

Подсекция «Клеточная биология и гистология»

Устные доклады

Цитостатические свойства GD2-специфичных антител на примере мышинной лимфомы EL-4

Вишнякова Полина Александровна, Холоденко Роман Васильевич

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
Россия, Москва
vpa2002@mail.ru*

Множество лабораторий по всему миру занимаются проблемой лечения рака, которая по сей день не утратила своей актуальности. В настоящее время разрабатываются новые подходы для лечения онкологических заболеваний, одним из которых является использование в терапии моноклональных антител. В качестве антигенных мишеней на поверхности опухолевых клеток могут выступать не только молекулы белковой природы, но также и липиды, например, ганглиозиды. Так, ганглиозид GD2 высоко экспрессирован на ряде опухолей. Ранее в нашей группе была показана прямая апоптоз-индуцирующая активность GD2-специфичных антител (GD2-Mab) на клетках мышинной лимфомы EL-4 и изучены механизмы проведения апоптотического сигнала.

В данной работе был отработан метод окрашивания клеток красителем CFSE и их многопараметрического цитометрического анализа. Для оценки клеточной гибели использовали пропидиум йодидный тест. Также проводили внутриклеточное окрашивание циклинов для проточной цитофлуориметрии.

Результаты показали, что 24-х часовая инкубация клеток с GD2-Mab и классическим химиопрепаратом доксорубицином привела к появлению апоптотических клеток. В то же время, живые по морфологическим признакам клетки, обработанные доксорубицином и GD2-Mab, обладали существенно большей интенсивностью флуоресценции CFSE относительно интактных клеток, что говорит о низком уровне пролиферации в пуле живых клеток, подвергшихся воздействию препаратов. Таким образом, воздействие исследуемых веществ приводит к двум эффектам: цитостатическому и цитотоксическому. Анализ прохождения клеточного цикла в PI-тесте показал значительное снижение доли клеток, находящихся в G1 стадии, как под действием доксорубицина, так и GD2-Mab. Для клеток, обработанных доксорубицином, наблюдается значительное накопление в G2 стадии, воздействие GD2-Mab приводит к равномерному распределению клеток по стадиям клеточного цикла. Изучение механизмов наблюдаемых эффектов станет следующим этапом исследования.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., государственный контракт №П1065.

Перемещение хромосомных территорий при дифференцировке и старении мезенхимных стволовых клеток

Вольдгорн Яна Иосифовна

*ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Россия, Москва
amrita86@mail.ru*

Положение хромосомных территорий (ХТ) оказывает влияние на такие процессы как активация/инактивация генов, дифференцировка и старение клеток, возникновение хромосомных aberrаций. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются удобной и легко доступной моделью для изучения данных процессов. Целью данной работы было изучение изменений в положении ХТ в МСК в процессе культивирования и дифференцировки.

Фиксированные на стадии интерфазы МСК подвергались методу FISH с использованием центромерных зондов к 6, 8, 11 и 18 хромосомам. С помощью специально разработанной программы оценивалось радиально положение ХТ в ядре.

Ядра МСК анализировали на ранних (до 4) и поздних (после 5) пассажах, а также после адипогенной и остеогенной дифференцировок. Было проанализировано более 2000 ядер. Индивидуальных различий в положении ХТ между культурами выявлено не было. Медианы радиальных расстояний центромер 6, 8, 11 и 18 составили 0,65; 0,67; 0,7 и 0,47 соответственно. Центромеры хромосомы 6 находятся на большем, а хромосомы 18 на меньшем радиальном расстоянии. На поздних пассажах происходит дистальное смещение хромосомы 6 ($p=0,03$). Различия положения центромер в зависимости от размера ядер выявлены не были. Один из гомологов каждой хромосомы всегда находится существенно ближе к центру ядра, чем другой.

Показано специфическое строение ядер МСК, отличающее их как от эмбриональных стволовых клеток, так и дифференцированных клеток. Такое строение может являться уникальной характеристикой МСК, связанной с эпигенетической регуляцией их активности. Обнаружены однонаправленные дистальные смещения хромосом 6 и 18 как при длительном культивировании, так и при дифференцировке. Не выявлено различий в поведении ХТ между МСК, полученными из костного мозга и жировой ткани.

Получение первичной культуры клеток почек новорожденных кроликов и подбор оптимальных условий их культивирования

Глаголева Ирина Сергеевна, Кириллова Юлия Марсельевна

ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»,

Россия, г. Казань, Научный городок 2

vnivi@mail.ru

Вирусные инфекции остаются лидирующими в мире среди других инфекционных патологий человека и животных. Репродукция вирусов на чувствительных клеточных линиях служит основой получения антигенов для производства вакцин. Данная работа направлена на получение первичной культуры клеток почек новорожденных кроликов и подбор оптимальных условий культивирования клеток, с целью дальнейшей репродукции на них вирусов.

Материалом для выделения клеток служили почки новорожденных кроликов возрастом от 1 до 3 суток. Модифицированным методом дробной трипсинизации была получена первичная культура клеток почек. Культивирование проводили в 24-луночных планшетах при температуре 37⁰С и в атмосфере 5% CO₂.

Через 24 часа культивирования клетки прикреплялись к поверхности лунок и имели преимущественно эпителиоподобную или удлинненно веретенообразную форму. Для подбора оптимальных условий культивирования исследовали пролиферативную активность клеток, при росте на средах: МЕМ, ГЛА, 199, и их комбинациях: МЕМ/ГЛА, МЕМ/199, ГЛА/199 (1:1), а так же при добавлении различных концентраций сывороток крови. Прирост клеток наблюдали на всех исследуемых средах, однако индекс пролиферации (ИП) зависел от состава среды. В ходе работы установлено, что через 72 часа наибольшее значение (ИП) наблюдалось при культивировании клеток на среде МЕМ и соответствовало 0,3±0,15. На 6-е сутки культивирования максимальный ИП был несколько ниже, наблюдался при росте на комбинациях сред МЕМ/ГЛА (1:1) и соответствовал 0,26±0,08. При внесении разных концентраций сывороток крови крупного рогатого скота и фетальной сыворотки максимальный рост отмечался на 3, 6 сутки культивирования на среде с добавлением 5-15% фетальной сыворотки. Формирование полноценного монослоя наблюдалось через 6-7 суток в лунках с добавлением фетальной сыворотки, в вариантах с сывороткой крупного рогатого скота конфлюэнтный монослой формировался на 9-10 день.

Таким образом, в ходе проделанной работы была подобрана оптимальная среда для культивирования первично-трипсинизированной культуры клеток почек новорожденных кроликов.

Исследование воздействия длительного приёма митохондриально-направленного производного пластохинона на репаративные процессы в полнослойной кожной ране у старых мышей F1(CBAxС57Bl/6)

Демьяненко Илья Александрович

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

ilya871@rambler.ru

Снижение репаративных способностей тканей с возрастом является одним из показателей, характеризующих процесс старения организма млекопитающих. Кроме того, возрастные нарушения репаративной регенерации способствуют развитию длительно незаживающих ран, возникающих вследствие ряда старческих патологий. Чрезвычайно перспективными применительно к возможному приложению в области клинической геронтологии являются исследования митохондриально-направленных антиоксидантов, оказывающих выраженное геропротекторное действие в различных моделях. В данной работе исследовано воздействие длительного приёма митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 [10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония] на процесс заживления полнослойных кожных ран у старых мышей. Эксперимент проведён на старых (24 мес) самках мышей гибридов F1(CBAxС57Bl/6), получавших SkQ1 с питьевой водой (100 нМ/кг веса в сут) с 16-и месячного возраста и до окончания эксперимента. Животным под наркозом наносили резаную полнослойную кожную рану на спине в межлопаточной области. Для анализа заживления ран проводили макроскопическое (измерение площади ран на фотоизображениях), гистологическое и иммуногистохимическое исследования. Показано, что SkQ1 при длительном (8 мес) приёме с питьевой водой вызывал достоверное ускорение сокращения площади ран на ранних сроках заживления, увеличивал среднюю толщину грануляционной ткани, снижал нейтрофильную инфильтрацию области повреждения, увеличивал объёмную плотность сосудов в грануляциях, ускорял эпителизацию ран и снижал «клеточность» рубца. Результаты проведенного эксперимента свидетельствуют об эффективной коррекции репаративных процессов в модели заживления полнослойных кожных ран у старых мышей. Полученные данные указывают на важную роль АФК митохондриального происхождения в развитии возрастных нарушений репаративной регенерации тканей и свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований геропротекторных и репаративных свойств митохондриально-направленных антиоксидантов.

Работа поддержана РФФИ (грант 11-04-12050-офи-м-2011).

Особенности когезии в различных фракциях хроматина

Дианова Варвара Дмитриевна^{1,2}, Жиронкина Оксана Андреевна^{1,2}, Стрелкова Ольга Сергеевна^{2,3}

*1 - Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва,
temchromatinlab@gmail.com*

2- НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ, Россия, Москва;

3 – Медицинский факультет РУДН, Россия, Москва

Для безошибочного распределения генетического материала в дочерние клетки в процессе клеточного деления, сестринские хроматиды удерживаются вместе до начала анафазного расхождения особым мультисубъединичным комплексом – когезином. Очевидно, что когезия хроматид создает топологические проблемы для корректной сегрегации и индивидуальной компактизации хроматид в митозе. Более того, существуют различные фракции хроматина — эухроматин и гетерохроматин, отличающиеся по структуре, времени репликации, динамике митотической компактизации, что отражается на локальных особенностях когезии и ее снятия, которые остаются невыясненными.

Мы исследовали распределение когезинов в различных фракциях хроматина на световом и электронномикроскопическом уровне методами иммуноцитохимии. Визуализацию эу- и гетерохроматина осуществляли при помощи репликативного мечения в ранней или поздней S-

фазе. Также использовали линию CHO AO3, несущую искусственный гетерохроматический хромосомный локус, меченый *in vivo* с использованием системы LacO/Lac-репрессор-GFP.

Анализ колокализации субъединиц когезинового комплекса Smc3 и Scc1 с хроматином в культуре клеток HeLa показывает, что они связаны с хроматином неравномерно: основная часть колокализуется с ранореплицирующимся, диффузным эухроматином, незначительная фракция когезинов связана с поздне-реплицирующимся гетерохроматином. Значительных различий между содержанием когезинов и их распределением в G1 (когда отсутствуют сестринские хроматиды) и G2 фазах (после репликации ДНК) не наблюдалось, что может быть связано с выполнением когезинами дополнительных функций. В клетках CHO AO3 субъединицы Smc3 ассоциированы с искусственным гетерохроматическим локусом только в момент его репликации и в профазе митоза. По-видимому, сближение сестринских хроматид в таких локусах может обеспечиваться самим фактом конденсации в структуры высшего порядка лишь локально сегрегированных сестринских хроматид. Когезины также участвуют в репарации двухцепочечных разрывов ДНК, локально усиливая когезию как в эухроматических, так и в гетерохроматических областях, что видно по их накоплению в зонах репарации, маркированных гистоном гамма-H2AX. Эффективная репарация разрывов в гетерохроматине требует временной деконденсации, поэтому когезин-опосредованная связь сестринских хроматид в зонах разрывов восстанавливается. По устоявшимся представлениям гетерохроматин сохраняет высококонденсированное состояние при переходе от интерфазы к митозу. Наши данные позволяют предположить, что для независимой компактизации хроматид в профазе гетерохроматические локусы должны временно деконденсироваться.

Морфометрический анализ кардиомиоцитов перепела в процессе старения

Духинова Марина Сергеевна

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический

факультет, Россия, Москва

marina_dukhinova@mail.ru

Процессы старения птиц по сравнению с таковыми у млекопитающих изучены гораздо менее подробно, однако в отдельных случаях органы птиц являются более подходящими моделями для изучения возрастных изменений, характерных для человека. Одним из наиболее ярких примеров является сетчатка японского перепела, сходная с человеческой по особенностям строения, метаболизма и процессам старения. В связи с этим изучение других органов данного объекта, в особенности сердца, нарушение функционирования которого является распространённой причиной развития заболеваний у пожилых людей, представляет особый интерес.

Японские перепела, *Coturnix japonica*, – птицы, для которых характерно быстрое естественное старение. Миокард левого желудочка выделяли в лаборатории физико-химических основ рецепции Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН. Измерения проводились на животных возрастом 8 и 47 недель, содержащихся в одинаковых условиях.

Исследование осуществлялось с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (фиксация 4 % глутаральдегидом, заливка в эпон) и световой микроскопии (фиксация смесью Буэна, заливка в гистамикс, окраска срезов гематоксилин-эозином). Измеряли диаметр кардиомиоцитов (КМЦ) в ядерной области (на световом уровне) и удельную плотность миофибрилл и митохондрий (на электронно-микроскопическом уровне) с помощью программы Image J. Обработка полученных данных велась с использованием программы Statistica (непараметрический U-тест Манна-Уитни ($p > 0,05$)).

Диаметр КМЦ не меняется достоверно в данных возрастных группах. Сравнение ультраструктуры КМЦ птиц также не выявило различий в удельной площади митохондрий в зависимости от исследуемого возраста. Удельная плотность миофибрилл уменьшается на 10,7% в период от 8 до 47 недель ($p = 0,041$). Две возможные причины этого явления – дегенерация миофибрилл или увеличение объёма клеток. В единичных КМЦ птиц 47-недельного возраста встречались липофусциновые гранулы, тогда как в сетчатке этих же птиц наблюдается большое

количество этих гранул. В КМЦ старых птиц миофибриллы более тонкие и могут быть неправильно ориентированными. Митохондрии гетерогенны, а некоторые - с дезорганизованными кристами. Итак, не было установлено резко выраженных изменений в КМЦ японского перепела возрастом 8 и 47 недель.

Особенности взаимодействия реплицирующегося хроматина с ядерной оболочкой

Жиронкина Оксана Андреевна^{1,2}, Дианова Варвара Дмитриевна^{1,2}, Стрелкова Ольга Сергеевна^{2,3}

*1 - Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва,
temchromatinlab@gmail.com*

2- НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ, Россия, Москва;

3 – Медицинский факультет РУДН, Россия, Москва

Хроматин млекопитающих связан с ядерной оболочкой посредством сотен отдельных протяженных ламина-ассоциированных доменов, доля взаимодействующего с ламинной хроматина достигает 35-40% генома. Известно, что периферический хроматин прочно прикреплен к ламине. Поиск ответа на вопрос о том, каким образом решается пространственная проблема репликации прочно связанного с ламинной хроматина, очень важен не только для понимания физиологии гетерохроматина, но и для выяснения пространственной организации репликации ДНК в клетке.

Объектом исследования служили клетки культуры HeLa. Мечение реплицирующегося хроматина производили в течение 15 мин этинилдезоксисуридином, для визуализации метки методами флуоресцентной и электронной микроскопии использовали click-реакцию с азидопроизводными флуорохрома Alexa-488, последующей иммуноцитологической детекцией Alexa-488 в качестве антигена при стабилизации нативной структуры хроматина.

Исследование особенностей структурной организации периферического хроматина в процессе репликации показало, что в реплицирующихся доменах метка распределяется неравномерно, преимущественно располагаясь на их поверхности. При этом наблюдается два типа реплицирующихся структур. Если репликация происходила со стороны ламины, хроматин локально откреплялся от ядерной оболочки. Если репликация протекала со стороны, обращенной к центру ядра, открепления от ядерной оболочки не наблюдалось. Репликация гетерохроматина не сопровождалась глобальной деконденсацией хроматиновых фибрилл высшего порядка, наблюдается лишь частичное снижение плотности хроматина непосредственно в зоне расположения метки.

Различие в поведении прикрепленного хроматина при репликации может отражать как разные функциональные состояния хроматина, так и особенности организации подстилающей его ядерной оболочки. Возможно и наличие различий в репликации конститутивного и факультативного гетерохроматина. Распределение метки по поверхности хроматиды позволяет предположить, что репликация идет по поверхности компактизованной хроматиновой фибриллы; это объясняет необходимость ее локального открепления и отсутствие пространственных затруднений для доступа факторов репликации. Однако, нельзя исключить, что распределение метки по поверхности вызвано низкой доступностью антигена внутри компактизованной хроматиды и не отражает полной картины репликации.

Гепатоциты миноги как эволюционная модель для изучения механизмов гибели клеток

Коновалова Светлана Александровна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,

Россия, Санкт-Петербург

svetakonovalova@gmail.com

Нарушение процессов регуляции программируемой гибели клеток сопровождается множеством заболеваний печени (гепатит, печеночная недостаточность, цирроз, онкология).

Гепатоциты миноги (*Lampetra fluviatilis* L.) представляют собой уникальную эволюционную модель для изучения механизмов гибели клеток.

Суспензию гепатоцитов получали коллагеназным методом. Для определения соотношения живых и апоптотических клеток использовали метод последовательного окрашивания клеток акридиновым оранжевым и пропидиум йодидом. Выход цитохрома с из митохондрий определяли методом иммуноблоттинга. Активность каспаз (3, 7, 9) и катеписина Б в гепатоцитах миноги оценивали на конфокальном микроскопе с помощью наборов FLICA и Magic Red, соответственно.

В поздний весенний период, непосредственно перед нерестом, доля апоптотических гепатоцитов в суспензии возрастает (более 80% клеток при окрашивании акридиновым оранжевым и пропидиум йодидом имеют ярко-оранжевые лизосомы, сосредоточенные вокруг ядра). Цитозольная фракция гепатоцитов в зимний период практически не содержит цитохром с, тогда как в весенний период в цитозоле четко выявляется его наличие. Кроме того, в весенний период в гепатоцитах миноги активируются как протеолитические ферменты митохондриального пути апоптоза (каспазы 3, 7 и 9), так и лизосомальный фермент, один из маркеров аутофагии (катеписин Б).

Таким образом, в гепатоцитах миноги в весенний период активируется два пути гибели клеток: митохондриальный и лизосомальный, что может указывать на взаимодействие этих путей программируемой клеточной смерти. В настоящее время созданы лишь гипотетические схемы сигнальных путей лизосомальных протеаз, регулирующих апоптогенные факторы.

Роль протеинкиназы LOSK в centrosомной локализации PCM-1

Рябкова Екатерина Николаевна

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

ryabkova_ekaterina@mail.ru

Система микротрубочек в большинстве клеток имеет радиальное строение, что обеспечивает направленность внутриклеточного транспорта. Организация микротрубочек регулируется протеинкиназой LOSK – ее ингибирование приводит к хаотизации микротрубочек, а также к истощению centrosомного пула динактина, который, как было показано ранее, также необходим для поддержания радиальности. Основной функцией динактина считается транспортная: он обеспечивает связь моторного белка динеина с перевозимым грузом, а также может самостоятельно взаимодействовать с микротрубочками. Известно, что одна из субъединиц динактина – p150 – подвергается регуляторному фосфорилированию киназой LOSK. Фосфорилирование динактина нужно для его непосредственного участия в удержании микротрубочек или для доставки на centrosому других необходимых для закрепления микротрубочек белков.

В ходе работы было проверено, изменяется ли при ингибировании данной киназы локализация PCM-1, который считается основным скэффолдом для centrosомных белков, и сам доставляется на centrosому динактином. Для ингибирования киназы LOSK использовали трансфекцию клеток Vero (эпителий почки зеленой мартышки) доминантно-негативным мутантом, слитым с флуоресцентным белком, а за локализацией PCM-1 наблюдали по иммунофлуоресцентному окрашиванию антителами. Эксперименты показали, что в клетках с заингибированной киназой PCM-1 уходит с centrosомы. Чтобы установить, связан ли наблюдаемый эффект с фосфорилированием динактина, провели трансфекцию клеток одновременно двумя конструктами, слитыми с разными флуоресцентными белками: доминантно-негативным мутантом LOSK и мутантом p150, имитирующим фосфорилированное состояние, и наблюдали за локализацией PCM-1. Обнаружили, что уход PCM-1 с centrosомы не связан с фосфорилированием p150.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что протеинкиназа LOSK влияет на centrosомную локализацию PCM-1, но действует она не через фосфорилирование динактина, а специфическим образом.

Влияние фотооблучения на сетчатку японского перепела *Coturnix japonica*

Серезжникова Наталья Борисовна

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,

биологический факультет, Россия, Москва

natalia.serj@yandex.ru

Известно, что свет, являясь носителем зрительной информации, одновременно выступает и как фактор риска развития в сетчатке глаза дегенеративных изменений. Фотоповреждение затрагивает, прежде всего, клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и фоторецепторы. Данный процесс может приводить к значительному снижению и даже потере зрения, поэтому его изучение имеет важное практическое значение. В последнее время хорошей моделью для подобных исследований считается японский перепел (*Coturnix japonica*), что объясняется значительным морфологическим сходством его сетчатки с сетчаткой человека, похожим оксикаротиноидным обменом и коротким периодом старения.

В данной работе с помощью световой, электронной микроскопии и морфометрического анализа изучены структурные изменения сетчатки глаз самок японского перепела в возрасте 24 недели при воздействии синего света (длина волны 440-460 нм, длительность облучения — 40 мин, доза облучения — 3 Дж). Проведенное нами на светооптическом уровне морфологическое и морфометрическое исследование сетчатки перепелов показало, что у птиц в возрасте 24 недели облучение приводит к увеличению на 17,6% толщины всего слоя РПЭ, в том числе высоты его ядросодержащего слоя на 30,8% и апикальных отростков на 13,4%. Толщина фотосенсорного слоя сетчатки увеличилась на 10,7%, вместе с тем толщина всей сетчатки не изменилась. На ультрамикроскопическом уровне в клетках РПЭ после облучения проявляются следующие изменения: накопление липофусциновых гранул, встречаются необычные по форме митохондрии, имеющие на срезах вид колец или изогнутых гантелей. Толщина мембраны Бруха не меняется. В фоторецепторных клетках после облучения отмечается набухание многих митохондрий, иногда наблюдаются ядра неправильной формы. Таким образом, у молодых птиц возрастом 24 недели фотооблучение вызывает выраженные изменения в слое РПЭ и в фоторецепторных клетках, отмечаемые как на светооптическом, так и на электронно-микроскопическом уровне. Они затрагивают в основном митохондрию и, возможно, являются проявлением адаптивно-компенсаторных клеточных реакций в связи с нарушением метаболизма РПЭ и фоторецепторов при избыточном воздействии света.

Особенности репликации хроматина в клетках эукариот

Стрелкова Ольга Сергеевна^{1,2}, Жиронкина Оксана Андреевна^{2,3}, Дианова Варвара Дмитриевна^{2,3}

1 - Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Российский университет дружбы народов, Россия, Москва

olgastrelkova@gmail.com

2 - Отдел электронной микроскопии, НИИ физ.-хим. биологии им.А.Н.Белозерского, Россия, Москва

3 - Кафедра клеточной биологии и гистологии, Биологический факультет, Россия, Москва

Репликация ДНК является одним из самых сложных и неотъемлемых биологических процессов в жизни пролиферирующей клетки. Известно, что в ходе удвоения генетического материала возникают топологические проблемы, связанные с тем, что репликация осуществляется в весьма ограниченном пространстве и использует в качестве субстрата сложный по составу и высоко структурированный хроматин. Целью нашей работы было визуализировать репликативные события на ультраструктурном уровне с максимальным сохранением интактной структуры хроматина.

Для оценки пространственной организации хроматина мы исследовали его структуру на различных стадиях репликации на электронномикроскопическом уровне, используя в качестве маркера белок GFP-PCNA. Для изучения поведения пострепликативного хроматина мы проводили метаболическое мечение ДНК этинилдезоксисуридином, фиксировали клетки через

разные промежутки времени и визуализовали сайты репликации с помощью click-реакции и иммуноэлектронной микроскопии.

Полученные результаты показали, что репликативные сайты представляют собой меченые сегменты хроматиновых фибрилл высшего порядка диаметром около 200-300 нм. При этом метка распределяется преимущественно по периферии этих хроматиновых доменов. Такой характер мечения позволяет рассмотреть внутреннюю структуру репликативных сайтов. При прохождении ультратонкого среза через центральную зону сайта хорошо видно, что хроматин в его составе обладает меньшей электронной плотностью по сравнению с окружающим немеченым хроматином. В экспериментах с отложенной меткой мы смогли проанализировать структуру хроматина после завершения синтеза ДНК на светооптическом и ультраструктурном уровне. Пострепликативная структура хроматина отличается от наблюдаемой в момент репликации. Мы видим изменения в плотности меченых сегментов по сравнению с их организацией в момент репликации. При этом реконденсация начинается уже через 30 минут после мечения.

Наши данные не подтверждают распространенную гипотезу декомпактизации хроматина, постулирующую полное разрушение высших уровней его упаковки для начала репликации. Мы не видим ни глубокой деконденсации, ни протяженных нуклеосомных фибрилл в зоне репликации. Это может быть связано с тем, что репликация доменов высшего порядка, вероятно, проходит без их полной деконденсации. Наблюдения за пострепликативной структурой хроматина показали, что восстановление высокой плотности упаковки фибрилл хроматина происходит сразу после окончания репликации.

Механизм действия жасмоновой кислоты на клетки культуры эпидермоидной карциномы человека A431

Фомичева Мария Григорьевна

Московский государственный Университет имени Ломоносова, биологический факультет,

Россия, Москва

alkonostic@yandex.ru

Жасмоновая кислота - растительный гормон, участвующий в ответе растений на повреждение или внедрение патогена, который, помимо этого, оказывает физиологическое действие на клетки животных. Например, жасмоновая кислота может селективно подавлять пролиферацию трансформированных клеток, вызывать их гибель по митохондриальному пути и др. Целью исследования было изучение механизма действия жасмоновой кислоты на культивируемые клетки эпидермоидной карциномы человека A431. Для этого были использованы: МТТ-тест, иммуноцитохимическое окрашивание, окраска клеток гематоксилином и эозином, цитохимическое окрашивание и прижизненное наблюдение клеток, конфокальная и электронная микроскопия.

Было показано, что после инкубации клеток в течение 24 часов с жасмоновой кислотой в концентрации 2 и 5 мМ происходит снижение выживаемости клеток, при этом наблюдается повышение апоптотического индекса (соответственно на 49,6% и 91,7%) и снижение митотического индекса (на 24,2% и 77,8%). Было зарегистрировано увеличение доли клеток, положительных на каспазу 3 (на 15,5% и 76,2%), что указывает на то, что клетки гибнут по механизму апоптоза. Однако при этом было установлено, что выхода цитохрома С из митохондрий не происходит, и гибель клеток не сопровождается повышением содержания активных форм кислорода. Эти данные свидетельствуют о том, что апоптоз идет не по митохондриальному пути. Механизм апоптоза может быть обусловлен стрессом вакуолярной системы, на что указывают изменения морфологии комплекса Гольджи, выражающиеся в набухании цистерн.

Полученные результаты показывают, что жасмоновая кислота подавляет пролиферацию клеток культуры A431 и вызывает их гибель. Наблюдаемый тип клеточной гибели – апоптоз, который, по-видимому, происходит по механизму, в котором не задействованы митохондрии, и таким механизмом может быть стресс вакуолярной системы.

Исследование активации моноцитов/макрофагов периферической крови человека под действием TNF α и IL-4 *in vitro*

Челомбитько Мария Александровна

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва
atma69@yandex.ru*

Моноциты, являющиеся предшественниками макрофагов (МФ), под влиянием IFN γ , TNF α и LPS претерпевают классическую активацию и дифференцируются в провоспалительные МФ I типа (M1), а под влиянием IL-4 и других факторов подвергаются альтернативной активации и дифференцируются в противовоспалительные МФ II типа (M2). Нарушение баланса между этими двумя субпопуляциями наблюдается при многих патологических состояниях. Выявление специфических маркеров M1 и M2, а также изучение возможности переключения активационного статуса МФ с M1 на M2 и наоборот под влиянием цитокинов открывает перспективы разработки новой стратегии в терапии хронического воспаления, опухолей и аутоиммунных заболеваний.

Выделенные с помощью метода иммуномагнитной сепарации CD14⁺-клетки культивировали в среде Ex-vivo15 с добавлением TNF α и IL-4. На 4-е и 7-е сут проводили оценку жизнеспособности МФ с помощью МТТ-теста. На 5-е и 14-е сут проводили иммуноферментный анализ сред культивирования на наличие хемокинов CCL3 (маркер M1), CCL18 (маркер M2).

Результаты оценки влияния исследованных цитокинов на жизнеспособность МФ свидетельствуют о том, что воздействие TNF α и IL-4 снижает продолжительность жизни МФ по сравнению с контрольными, культивированными без цитокинов. Возможно, что в МФ, активированных цитокинами, активируется метаболизм и пролиферативная активность, что сопровождается уменьшением продолжительности жизни МФ.

Имуноферментный анализ сред культивирования показал, что IL-4 ингибировал выработку провоспалительного хемокина CCL3, поскольку его концентрация в среде культивирования на 5-е сут составила 1400 пг/мл – т.е. ниже, чем в среде без цитокинов (3600 пг/мл). В то время как TNF α стимулировал выработку CCL3, так как его концентрация в среде на 5-е сут повышалась до 6000 пг/мл. Экспрессию противовоспалительного хемокина CCL18 вызывал только IL-4, повышая его концентрацию к 5-м сут до 150, а к 14-м – до 5500 пг/мл. По-видимому, для реализации активационной программы действия IL-4 требуется длительное время, что согласуется с литературными данными.

Ультраструктурные изменения скелетномышечной ткани при нарушениях риаудиновых рецепторов

Шаталов Петр Алексеевич, Виноградская Ирина Сергеевна

*Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава России, Москва,
Талдомская, 2, 4834001
shatalov.peter@gmail.com*

*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова
Минздрава России, Москва
irina_www@mail.ru*

В последние годы в медицине активно развивается изучение патогенеза многих наследственных болезней человека, среди которых особое место занимают врожденные «структурные миопатии». Среди этих, в целом редких, заболеваний первое место по частоте занимает врожденная миопатия «центрального стержня». В основе ее патогенеза лежат ультраструктурные изменения в центральных зонах скелетномышечных волокон, связанные с наследственными нарушениями риаудиновых рецепторов.

Было обследовано 16 больных в возрасте от 1 до 45 лет с болезнью центрального стержня. Электронномикроскопическое исследование выявило: атрофию, дезорганизацию и

расщепление пучков микрофиламентов, уплотнение и дезорганизацию триад, гипертрофию, вакуолизацию и деструкцию митохондрий. Было установлено, что у пациентов встречаются различные сочетания данных признаков в разных участках мышечных волокон. Центральные и периферические зоны мышечных волокон существенно различались по ультраструктурным характеристикам. В центральных участках чаще отмечалась атрофия пучков миофибрилл, стриминг Z-полосок, гипертрофия митохондрий, отложение липидных включений (особенно на границе между зоной стержня и периферической зоной), появление везикулярных структур неясного происхождения, а так же пространств, свободных от органелл и заполненных мелко гранулированным материалом. В периферических зонах при этом отмечались относительно сохраненные пучки миофибрилл с типичными зонами саркомеров. Под сарколеммой часто находились повышенные количества мало измененных митохондрий. Так как указанные изменения могут одновременно присутствовать у одного больного, они представляют собой не разные формы заболевания, а стадии одного патоморфоза. Дефект рианодиновых рецепторов приводит к излишнему выходу Ca^{2+} из саркоплазматических цистерн. Мы полагаем, что повышенное количество митохондрий на периферии мышечного волокна за счет утилизации Ca^{2+} обеспечивает большую сохранность, характеризующую эти участки.

Данная работа проводится в рамках Гранта Президента РФ МК-4236.2011.7