и стабильности генома Университета Сассекса, Брайтон.

Эндополиплоидия опухолей связана с резистентностью к лечению генотоксическими средствами, однако до недавнего времени эндополиплоиды как резервуар для репродукции опухолей из рассмотрения исключались. Наши наблюдения включают в себя ответ резистентных p53-дефицитных человеческих лимфом и клеток HeLa на облучение в дозе 10 Гр, которое эти клетки выдерживают, возвращаясь к пролиферативному росту. Ранее показано, что ответ характеризуется задержкой в G<sub>2</sub>-фазе, ее адаптацией и последующим блоком в аберрантном митозе, полиплоидизацией (до 32c—64c) и поздней рекомбинационной репарацией эндополиплоидов с последующим обильным апоптозом (Ivanov et al. J. Cell Sci., 2003, 116: 4095—4106). Все вместе представляет собой феномен митотической катастрофы. Выживает лишь часть полиплоидов, и лишь в немногих впоследствии наблюдается деплоидизация с возвращением к диплоидности и митозам (Erenpreisa et al. Cell Biol Int., 2005, 29: 1005—1011). В настоящей работе мы изучали митотический потенциал опухолевых эндополиплоидов, выявляя иммуноцитохимически Аврору В (A-B), ее мишень — фосфорилированный гистон H3, тубулины, ДНК, ламин В и белки кинетохоров. Изучение показало, что в отличие от клеток диплоидного цикла, где A-B появляется на центромерах лишь в коротком окне G<sub>2</sub>-фазы и затем концентрируется на них в профазе и метафазе митоза, в полиплоидизирующихся клетках A-B ассоциируется в умеренно активной форме с центромерами интерфазных хромосом, а также на хромосомах классического эндомитоза. Однако A-B не выявлялась в клетках с положительной реакцией на ранний апоптотический маркер аннексин V. Попытки деплоидизации, происходящие на поздний пострадиационный период, идут в клетках по двум сценариям. 1. A-B сопровождает микротрубочки, проникающие от нескольких ЦОМТ, в инвагинации ядерной оболочки, вызывая фрагментацию гигантского ядра на субъядра. При этом хромосомы почти деконденсированы, A-B на них почти отсутствует, а митотический аппарат представлен полусферами ЦОМТ без центрального веретена. Этот тип ядерной сегрегации напоминает плевромитоз простейших (Raikov. Eur. J. Protistol., 1994, 30: 253—269) и, по-видимому, также происходит в гигантских клетках трофобласта (Zybina, Zybina. Int. Rev. Cytol., 1996, 165: 53—119). 2. В случае попыток мультиполярных митозов образуются более выраженные астральные микротрубочки полюсов веретена, хромосомы более конденсированы, и в той же мере A-B связана с центромерами хромосом и центральным веретеном. Со скачивание A-B с кинетохоров в цитоплазму характерно для блока и би-, и мультиполярного митоза. При успешной деплоидизации между мультиядерной матерью-гигантом и единичной дочерней клеткой наблюда-

лось А-В-позитивное остаточное тельце (mid-body) — свидетель анафазы и цитотомии. Наблюдались также типичные хромосомные пластинки редукционных анафаз. Полученные данные позволяют предположить, что повышенная экспрессия А-В способствует выживанию р53-дефицитных опухолевых эндополиплоидов и поддерживает в них способность к делению и редукции плоидности. Возможно, это связано с рекомбинационной репарацией ДНК, в частности фосфорилированием А-В мейотического когезина Rec8, обнаруженного нами в этих эндополиплоидах ранее (Kalejs et al. *BMC Cancer*, 2006, **9**: 6). Интересно, что А-В участвует как в блоке митотического веретена, так и в завершении деплоидизирующего митоза. Такой дуализм действия и плейотропизм мишеней описаны и для более изученного хромосомного пассажира, тесно связанного с А-В, — survivin (Wheatley, McNeish. *Int. Rev. Cytol.*, 2005, **247**: 35—88).

**МИГРАЦИЯ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА И СИНТЕЗ ИМИ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В ТРЕХМЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЯХ.** © Н. М. Юдинцева, Е. В. Канов, Л. В. Смагина, И. В. Воронкина, М. И. Блинова, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В настоящее время в клинической практике для лечения трофических язв и других дефектов кожи применяется дермальный эквивалент, приготовленный на основе ксеногенного коллагена и культивируемых фибробластов. Однако в редких случаях применение коллагена вызывает аллергическую реакцию. Кроме того, для заживления раны более адекватно использование фибрина плазмы крови пациента, переработанного фибробластами в процессе культивирования в нем коллагена. Возможно, что использование такого клеточного продукта с последующей трансплантацией на рану предотвратит аллергическую реакцию, сократит сроки заживления раны и улучшит качество восстановленной ткани. В проведенном исследовании рассматривали процессы миграции фибробластов и синтеза ими белков внеклеточного матрикса в трехмерных конструкциях, приготовленных на основе коллагенового и фибринового гелей. Были исследованы следующие варианты: 1) гель нанесен поверх слоя фибробластов, культивируемых в чашке Петри; 2) фибробласты посеяны на поверхность геля; 3) суспензия фибробластов инъецирована внутрь геля. В первом варианте эксперимента в течение 1-х сут в глубине фибринового геля появляются фибробласты, образующие звездообразные скопления и тонкие тяжи по всему периметру геля; в глубине коллагенового геля в этом же варианте наблюдается появление только одиночных клеток. Во втором варианте при посеве клеток на поверхность фибринового геля постепенно происходит «концентрирование» фибробластов, и через 3 сут на поверхности геля образуются клеточные тяжи. Фибробласты, посеянные на поверхность коллагенового геля, постепенно мигрируют вглубь и подобных структур не образуют. При инъекции клеток в глубь фибринового геля уже в 1-е сут культивирования наблюдается активная миграция клеток в радиальном направлении по поверхности геля с образованием своеобразных «лучей». В случае инъекции клеток в глубь коллагенового геля клетки мигрируют как по поверхности геля, так и в его глубину.

Мигрирующие клетки теряют свою биполярную ориентацию и приобретают звездообразную морфологию, характерную для фибробластов, культивируемых в дермальном эквиваленте. Во всех указанных вариантах эксперимента фибробласты в фибриновом геле характеризуются выраженной биполярной морфологией по сравнению с фибробластами, культивируемыми в коллагеновом геле. Характерной особенностью миграции фибробластов в фибриновом геле является стремление клеток выйти на поверхность геля, тогда как в коллагеновом геле миграция происходит в глубине геля. При электрофоретическом исследовании состава геля (фибринового и коллагенового), в котором культивировались фибробласты в течение 10 сут, были обнаружены изменения его состава вследствие синтеза клетками элементов внеклеточного матрикса. В составе геля появляется ряд белков, которые отсутствуют в контрольном варианте. Контролем служил гель с введенными внутрь него клетками без последующего культивирования. Полученные данные свидетельствуют об активном синтезе клетками, находящимися внутри геля, белков внеклеточного матрикса и реорганизации ими геля. Кроме того, в фибриновом и коллагеновом гелях было установлено присутствие матриксных металлопротеаз (ММП-2 и ММП-9). Уровень протеаз на 10-е сут значительно возрос, следовательно, увеличивалась активность фибробластов при реорганизации геля. Таким образом, фибробласты, культивируемые в коллагеновом и фибриновом гелях во всех рассмотренных вариантах эксперимента, имеют особенности миграции, обладают различной морфологией и активно реорганизуют гели.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной в рамках Государственного контракта № 02.435.11.3020 «Метод восстановления эпителиально-мезенхимальных дефектов с помощью стволовых клеток» (лот 2005-ЖС-13.1/001).

**СОЗДАНИЕ ПРОБЛЕМНО-ОРИЕНТИРОВАННОЙ БАЗЫ ДАННЫХ ПО ЦИТОГЕНЕТИКЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА.** © Т. К. Яковлева, Н. М. Ярцева, В. И. Турилова, Н. П. Бикташева, А. Г. Бикташев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, tyak@mail.cytspb.rssi.ru.

Выявление закономерностей кариотипической изменчивости опухолевых клеточных линий в зависимости от механизмов дифференцировки и трансформации клеток *in vivo* требует сопоставления и сравнительного анализа разнообразных характеристик культивируемых клеток. Основным подходом к решению этой проблемы является создание проблемно-ориентированной базы данных. Вместе с тем широкое использование клеточных линий в качестве модельных систем также делает необходимым создание информационного ресурса, объединяющего большой объем разрозненной информации о молекулярных, цитогенетических характеристиках клеточных линий, данных об их тканевом происхождении, уровне дифференцировки и пролиферативном статусе клеток и предоставляющего возможность выбрать адекватную задаче исследования модель. Информация о различных характеристиках клеточных линий, особенно цитогенетических, являющихся надежным критерием их аутентичности, позволяет индивидуализировать клеточ-

ные линии, судить об межвидовой и внутривидовой контаминации линий, что определяет ценность такой базы данных для фондов коллекций клеточных культур. Уникальная база данных цитогенетической и молекулярно-биологической информации по нормальным и опухолевым клеточным линиям человека и животных, содержащая более 60 характеристик клеточных линий, была создана С. Е. Мамаевой с коллегами (Геном человека-91. М., 1991, с. 163—164; Abst. 41 st Int. Congr. ETCS. 1994). К сожалению, эта первоначальная версия в настоящее время недоступна в связи с выводом из эксплуатации морально устаревшего оборудования. С целью интеграции постоянно растущего объема качественно новых данных по клеточным линиям при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 02-07-90094) был запущен проект по созданию современного варианта базы данных «Cytogenetics of Human Tumor Cell Lines» (<http://www.htcl.cytspb.rssi.ru>). На данном этапе работы проводится наполнение информационного ресурса оригинальными данными коллектива группы цитогенетики и сведениями из литературных источников. Подбор и включение клеточных линий осуществляются в соответствии с типом опухоли, из материала которой получена линия, механизмами дифференцировки и тканеспецифической трансформации клеток *in vivo*. Размещаемая информация по клеточным линиям систематизирована и разделена на отдельные блоки, содержащие сведения о происхождении линии, ее цитогенетических и молекулярно-генетических характеристиках, дифференцировке и пролиферации клеток, и представлена в виде гипертекстовых документов, таблиц, графических иллюстраций, изображений кариотипов и отдельных хромосом. В настоящее время на сайте Института цитологии РАН представлена систематизированная по ключевым характеристикам информация о клеточных линиях миелогенного происхождения HL-60, Kasumi-1, KG-1, ML-1, RC-2A, SKNO-1, THP-1 (острый миелобластный лейкоз), НМС-1, К-562, RPMI-6410 (хронический миелолейкоз) и U-937 (гистиоцитарная лимфома). Информация по лимфоидным клеточным линиям и линиям, полученным из солидных опухолей, представлена изображениями и описанием модальных кариотипов, полученными сотрудниками группы цитогенетики. Планируется дополнить эти сведения литературными данными. Дальнейшее развитие проекта предполагает разработку на основе созданного информационного ресурса базы данных с информационно-поисковой системой, позволяющей проводить корреляционный анализ биологически значимых ключевых характеристик клеточных линий, направленный на выявление особенностей геномного дисбаланса длительно культивируемых клеток, полученных из опухолей различного гистогенеза. В целом создание такой проблемно-ориентированной базы будет способствовать пониманию вопроса о возможной детерминации характера кариотипической эволюции опухолевых клеток *in vitro* инициирующим онкогенез событием.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КЛЕТОК МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО РЯДА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ.** © В. Н. Ярыгин,<sup>1</sup> Ю. Г. Суздальцева,<sup>1</sup> В. В. Бурунова,<sup>1</sup> И. Б. Чеглаков,<sup>2</sup> Р. В. Холоденко,<sup>1</sup> И. В. Холоденко,<sup>1</sup> А. Ю. Лунатов,<sup>1,2</sup> И. В. Вахрушев,<sup>1</sup> П. А. Каралкин,<sup>1</sup> К. Н. Ярыгин.<sup>1,2</sup> <sup>1</sup> Российский государственный

медицинский университет, [medcellbox@mail.ru](mailto:medcellbox@mail.ru), и <sup>2</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН, Москва.

Клетки мезенхимального ряда различного происхождения широко используются для создания клеточных препаратов и биомедицинских технологий на их основе. Вместе с тем их биология изучена недостаточно, что делает актуальным тщательное исследование их свойств, в том числе фенотипа, способности к дифференцировке и иммуногенности. В этом отношении нами были подробно охарактеризованы адгезивные культуры фибробластов кожи, клеток выделенных из пуповины, и мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга. В работе использовали методы иммуноцитохимии и точной цитофлуориметрии. Некоторые культуры были изучены с использованием высокопроизводительных методов посттранскрипционной геномики. В культуре все перечисленные клетки имеют фибробластоподобную морфологию. Однако анализ экспрессии маркерных белков показал существенные различия между ними. Часть клеток из пуповины экспрессировала нестин. Фибробласты дермального происхождения и МСК костного мозга нестин не экспрессировали. МСК костного мозга не окрашивались также антителами против коллагенов 1-го и 2-го типов, а в культуре клеток фибробластов кожи только единичные клетки синтезировали эти белки. В культуре клеток из пуповины существенно больший процент клеток экспрессировал коллагены 1-го и 2-го типов. Из числа клеток пуповины и костного мозга приблизительно 20 % специфически связывали антитела против маркера эндотелиоцитов — фактор фон Виллибранда. На фибробластах кожи фактор фон Виллибранда не выявлялся. Перечисленные культуры были методом точной цитофлуориметрии исследованы на экспрессию маркеров прогениторных и стволовых клеток — CD13, CD34, CD44, CD45, CD49b, CD54, CD90, CD105, CD106 и CD117. Фибробласты дермального происхождения имели фенотип CD13<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD49b<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>, CD106<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup>. Фибробластоподобные клетки пуповины характеризовались фенотипом CD13low, CD34<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD49b<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106low, CD117<sup>+</sup>. МСК костного мозга имели фенотип CD13low, CD34<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD49b<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD106low, CD117low. Уровень экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости 1-го класса (HLA-ABC, МНС I), важный показатель их иммуногенности при трансплантации, был высоким в культуре фибробластов дермального происхождения и средним в культуре МСК. Клетки из пуповины были в этом отношении неоднородными. В культуре присутствовали мелкие клетки со средним уровнем экспрессии МНС I и крупные распластанные клетки, экспрессирующие эти белки на фоновом уровне. Исследованные нами клетки мезенхимального ряда не экспрессировали белки главного комплекса гистосовместимости 2-го класса (HLA-DR и МНС II). Была исследована способность клеток дифференцироваться в жировую, костную и хрящевую ткани в условиях *in vitro*. Фибробласты кожи могли превращаться только в адипоциты, фибробластоподобные клетки пуповины — в адипоциты, а также в хондробласты (при культивировании в микроассе в присутствии TGF-beta) и остеобластоподобные клетки (после добавления в культуральную среду аскорбиновой кислоты, глицерофосфата кальция и дексаметазона). Эти

остеобластоподобные клетки активно накапливали фосфаты кальция в вакуолях, но не обладали способностью образовывать локусы окостенения. МСК костного мозга легко дифференцировались в адипоциты, хондробласты и остеобласты, образующие в культуре многочисленные очаги окостенения. Исследование фибробластов из кожи, клеток из пуповины и МСК методами транскриптомики (микроэреи фирмы Agilent) и протеомики (2D PAGE-MALDI-TOF и LC-MS-MS) позволили значительно полнее охарактеризовать профили генетической экспрессии в этих клетках и обнаружить сходства и различия в спектрах синтезируемых ими мРНК и белков.

STEM CELLS IN TREATMENTS OF NEUROGENERATIVE DISEASES AND SEVERE BURN TRAUMA. © I. I. Katkov,<sup>1,2</sup> Y. V. Gladkikh,<sup>3</sup> A. V. Yelskaya,<sup>4</sup> G. S. Lobyntseva,<sup>3</sup> L. L. Lukash,<sup>3</sup> V. A. Kozinec,<sup>5</sup> Yu. P. Rubizov,<sup>3</sup> O. N. Kovalenko,<sup>6</sup> D. V. Lobyntsev,<sup>3</sup> V. Yu. Gladkikh,<sup>3</sup> P. K. Sidorenko,<sup>7</sup> C. Cao.<sup>7</sup> <sup>1</sup> Stem Cell Therapy International (SCTI), San Diego, California, USA, provincell@hotmail.com, <sup>2</sup> Stem Cell Center, Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, California, USA, <sup>3</sup> SCTI, Kiev, <sup>4</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics, Kiev, <sup>5</sup> The 2<sup>nd</sup> Clinical Hospital of Dneprovskiy District, Kiev, <sup>6</sup> Schupikov Academy of Postgraduate Medical Education, Kiev, <sup>7</sup> SCTI, Tampa, Florida, USA.

Stem cell (SC) transplantation is a surgical procedure that has been used successfully for 70 years as a treatment of many diseases for which modern medicine has had no therapy, or in which «state-of-art» therapies stopped being effective. A documented 5 millions of patients have been so treated worldwide to-date, evidenced by over 120 000 publications in MEDLINE (see: www.nlm.nih.gov) amongst others. SC therapy is approved for use by the German authorities and the EU. This presentation highlights the recent achievements of the Stem Cell Therapy International, Inc. (www.scticorp.com) in application of a set of different types of stem cells such as embryonic epithelial cells, fetal hematopoietic SC and others for treatment of a variety of both acute and chronic disease such as multiple sclerosis, stroke, and burn trauma.

Source of support: Burnham Stem Cell Center, Ja Jolla, California, USA.

CRYOSENSITIVITY OF HUMAN STEM CELLS OF DIFFERENT ORIGIN. © I. I. Katkov,<sup>1,3</sup> N. S. Karpova,<sup>2</sup> M. S. Kim,<sup>3</sup> F. Levine,<sup>1,3</sup> A. V. Terskikh,<sup>3</sup> J. F. Loring,<sup>3</sup> E. Y. Snyder.<sup>3</sup> <sup>1</sup> UCSD Cancer Center, San Diego, California, USA, provincell@hotmail.com, <sup>2</sup> Institute of Hematology and Blood Transfusion, St. Petersburg, <sup>3</sup> Stem Cell Center, Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, California, USA.

Long term stabilization of stem cells (SCs) is one of the key elements of effective functioning of SC banks and core facilities, and for therapeutic and pharmaceutical applications of SCs in general. When cells are maintained in a liquid milieu, they undergo aging-related processes that cause progressive loss of viability. To prevent such degradation, cells need to be placed in conditions that essentially stop all chemical reactions for the duration of time of storage. Cryopreservation at extremely low temperatures has proven to be so

far the only way of stable long-term storage of animal cells. Conventionally used methods of cryopreservation include slow freezing with the use of special cryoprotective agents (CPAs). One of the most widely used CPA for freezing cultured cells, including majority of stem cells (SCs), is dimethylsulfoxide (DMSO) in concentrations 10–20 % v/v. While slow freezing with DMSO provides satisfactory results for many types of robust, highly proliferative cell types such as HeLa and 293 lines, when such protocols are applied for cryopreservation of SCs a variety of problems emerge. The problems are not necessarily obvious; SCs can look perfectly healthy by crude cell viability assays such as Trypan Blue or PI staining. But frozen and thawed SCs often suffer from changes in the key functions, such as loss of proliferative potential, clonogenic capacity, and homing ability of blood marrow (BM) and cord blood (CB) cells, and pluripotency of human embryonic stem cells (hESC). These effects may have an impact on the value of SC banks and effective therapeutic applications of SCs in regenerative medicine, or for pharmaceutical drug screening. For example, SC content in CB, which determines whether the sample should be cryopreserved for a client (private clientele CB bank) or for a potential recipient (donor CB bank). This calculation generally assumes that 50 % of cells will survive after freezing, which may not always be the case. If even a 20 % improvement in cell survival and cell functionality could be achieved, it would add a high therapeutic value for these cells. For hESCs there is a growing body of evidence that the conventional slow freezing protocol and use of DMSO have deleterious effects both on the cell survival and on pluripotency. Our data show that after standard freezing only 10 % of the cell population maintain expression of *Oct-4*, a transcriptional factor that is closely associated with pluripotency. We see that it requires 2–3 weeks for hESC to recover to the pre-freezing level. From the other hand, during the freezing-thawing cycle non-embryonic stem cells, and particularly hematopoietic SCs derived from cord blood or bone marrow, can suffer the loss of some features that are overly important for proper functioning. For example, cryopreservation and associated procedures can adversely affect the cell proliferation (culturing test), and/or its homing ability after transplantation. At the same time, more intricate molecular mechanisms that lead to senescence and apoptosis, such as telomere shortening (please, see presentation by Karpova and Abdulkadyrov in this Meeting), can be triggered as well. In this presentation, we review the current state of the art in preservation of human SCs (including publications in Russian) and suggest improvements that are critical to the successful establishment of therapeutically valuable SC Banks and scientifically important SC Center core facilities.

Source of support: Burnham Stem Cell Center, Ja Jolla, California, USA.

PI3-KINASE SIGNALLING PATHWAY NEGATIVELY REGULATES THE EXPRESSION OF P21 WAF1/CIP1 IN MYELOID LEUKEMIA CELLS DRIVEN TO MONOCYTIC DIFFERENTIATION BY PMA. © G. Treigyte,<sup>1</sup> J. Savickiene,<sup>1</sup> A. Pivoriunas,<sup>2</sup> K.-E. Magnusson,<sup>3</sup> R. Navakauskene.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Department of Developmental Biology, Institute of Biochemistry, Mokslininku 12, LT-08662 Vilnius, Lithuania, savickiene@bchi.lt, <sup>2</sup> Department of Experimental Research, Institute of Experimental and Clinical Medicine, Zygimantu 9, LT-01102 Vilnius, Lithuania, <sup>3</sup> Division of Medical

Microbiology, Department of Clinical and Molecular Medicine, SE-583 53 Linköping, Sweden.

Phosphoinositide-3 kinase (PI3-K) participates in a wide range of cellular processes, such as proliferation, differentiation and apoptosis. In many cancer cells, PI3-K signalling pathway is directly involved in a positive regulation of CDK inhibitor p21 WAF1/Cip1, which is important for the G<sub>1</sub>/S transition. In this study, we have shown that inhibition of PI3-K by 2 h-pretreatment with the specific inhibitor LY294002 significantly (about 50 folds) increased p21 WAF1/Cip 1 protein expression in PMA-treated myeloid leukemia cells. This occurred during 2—6 h of treatment of NB4 (p53-positive) and THP-1 (p53-negative) cells driven to monocytic differentiation by PMA by p53-independent mechanism. This was confirmed using pifithrin- $\alpha$  (PFT), an inhibitor of p53 transcriptional activity, which did not influence on p21 expression level nor change protein expression profile. Furthermore, PFT induced apoptosis, but differently influenced leukemia cell viability, protecting only p53-positive leukemia cells from induced death. PI3-K inhibition by LY294002 increased transcription factor Sp1 binding to PMA-responsive sites on the p21 WAF1/Cip 1 promoter. The up-regulation of p21 protein expression correlated with the activation of targets of PI3-K signalling pathway, such as ERK2, PKC $\xi$ , and Sp 1. LY294002 did not induce p21 protein expression in NB4 cells driven to granulocytic differentiation by retinoic acid or to growth arrest by a histone deacetylase inhibitor, phenyl butyrate (PhB). The pretreatment with rapamycin, an inhibitor of mTOR kinase, a member of PI3-K PKB/ mTOR/ p70S6K pathway, resulted in the suppression of p21 WAF1/Cip 1 expression in PMA-stimulated NB4 cells. To conclude, this study provides an evidence for negative regulation of p21 WAF1/Cip 1 expression by PI3-K signalling pathway in leukemia cells induced to differentiate toward monocytes.

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ НЕЙРАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В КУЛЬТУРЕ.** © *Е. Ю. Плотников*,<sup>1,2</sup> *М. В. Марей*,<sup>1</sup> *О. В. Подгорный*,<sup>3</sup> *М. А. Александрова*,<sup>3</sup> *Д. Б. Зоров*,<sup>2</sup> *Г. Т. Сухих*<sup>1</sup>. <sup>1</sup> Научный центр акушерства и гинекологии РАМН, Москва, <sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова, и <sup>3</sup> Институт биологии развития РАН, Москва.

Интерес к биологии нейральных прогениторных клеток связан прежде всего с перспективами использования этих клеток для нужд медицинской биотехнологии. При лечении нейродегенеративных заболеваний, воспали-

тельных повреждений центральной нервной системы, травм спинного и головного мозга трансплантация нейральных стволовых/прогениторных клеток представляется наиболее перспективным направлением. В большинстве подобных исследований практически не рассматривается функциональная активность стволовых клеток, в частности их энергетический статус. Состояние митохондрий в культивируемых нейросферах может явиться критерием оптимизации условий культивирования и выделения популяции нейральных стволовых клеток, обладающих высокой пролиферативной активностью и потенциалом дифференцировки. Цель настоящего исследования — определение состояния митохондриального аппарата в культивируемых нейральных стволовых/прогениторных клетках, выделенных из фетального головного мозга, и характеристика энергизации митохондрий клеток на разных этапах культивирования. Выявлена неравномерная энергизация митохондрий в клетках нейросфер. Неоднородность клеток в нейросфере по величине митохондриального потенциала усиливалась при увеличении размеров нейросфер по мере культивирования без механической диссоциации. В центральной части крупных сфер клетки имели более низкий митохондриальный потенциал, что предположительно связано с недостаточной диффузией кислорода и питательных веществ. Однако даже в относительно небольших сферах наблюдается гетерогенность клеток по потенциалу митохондрий, коррелирующая с обнаруженным ранее распределителем нестин-позитивных клеток в агрегатах различного размера. При этом популяция клеток с высокоэнергизованными митохондриями реагировала на добавление ядерного красителя снижением митохондриального потенциала, что может указывать на функционирование в этих клетках ABCG2-комплекса, характерного для недифференцированных стволовых клеток. Таким образом, в настоящей работе было показано, что величина митохондриального мембранного потенциала в клетках нейросфер позволяет оценивать функциональное состояние клеток и может служить критерием выбора условий культивирования для оптимального обеспечения всех клеток культуры кислородом, питательными и сигнальными веществами. Обнаружено, что происходящее при культивировании увеличение размеров нейросфер может негативно сказываться на состоянии клеток центральной части больших агрегатов. Кроме того, выявлено присутствие в культуре нейральных клеток с высоким митохондриальным потенциалом, имеющих черты истинных стволовых клеток, причем количество таких клеток уменьшается при росте нейросфер, что может быть следствием начала дифференцировки части клеток в более зрелые нейральные клетки.