

Подсекция «Биология развития»

Устные доклады

Влияние антропогенного загрязнения водоемов на развитие бесхвостых амфибий

Агильон Гутиеррес Давид Рамиро

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
кафедра биологической эволюции, Москва, Россия*

davidrag@gmail.com

Задачей данного исследования является изучение степени влияния антропогенного загрязнения на развитие бесхвостых амфибий (*Rana temporaria* L., *Rana arvalis* Nils. и *Bufo bufo* L.). Мы сравнивали популяции этих видов, обитающих на территории города Москвы и на территории Звенигородской биологической станции.

Полевая часть исследования заключалась в фиксации головастиков на стадии почки задней конечности. Для этого были размещены «садки», ограничивающее расплывание головастиков, но не препятствующие свободному движению воды. «Садки» были помещены в водоемы города Москвы и Звенигородской биологической станции. Экспериментальная часть работы представляла собой лабораторные исследования влияния загрязнения водоемов «железом» и «свинцом» на развитие амфибий. В качестве имитирующего загрязняющего фактора были выбраны ржавые гвозди, как источник загрязнения железом, и охотничья дробь, как источник загрязнения свинцом. Кладки исследуемых видов разделили на три части, первая часть развивалась в аквариуме, куда было добавлено «железо», вторая часть развивалась со «свинцом», и третья часть использовалась в качестве контроля. Всего было поставлено 20 таких кладок. По окончании эксперимента они были подвержены морфометрическому и биохимическому анализу, аномальные головастики - гистологическому и гистохимическому анализу. Так же проводился химический анализ воды как из водоемов природных, так и из аквариумов, в которых проводился эксперимент.

Было показано, что наиболее характерными аномалиями были искривления позвоночника, полная деформация, нарушения развития кишечника и кожных покровов. В подмосковных популяциях исследуемых видов был обнаружен меньший процент аномалии, чем в городе Москве. Гистологическое исследование показало, что причиной искривления позвоночника являются нарушения в ходе сомитогенеза. Этот дефект влияет на общее развитие хвостовой пластинки, что может приводить к потере способности эффективно плавать у головастика. Химический анализ головастиков показал, что и железо, и свинец концентрируются в тканях головастиков. Железо было обнаружено и при гистохимическом анализе. Эти данные подтверждают, что аномалии могут быть вызваны непосредственным действием химического состава воды из нерестовых прудов.

Влияние тиреоидного гормона на морфогенез черепа *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei)

Борисов Василий Борисович¹, Шкиль Федор Николаевич²

¹Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН, ²Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

v.borisov.sev@gmail.com

Тиреоидные гормоны щитовидной железы (ТГ) являются одним из ключевых факторов в регуляции онтогенеза позвоночных животных. Наиболее полно их роль изучена в метаморфных преобразованиях амфибий, в формировании нервной, пищеварительной и опорно-двигательной систем амниот, в заболеваниях человека, вызванных гипо- и гипертиреозом и т.д. Однако до настоящего момента не было проведено комплексной оценки роли ТГ в формировании скелета позвоночных. Целью настоящей работы стала оценка влияния повышенной концентрации ТГ на краниогенез *D. rerio*. Материалом исследования послужили личинки и молодь *D. rerio*, выращенные в следующих режимах: 1) контроль – естественный уровень ТГ; 2) повышенное содержание ТГ (гипертиреозидизм), за счет добавления в воду трийодтиронина

(1нг/мл). Сравнительная оценка морфогенеза черепа производилась на дифференциально окрашенных и просветленных в соответствии с общепринятой методикой препаратах. Результаты оценки влияния гипертиреозидизма на развитие черепа *D. regio* показали, что сроки и последовательность появления большинства элементов хрящевого черепа не изменяются под действием повышенной концентрации ТГ. Было отмечено более раннее начало оссификации некоторых хрящей и, кроме того, отсутствие у части особей хряща *kinethmoideum* – предшественника одноимённой кости. Реакция костных элементов черепа на повышение уровня ТГ неоднородна. Большинство костей, появляющихся на ранних этапах развития, сохраняют сроки своего появления в условиях гипертиреозидизма, но заметно ускоряют темпы кальцинации и роста. Кости, появляющиеся на более поздних этапах развития, реагируют на гипертиреозидизм по-разному. Для ряда костей отмечено сверхраннее появление, выраженное особенно ярко для *infraorbitalia 1 – 5*. В то же время, сроки появления остальных костей практически не меняются. При этом многие кости также изменяют темпы своего роста, что приводит к изменению их формы. У части особей отмечено изменение количества сериальных элементов – уменьшение числа *infraorbitalia* и числа рядов глоточных зубов. Таким образом, показано, что ТГ принимают участие в регуляции краниогенеза костистых рыб, а различные черепные элементы демонстрируют различную ТГ реактивность. Повышение концентрации ТГ в крови может приводить к значительным изменениям хода морфогенеза черепа. Часть этих девиаций находит отражение в фенотипе взрослых особей, приводя зачастую к ярко выраженной мопсовидности рыб.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 10-04-00787-а) и гранта Президента РФ (МК – 2026.2011.4).

Сравнительная характеристика чувствительности линий мышей, несущих делеции генов *Muc2* и *Zbtb33*, к действию воспалительного агента – сульфата декстрана

Десяткин Андрей Андреевич, Шумская Валерия Сергеевна

*Центр «Биоинженерия», лаборатория геномики и эпигеномики позвоночных, Москва, Россия
andreideviatkin@gmail.com*

Белок ZBTB33 (Каизо) – метил-ДНК-связывающий белок; эксперименты по удалению белка Каизо у лягушки (*Xenopus laevis*) и у мыши (*Mus musculus*) привели к разным результатам: отсутствие Каизо у лягушки вызывает летальность на стадии среднебластульного перехода, при нокауте гена Каизо мыши остаются живыми и фертильными (никаких фенотипических проявлений нокаута не выявлено). Белок MUC2 – муцин, структурный компонент слизи, защищающий эпителий кишечника от механических повреждений. У нокаутных по гену *muc2* животных показана повышенная вероятность развития рака толстой кишки.

В работе мышей, несущих нокаут по гену Каизо, двойной нокаут по генам Каизо и *Muc2*, и особей дикого типа подвергали воздействию 2 % раствора воспалительного агента декстрана сульфата в течение пяти дней. Спустя 4 недели после начала эксперимента животных забивали, проводили гистологический анализ толстого кишечника. На протяжении всего опыта ежедневно взвешивали животных.

Воздействие декстрана сульфата на особей дикого типа и особей, несущих делецию гена Каизо, не вызвало достоверного изменения массы животных. У животных с двойным нокаутом наблюдали резкое снижение массы тела, изменение консистенции стула, наличие крови в стуле, часть особей с двойным нокаутом погибла в ходе эксперимента. Перед описываемой работой проводили аналогичный опыт с участием четырёх линий мышей: нокаут по генам *muc2*, *zbtb33*, двойной нокаут, дикий тип. Особи, несущие делецию по гену *muc2*, показали снижение массы тела, но не такое резкое, как у особей с двойным нокаутом.

По литературным данным известно, что белок Каизо бифункционален (помимо метил-ДНК-связывающей активности белок образует комплекс с катенином p120, участвующем в межклеточном взаимодействии). Каизо обладает как ядерной, так и цитоплазматической локализацией; есть основания предполагать, что данный белок участвует в wnt/ β -катениновом

пути. Показано, что у мышей, имеющих мутацию в APC комплексе (т.е. wnt/ β -катениновый каскад нарушен), нокаут по гену Каицо повышает резистентность к развитию рака кишечника.

В представленной работе показано, что особи, несущие двойной нокаут более чувствительны к воздействию воспалительного агента декстрана сульфата, чем особи, несущие делецию по одному гену.

Особенности динамики дермальных меланофоров на ранних стадиях развития личинок *Xenopus laevis*

Джапова Вита Валентиновна

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
Москва, Россия
dzhapova@list.ru*

Опубликованные данные по развитию пигментных клеток в личиночный период развития *X. laevis* охватывают 46-54 или 52-59 стадии по таблицам нормального развития Ньюкупа и Фабера, причем промежутки между съемками составляют 3-7 дней. Мы изучили особенности развития дермальных меланофоров личинок *X. laevis* на ранних стадиях развития – с 39 по 49. Для получения точных результатов мы использовали подробную – ежедневную – микрофотосъемку исследуемого участка кожи личинок, которых содержали на разных фонах. Съемка была начата сразу после вылупления личинок.

Анализ полученных нами данных для индивидуальных животных показал, что с 39 по 45 стадии происходит активное нарастание численности меланофоров, пик роста численности зарегистрирован на 45 стадии на всех трех фонах. После 45 стадии прирост численности популяции меланофоров имеет особенности на разных фонах. На белом и сером фонах численность меланофоров незначительно возрастает до 47 стадии и сохраняется на одном уровне до 48-49 стадий, на черном фоне продолжает увеличиваться до 48-49 стадий. Увеличение числа меланофоров у личинок, развивавшихся на белом фоне, происходит только за счет дифференцировок, митозы отсутствуют. На сером фоне прирост пигментных клеток осуществляется также за счет дифференцировок, с 47 по 48 стадии отмечена слабая митотическая активность. На черном фоне в прирост численности популяции меланофоров вносят вклад как дифференцировки, так и митозы на 47-49 стадиях.

Полученные данные по динамике дермальных меланофоров позволяют выделить два периода на ранних стадиях развития личинок. Первый период длится около трех дней, с момента вылупления по 45 стадию, в этот период происходят только дифференцировки меланофоров из меланобластов. Второй период длится около десяти дней, с 47 по 49 стадию, характеризуется появлением первых митозов. Разницу в интенсивности дифференцировок у животных на разных фонах можно объяснить тем, что фоновые реакции появляются у личинок шпорцевой лягушки практически сразу, так как глаза личинок полностью функционируют уже в первый день после вылупления. Полученные нами данные впервые показывают, что морфологическая фоновая реакция – увеличение числа клеток – проявляется уже на второй день после вылупления личинок *X. laevis*.

Становление первичного плана строения актинии *Nematostella vectensis* в экспериментах по диссоциации – реагрегации эмбриональных клеток

Козырева Анастасия Олеговна

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
кафедра биологической эволюции, Москва, Россия
kozyrevaa@hotmail.com*

Онтогенез обычно рассматривается как последовательность морфогенезов, крайне консервативных в пределах вида. В данной работе экспериментально показано, что поздние бластулы актинии *Nematostella vectensis* (Stephenson, 1935) способны к формированию первичных полипов на основе морфогенезов, не использующихся в нормальном развитии.

Поздние бластулы (по 40-150 штук одновременно) были диссоциированы на клетки в морской воде, лишённой ионов магния и калия, а затем центрифугированы в течение 30 минут со скоростью 0,8 оборотов в минуту; получившиеся агрегаты развивались в нормальной морской воде. Морфология и ультраструктура агрегатов были исследованы методами электронной и сканирующей микроскопии.

Через 3-4 часа после центрифугирования агрегаты уплотнялись и принимали шарообразную форму. На этой стадии наблюдались нетипичные для эмбрионов *Nematostella* внутренняя структура агрегатов и клеточная подвижность. Через 10-14 дней после начала эксперимента формировались первичные полипы. Они были способны к сокращению, обладали ротовым отверстием, щупальцевыми почками, мезентеральной системой и стрекательными клетками. Нормальные полипы формировались даже из агрегатов значительно меньшего размера, чем обычные эмбрионы. Эксперименты, в которых использовались меченые эмбрионы, показали, что один агрегат состоит из клеток нескольких бластул. При одновременной диссоциации меченых оральных и немаркированных аборальных половинок эмбрионов, клетки с меткой никогда не занимали положение строго в ротовой области.

Агрегаты формировались на основе клеток с разными генотипами и разным исходным положением в бластуле. По-видимому, становление полярности в наших экспериментах не являлось следствием простой сортировки клеток. В ходе развития агрегата не наблюдались характерные для онтогенеза *Nematostella vectensis* стадии инвагинационной гастрюлы, планулы и эволютивного метаморфоза. Тем не менее, в большинстве случаев, формировались первичные полипы. Это свидетельствует о том, что разные морфогенетические пути могут приводить к одной и той же дефинитивной стадии.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 12-04-01862-а.

Воздействие мелатонина и эритропоетина на клетки кожи человека: пролиферация и апоптоз

Косых Анастасия Валерьевна

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
Москва, Россия
avkosyh@gmail.com*

Гормоны выполняют множество важных и разнообразных функций в организме. Мелатонин используется в медицине для нормализации сна, замедления процессов старения, при создании средств для ухода за кожей. Эритропоетин применяется при лечении различных видов анемии, онкологических заболеваний, ран, ожогов, трансплантации органов и тканей. Однако до сих пор существует множество противоречивых данных по влиянию этих гормонов на клетки.

Для исследования влияния мелатонина и эритропоетина на пролиферацию клеток (фибробластов и кератиноцитов) был проведен МТТ-тест. В связи с полученными результатами проверили влияние мелатонина на скорость миграции кератиноцитов в рану, путем удаления части монослоя. Антиапоптотическое действие гормонов исследовали с помощью метода TUNEL.

Было обнаружено, что длительная инкубация кератиноцитов и фибробластов с мелатонином в концентрациях 100нМ, 10нМ, 1нМ приводит к подавлению миграции и пролиферации. При воздействии менее 30 минут мелатонин не влияет на пролиферацию обоих типов клеток, а также не проявляет каких-либо антиапоптотических свойств. При длительной инкубации кератиноцитов и фибробластов с эритропоетином в концентрации 50нг/мл увеличивается пролиферация и снижается число апоптотических клеток.

Таким образом, исследованные концентрации мелатонина ингибируют рост и пролиферацию клеток кожи. В литературных источниках указывалось стимулирующее и ингибирующее действие мелатонина. Такое двойственное поведение гормона может являться следствием наличия двух типов рецепторов: мембранных и ядерных, что может позволить одной молекуле запускать противоположные реакции в разных типах клеток.

Эритропоэтин проявляет антиапоптотические свойства и стимулирует пролиферацию клеток кожи, поэтому возможно его использование при лечении ран не только в качестве противовоспалительного агента, но и как стимулятора регенерации.

Разнокачественность признаков эмбрионов нельмы *Stenodus leucichthys nelma* (Salmoniformes: Coregonidae) при инкубации икры с различной освещенностью

Лютиков Анатолий Анатольевич

*Государственный научно-исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства,
Россия, Санкт-Петербург
tokmo@mail.ru*

Одной из причин, влияющих на разнокачественность признаков в эмбриогенезе рыб, наравне с физиологическим состоянием производителей и их генетической основой, является воздействие внешних факторов среды. Наряду с температурой, наиболее значимым фактором выступает свет.

С целью изучить влияние освещенности на изменчивость признаков в эмбриональном развитии нельмы - *Stenodus leucichthys nelma* (Pallas, 1773), ее икру инкубировали в условиях рыбоводного завода в различных световых режимах: с искусственной освещенностью (контроль) и в затемненной части инкубационного цеха (опыт). Разница в силе светового воздействия с ноября по февраль в среднем составляла 9лк, в марте и апреле - 150лк. Остальные условия инкубации были одинаковыми.

На начальных этапах эмбриогенеза икра в двух группах развивалась синхронно. Спустя 17 сут. с начала инкубации наблюдались различия в количественных признаках: эмбрионы в контроле имели в среднем на 1 миотом больше, чем в опыте (40 и 39, соответственно), а к 41 сут. разница увеличилась до 3 миотомов (63 и 60, соответственно). К 48 сут. зародыши были полностью сформированы и количество сегментов тела в последующем не изменялось. На стадии вылупления среднее количество миотомов у свободных эмбрионов в контроле равнялось $65,50 \pm 0,27$ ($M \pm m$), в опыте $66,34 \pm 0,25$ ($M \pm m$).

Длина тела зародышей (*TL*) на всем протяжении инкубации была выше в контроле и при вылуплении составила $12,89 \pm 0,06$ ($M \pm m$) мм, а в опыте $12,74 \pm 0,06$ ($M \pm m$) мм. Различия между средними показателями длины и количеством миотомов в двух группах достоверны (при $p < 0,05$). Существенных различий в массе установлено не было: однодневные постэмбрионы в контроле и в опыте имели массу $8,73 \pm 0,13$ ($M \pm m$) мг и $8,67 \pm 0,12$ ($M \pm m$) мг, соответственно.

Начало пигментации глаз, тела, желточного мешка и окрашивание форменных элементов крови эмбрионов наступали раньше в контроле. Выживаемость зародышей в опытных группах по итогам инкубации не отличалась.

Таким образом, даже небольшая разница в освещенности сказывается на разнокачественности меристических признаков уже на стадии оформленного эмбриона, выражаясь в количественном различии сегментов тела зародышей в опытных группах.

Роль тиреоидных гормонов в раннем краниогенезе испанского тритона, *Pleurodeles waltl* (*Urodela, Salamandridae*)

Меркулова Ксения Михайловна

*Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия
merkulova-kseniya@rambler.ru*

Тиреоидные гормоны (ТГ) играют важную роль в развитии скелета амфибий. Традиционно считается, что все краниальные окостенения в своем развитии зависят от ТГ. Однако неизвестна роль ТГ в регуляции раннего краниогенеза, в течение которого появляется большая часть костей черепа хвостатых амфибий. У амфибий на ранних стадиях развития щитовидная железа нефункциональна и не продуцирует ТГ, однако наличие у эмбрионов амфибий материнского тиреоидного гормона и ТГ-рецепторов указывает на возможное участие ТГ в регуляции раннего онтогенеза. Для исследования роли ТГ в раннем краниогенезе искусственно изменяли уровень ТГ в плазме крови (повышая экзогенным ТГ). Поскольку

большая часть костей формируется вскоре после выхода личинок из икры, возможно, что экзогенный гормон может не успеть оказать на них какое-либо влияние. Для увеличения продолжительности воздействия ТГ на окостенения начальных стадий развития онтогенез и краниогенез испанского тритона замедляли понижением температуры содержания с экспозицией высокой дозой ТГ (10 и 50 нг/мл). Для исключения/ослабления воздействия материнского гормона на окостенения ранних стадий на личинок воздействовали амиодароном, который связывает рецепторы ТГ, не «допуская» к ним эндогенный ТГ. Было выявлено, что воздействие экзогенного ТГ не влияло на время появления окостенений ранне-личиночных стадий. При содержании личинок в условиях пониженной температуры резко замедлялось эмбриональное и личиночное развитие, однако все окостенения ранне-личиночного периода возникали практически на тех же стадиях и в той же последовательности, что и при нормальном развитии личинок. При развитии личинок в растворе амиодарона время появления и стадии, на которых появлялись окостенения ранне-личиночного периода развития, не изменялись по сравнению с нормой, но задерживалось появление окостенений средне- и поздне-личиночного периодов. Таким образом, у *P. waltl* ни повышение уровня ТГ при воздействии экзогенным ТГ, ни снижение чувствительности к ТГ при воздействии амиодароном не сказывались на времени (стадии) и порядке появления окостенений ранне-личиночного периода развития. Соответственно, можно заключить, что у хвостатых амфибий ранние окостенения черепа, в отличие от окостенений средне- и поздне-личиночного периода, не зависят от уровня ТГ.

Получение модели наследственного гипоталамического несахарного диабета на основе плюрипотентных стволовых клеток крыс линии *Brattleboro*

**Немудрый Артем Александрович^{1,2,3,4}, Стекленева Анастасия Евгеньевна^{1,2,3},
Васькова Евгения Андреевна^{1,2,3}**

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, ²Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина, ³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, ⁴Национальный исследовательский Новосибирский государственный университет,

Новосибирск, Россия

asahiro2@ymail.com

В течение последнего десятилетия активно развиваются технологии получения и культивирования стволовых клеток, возможным применением которых стала клеточная терапия. Одним из направлений исследований является введение в организм экспериментального объекта стволовых клеток для изучения возможности регенерации тканей. Основной проблемой данного подхода является невозможность проследить дальнейшую судьбу введенных клеток, их распределение в организме, а также их жизнеспособность. Именно этим обуславливается необходимость получения адекватных моделей для биомедицинских исследований тканевой трансплантации, генной и клеточной терапии. Получение плюрипотентных клеток крыс линии *Brattleboro*, несущих мутацию гена вазопрессина, позволяет проводить исследования развития наследственного несахарного диабета, а также его коррекции с использованием аутологичного клеточного материала.

В данной работе были получены эмбриональные и индуцированные плюрипотентные клетки (ЭСК и ИПСК) крыс линии *Brattleboro*. ИПСК были получены из эмбриональных фибробластов путем сверхэкспрессии транскрипционных факторов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* с использованием доксициклин-управляемой лентивирусной конструкции. ЭСК были получены из внутренней клеточной массы эмбрионов на стадии бластоцисты. Была проведена молекулярно- и цитогенетическая характеристика полученного материала.

Полученные в данной работе плюрипотентные клетки в дальнейшем будут использованы в биомедицинских исследованиях применения клеточной терапии для коррекции наследственных заболеваний в качестве модели гипоталамического несахарного диабета. Данная модель позволяет оценить эффективность коррекции мутантного фенотипа животных

как с помощью молекулярно-генетических методов (оценка уровня экспрессии вазопрессина), так и физиологических параметров (диурез, уровень реабсорбции воды почками). Более того, с помощью современных методов визуализации (МРТ, ЯМР и проч.), а также путем введения в геном репортерных генов, возможно изучить распределение в тканях исследуемого животного используемых при клеточной терапии стволовых клеток, чтобы определить их потенциал в регенеративной медицине и трансплантологии.

Нарушение формирования эллипсоидного тела и зрительных долей головного нервного ганглия приводит к изменению брачного поведения у мутантных самцов *D. melanogaster*, несущих аллель *sbr*¹² в гетерозиготе

Никулина Анна Олеговна

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

anna.o.nikulina@gmail.com

Правильное формирование нервных центров – залог работоспособности головного мозга. Нейрогенез, как и все процессы развития, контролируется многими генами. Мы впервые показали, что в формировании определенных нервных центров особую роль играет белок SBR (Dm NXF1) – универсальный экспортер мРНК из ядра в цитоплазму клетки. У мутантов, несущих рецессивный летальный аллель *sbr*¹² в гетерозиготе, нарушена структура эллипсоидного тела и зрительных долей головного нервного ганглия, кроме того, они не оставляют потомства. Ранее было показано, что у мутантных самцов изменен ряд параметров брачной песни.

Для оценки брачной активности самцов мы использовали индекс ухаживания (ИУ). ИУ равен процентному отношению времени, занятому ухаживанием, ко времени наблюдения (стандартно - 10 минут после ссаживания девственной самки с самцом). Для контроля были взяты самцы дикого типа (линия *Oregon-R*).

Большинство самцов дикого типа копулирует с самками в течение первых 15 минут после ссаживания с самками дикого типа. ИУ₁₀ таких самцов (для наблюдения в течение 10 минут после ссаживания) составляет 76%. Мутантные самцы (для краткости – *sbr*¹²), в отличие от самцов дикого типа, как минимум, в течение первых 30 минут после ссаживания вообще не ухаживают за самками. Таким образом, ИУ₁₀ самцов *sbr*¹² равен 0, различия достоверны ($p < 0.05$). Измерения проводили спустя не менее 5 дней после наркотизации эфиром для разделения самцов и самок.

Выявленные отличия в интенсивности ухаживания у самцов *sbr*¹² и самцов дикого типа согласуются с особенностями строения головного нервного ганглия мутантных самцов. Как известно, эллипсоидное тело является одним из важнейших контроллеров брачного поведения, а зрение играет немаловажную роль для успешного преследования самки во время ритуала ухаживания. По-видимому, дефекты структуры эллипсоидного тела и зрительных долей нервного ганглия у самцов *sbr*¹² приводят к нарушению работы этих нервных центров, что проявляется в нарушении брачного поведения у таких самцов.

Работа поддержана грантами РФФИ 09-04-00697-а и НШ-6455.2010.4.

Эктопическая трансплантация как модель для изучения морфогенетического потенциала клеток Сертоли

Павлюченкова Светлана Михайловна

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,

Москва, Россия

smilesweta@yandex.ru

В развитии и поддержании сперматогенеза у млекопитающих ключевая роль принадлежит соматическим клеткам Сертоли (КС). Установленный около 20 лет назад факт перехода этих высокодифференцированных клеток к пролиферации в ответ на воздействия, нарушающие сперматогенез, открыл новое направление в изучении их биологии. Задача настоящего исследования – определить, является ли пролиферация КС обязательным условием проявления

их морфогенетического потенциала. В этих целях использован метод эктопической трансплантации.

Самцам мышей линии C57BL/6 под капсулу почки трансплантировали кусочки семенника, отдельные канальцы или суспензию клеток, взятые от интактных мышей и от животных после воздействий, активирующих пролиферацию КС (введение мутагена дипина, крипторхизм, культивирование).

Через 4 нед после трансплантации кусочков семенников или отдельных канальцев 3–сут мышат, в трансплантатах развитие половых клеток доходило до стадии сперматоцитов I порядка, характерной для сперматогенного процесса на данной стадии онтогенеза. После трансплантации суспензии клеток мышат, происходило новообразование семенных канальцев, содержащих КС и сперматогониальные клетки.

Через 4 нед после трансплантации кусочков семенников или отдельных канальцев 3–4 мес мышей в трансплантатах сохранялись семенные канальцы, содержащие только КС на базальной мембране, однако через 8 нед все КС перемещались в просвет канальцев. Через 4 нед после трансплантации КС, культивированных *in vitro* в течение 14 дней, происходило образование канальцеподобных структур, морфогенез которых далее не развивался, но через 8 нед признаков их резорбции не было.

Через 4 нед после трансплантации канальцев или кусочков семенников половозрелых животных, которым за 14 сут до этого был внутрибрюшинно введен дипин, в трансплантатах обнаруживались семенные канальцы, содержащие КС. Через 8 и 12 нед сохранность канальцев и КС в них оставалась прежней. При использовании семенников от мышей с индуцированным крипторхизмом (45 сут), были получены аналогичные результаты.

Таким образом, полученные результаты показывают, что активация КС к делению является условием необходимым для развития, регенерации и поддержания сперматогенного процесса и позволяют предположить, что выраженность морфогенетического потенциала КС зависит от уровня их пролиферативной активности.

Сравнительный анализ морфогенеза волосяных фолликулов у мышей линии C57Bl6 и мутантов *we/we wal/wal*

Риппа Александра Леонидовна

Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

rippa86@yandex.ru

Морфогенез волосяных фолликулов (ВФ) инициируется в результате реципрокных взаимодействий эмбрионального эпидермиса и подлежащей дермы. Начальной стадией образования ВФ является поляризация эпидермальных плакод и конденсация дермальных клеток. Далее зачаток ВФ инвагинирует в дерму, окружает конденсат дермальных клеток и элонгирует. Плотные упакованные фибробласты в составе луковицы ВФ уже называются дермальной папиллой.

Изучив морфогенез ВФ мышей линии C57Bl6 в аспекте экспрессии белков внеклеточного матрикса и рецепторов к ним, мы провели аналогичное исследование на мутантах *we/we wal/wal* с развивающейся тотальной алопецией, денегерацией ВФ и гипертрофией сальных желез. Нами были обнаружены следующие аномалии в развитии ВФ у мутантов. У животных на 12 день постнатального развития наблюдали отсутствие вибрисс и остевых волос в шерстном покрове. На 18.5 сутки эмбрионального развития количество закладывающихся ВФ было значительно меньше, чем у дикого типа. В эмбриональном эпидермисе у мутантов были обнаружены зоны увеличения числа малодифференцированных кератиноцитов без миграции в дерму. В местах аномального развития наблюдалось утолщение базальной мембраны. Также в культурах первичных эмбриональных кератиноцитов были выявлены аномалии в экспрессии интегринов $\alpha 1\beta 1$ и $\alpha 1\beta 5$. В кератиноцитах дикого типа $\beta 1$ интегрин экспрессируется по периферии клеток в зонах межклеточных соединений, а в кератиноцитах мутантов экспрессия $\beta 1$ интегринов в этих зонах была слабо выраженной. В культуре кератиноцитов мутантных эмбрионов наблюдалась диффузная экспрессия $\alpha \nu \beta 3$ и $\alpha \nu \beta 5$ интегринов, рецепторов к

витронектину и остеопонтину, в цитоплазме клеток в отличие от экспрессии по периферии клеток у дикого типа.

Таким образом, морфологическая картина развивающейся алопеции и дегенерации ВФ в постнатальном развитии у взрослых особей является следствием аномальной закладки ВФ в эмбриогенезе. Полученные результаты позволяют продвинуться в понимании механизмов алопеции у млекопитающих и подготавливают почву для дальнейшего направленного изучения этой проблемы.

Влияние условий культивирования на первичную культуру дермальных фибробластов

Трусова Инна Александровна², Петерсен Елена Владимировна¹,

Горкун Анастасия Алексеевна¹, Кошелева Настасья Владимировна^{1,2}

*¹ ФГБУ НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН, ² Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
innatrusova@gmail.com*

Соединительная ткань, основными клеточными элементами которой являются фибробласты, играет важную роль в онтогенетических и регенерационных процессах. Активно участвуя в поддержании гомеостаза ткани, фибробласты способны эффективно создавать условия для пролиферации и миграции других типов клеток. В последние годы стремительно увеличилось количество работ, посвященных пластичности фибробластов в культуре и их взаимосвязи с мезенхимными стволовыми клетками. Целью нашего исследования стало изучение влияния разных условий культивирования на свойства дермальных фибробластов человека.

Фибробласты выделяли из дермы биоптатов кожи, полученных при пластических операциях с добровольного согласия доноров, по стандартной методике с использованием трипсина и коллагеназы. Выделенные фибробласты культивировали параллельно в 2D монослое, на гелях с разной степенью адгезии и в «висячих каплях», с использованием смеси сред DMEM/F12 в соотношении 1:1 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

В 2D культуре фибробласты дермы кожи сохраняли нормальный диплоидный кариотип, хорошо пролиферировали, экспрессировали мезенхимные поверхностные маркеры (CD105, CD90, CD44), не экспрессировали гемопозитические и эндотелиальные маркеры (CD31, CD34, CD45). В прикрепленной культуре в клетках присутствовали стресс-фибриллы, они приобретали фенотип миофибробластов, что было подтверждено экспрессией гладкомышечного α -актина и увеличением экспрессии коллагенов I и III типов. В коллагеновом геле (100тыс.кл./мл и коллагена 1,5-2,5мг/мл) скорость пролиферации фибробластов снижалась, они встраивались в фибриллярную сетку коллагеновых волокон, при этом возникала активизация актиновых филаментов и передача внутриклеточного напряжения во вне, что подтверждало способность фибробластов вызывать быструю контракцию коллагенового геля. Предотвращение контракции гелей отмечали при культивировании фибробластов в 3% гиалуроновой кислоте и 2% полиакриламиде, в которых, фибробласты формировали агрегаты и тубулоподобные структуры. В системе «висячая капля» в плотности 100тыс.кл./мл уже в первые часы фибробласты агрегировали, к седьмому дню формировали компактные плотные жизнеспособные сфероиды. Поверхностный слой сфероидов состоял из двух-трех слоев вытянутых клеток, экспрессирующих нестин, виментин, ламинин, что свидетельствует о возможности репрограммирования дермальных фибробластов.

Полученные результаты свидетельствуют, что благодаря пластичности фибробластов разные условия культивирования позволяют обогатить гетерогенную популяцию взрослых дермальных фибробластов, которые, как известно, обладают контактным торможением и ограниченной продолжительностью жизни, наименее дифференцированными клетками фибробластического дифферона дермы. Это открывает возможность для создания новых перспективных технологий по восстановлению кожного покрова.

Выделение и культивирование мультипотентных стволовых клеток из жировой ткани и костного мозга хомяков и крыс

***Гайфуллина Раушания Фаритовна, Катина Маргарита Николаевна,
Хаятова Зифа Гумеровна***

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

hayatova@list.ru

Целью исследования было получить культуры мультипотентных стволовых клеток (МСК) хомяков и крыс. Задачами исследования являлось выделить (МСК) из жировой ткани и костного мозга хомяков и крыс, получить стабильную культуру МСК крыс и хомяков.

В качестве доноров жировой и костномозговой ткани использовались взрослые самцы сирийского хомяка *Mesocricetus auratus* и крысы *Rattus norvegicus* линии *Wistar*. Животные были декапитированы, жировая ткань и костный мозг были выделены в стерильных условиях при ламинарном токе воздуха. Костный мозг был получен из диафизов бедренных и большеберцовых костей животных, гомогенизирован пипетированием, клетки осаждены центрифугированием при 500g в течение 5 минут. Клетки стромально-сосудистой фракции жировой ткани были получены инкубацией гомогенизированного внутрибрюшинного и подкожного жира животных с коллагеназой краба (Биолот) в конечной концентрации 0.2% в течение 1 часа при 37°C при постоянном покачивании. Клетки были высеяны на среду α -МЕМ, содержащую 10% сыворотки плодов коров (FBS), пенициллин-стрептомицин, глутамин и 1нг/мл основного фактора роста фибробластов человека (FGF2). Не прикрепившиеся к пластику клетки были удалены через 48 часов. Культуры клеток поддерживались в течение 5 пассажей.

В результате исследования были получены стабильные культуры МСК костного мозга и жировой ткани хомяков и крыс. В культуре клеток из жировой ткани 80% плотность клеток была получена на 4-й день от посева, в культуре клеток костного мозга - на 14-16 день культивирования. В дальнейшем культуры клеток из жировой ткани требовали пересева (1:4) каждые 3-4 дня, культуры костномозговых клеток – каждые 7-10 дней. К пятому пассажу сохранилась изначальная фибробластоподобная морфология клеток.

Таким образом, из костного мозга и жировой ткани взрослых хомяков и крыс были получены культуры клеток, которые по литературным данным являются мультипотентными стволовыми клетками. Среда α -МЕМ, содержащая 1нг/мл FGF2, позволяет поддерживать культуры МСК в течение как минимум 5 пассажей без существенного изменения морфологии и скорости пролиферации клеток.

Мелатонин как антиоксидант при индуцированном фиброзе печени мыши

***Чернышева Мария Борисовна, Василегина Юлия Игоревна, Налобин Денис Сергеевич, Ключ
Ксения Андреевна, Невредимова Татьяна Сергеевна, Мармий Наталья Владимировна***

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
кафедра эмбриологии, кафедра биоорганической химии,*

Москва, Россия

mbch@list.ru

В настоящее время исследования репаративных процессов печени в ответ на различные повреждения являются одной из наиболее острых проблем регенеративной медицины. Основным путем развития заболеваний печени различной этиологии является фиброз. Под фиброзом следует понимать некроз гепатоцитов и увеличение разрастания соединительной ткани в печени. Конечная стадия фиброза - цирроз - может приводить к летальному исходу.

Фиброз и цирроз печени у мышей можно вызвать применением четыреххлористого углерода (CCl₄). В процессе метаболизма CCl₄ образуются свободные радикалы, индуцирующие окислительный стресс, который, в конечном итоге, приводит к апоптозу и некрозу гепатоцитов. Для снижения уровня окислительного стресса используют различные антиоксиданты. В данном эксперименте проводили исследование влияния гормона мелатонина, обладающего антиоксидантными свойствами.

Для эксперимента использовали самцов мышей гибридов (C57BL/6J x CBA/J)_{F1}, CCl₄ вводили в/б дважды в неделю из расчета дозы 1мкл/г в виде 30% масляного раствора. Опытная группа получала с питьевой водой мелатонин в концентрации 20мкл/г. Животных выводили из эксперимента на 1, 2, 3 и 4-й неделе после начала инъекций. Степень развития фиброза оценивали по шкале METAVIR. Параллельно с этим оценивали уровень окислительного стресса по количеству 8-окси-2-дезоксигуанозина в гидролизате ДНК, выделенной из печени с помощью ОФ ВЭЖХ (Beckman Gold, США) с применением амперометрического детектора (Химвавтоматика, Россия).

Фиброз начинается с отложения экстрацеллюлярного матрикса в перипортальных зонах печеночной долики (2-я неделя), далее образуются септы (3-4 неделя). И, наконец, они прободают паренхиму органа и образуют соединительнотканые тяжи вокруг каждой долики (5-я неделя). В группе, которая получала с питьевой водой мелатонин, степень фибротических изменений значительно снижена. Проведенный параллельно анализ количества 8-окси-2-дезоксигуанозина подтвердил снижение уровня окислительного стресса в группе животных, получавших мелатонин. На основании полученных данных можно сделать вывод о гепатопротекторных свойствах мелатонина.

Анализ плюрипотентности первичных линий эмбриональных стволовых клеток мыши при дифференцировке *in vitro*

Шалаева Анна Валерьевна

*Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук, Новосибирск,
Россия
nura-05@yandex.ru*

Важным направлением современной биологии и медицины является разработка технологий, которые позволяли бы контролировать дифференцировку эмбриональных стволовых (ЭС) клеток *in vitro* и получать специализированные клетки, которые можно было бы применить в терапии различных болезней человека.

Целью данной работы был анализ плюрипотентности первичных линий ЭС клеток мыши при дифференцировке *in vitro* в эмбрионидных тельцах и проведение направленной дифференцировки ЭС клеток мыши в гепатоциты.

Для ЭС клеток существует несколько тестов на плюрипотентность - *in vivo* и *in vitro*. Подкожная инъекция ЭС клеток иммунодефицитным мышам приводит к образованию тератом, содержащих клетки, производные всех трех зародышевых листков. Культивирование ЭС клеток в суспензионной культуре без LIF и фидера ведет к спонтанной *in vitro* дифференцировке ЭС клеток в эмбрионидные тельца (ЭТ). Производные зародышевых листков могут быть обнаружены в ЭТ с помощью ОТ-ПЦР анализа генов-маркеров.

Мы проанализировали экспрессию маркеров в ЭТ исследованных линий ЭС клеток мыши с помощью ОТ-ПЦР анализа. ЭТ были получены двумя методами: методом «висячей капли» и в суспензии. ОТ-ПЦР анализ был проведен на 5, 7 и 9 день, с использованием маркеров, специфичных трем зародышевым листкам: *Sox17*, *Foxa2*, *Transferrin* (энтодерме), *Brachyury*, *Goosecoid* (мезодерме), *Nestin* и *Neurofilament* (эктодерме). В ЭТ всех исследованных линий ЭС клеток была обнаружена экспрессия всех маркеров дифференцировки.

Вторая часть работы заключалась в дифференцировке ЭС клеток в гепатоциты (Гц). Мы поставили эксперимент в двух вариантах: дифференцировка в монослое и в ЭТ. Для работы были использованы индукционные факторы, при помощи которых возможна эффективная дифференцировка в Гц. Обе системы имитируют модель развития органа в эмбриогенезе через формирование энтодермы, дифференциацию в печеночные клетки и созревание Гц. В результате нашей работы мы получили Гц из трансформированной линии ЭС клеток, в которой под контролем промотора гена альбумина экспрессировался GFP.

**Ранние стадии эмбриогенеза черепа ужа обыкновенного *Natrix natrix* (*Ophidia, Colubridae*),
неописанные ранее структуры и их предполагаемая природа**

Шеввердюкова Анна Владимировна

*Институт зоологии имени И.И. Шмальгаузена НАН Украины, отдел эволюционной
морфологии позвоночных, Киев, Украина*

Hstramontana@gmail.com

С целью выяснить, что происходит в области будущего хрящевого черепа *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) еще до начала охрящевания закладок базовых его элементов (трабекул, полярных хрящей и паракордалий) мы исследовали эмбрионов ранних стадий развития, полученных в результате Кесарева сечения. Возраст эмбрионов определяли по таблице стадий нормального развития, предложенной Д. Р. Цером.

Всего исследовано 10 эмбрионов 24-28 стадий развития. Серийные гистологические срезы эмбрионов толщиной 5-7 мкм окрашивали альциановым синим-гематоксилин-эозином.

На 24 стадии развития область формирования будущего хрящевого черепа представлена однородной недифференцированной мезенхимной тканью. Параллельно с появлением и преобразованием в общей мезенхимной массе закладок базовых структур хрящевого черепа на 25 – 27 стадиях развития нами отмечены структуры неизвестной природы. Их межклеточное вещество выявляет специфичность к окраске альциановым синим, что свидетельствует о накоплении в нем мукополисахаридов, характерных для межклеточного вещества хрящевой и костной тканей. Ткань этих структур на некоторых этапах существования сходна с тканью закладок базовых структур хрящевого черепа на начальных этапах их охрящевания. Период появления и существования этих структур занимает одну-две стадии развития, затем их ткань теряет клеточную структуру, приобретает волокнистую, и структуры исчезают.

Исходя из топографии обнаруженных структур, они были идентифицированы нами как трабекулярная пластинка, орбитальные хрящи, *tectum epiphysale*, надглазничные хрящи, заднеглазничные отростки, этmoidная пластинка и крыловидно-квадратный хрящ, вероятно гомологичные таковым у эмбрионов некоторых рыб.

Считается, что череп позвоночных прошел три стадии эволюции: перепончатую, хрящевую, костную. Природу обнаруженных нами временных структур в эмбриогенезе черепа *N. natrix* можно обсуждать в двух аспектах: они представляют собой «следы» хрящевого, а возможно и перепончатого, черепа предковых форм позвоночных, что предполагает существование двух (или более) стадий эволюции хрящевого черепа.