

ПОДСЕКЦИЯ «КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГИСТОЛОГИЯ»

Устные доклады

Цитофизиология структур лактогематического барьера крольчих в первый час после родов при стимулировании молочной продуктивности препаратами селена

Анипко Вадим Владимирович

*Московский государственный областной университет, биолого-химический факультет,
Москва, Россия, Anipko86@rambler.ru*

В репродуктивном цикле регулирующие лактогенез половые гормоны выполняют важную роль в развитии физиологической адаптации организма самки к вскармливанию детенышей, участвуют в синтезе компонентов молозива → молока.

Нами изучена взаимосвязь клеточных и тканевых структур лактогематического барьера молочной железы крольчих с динамикой концентрации половых гормонов и IgG в сыворотке крови в течение первого часа после родов в норме и при влиянии препаратов «Е-селен» и «Селенолин®».

Для постановки экспериментальной части работы сформировали контрольную и две опытные группы (животным первой опытной группы вводили препарат «Е-селен», второй - «Селенолин®»). Цитологическое исследование ультратонких срезов производили на электронном микроскопе JEM – 7A (Япония), исследование концентрации иммуноглобулина G (Ig G) в пробах сыворотки крови и молозива, половых гормонов (пролактина (Прл), прогестерона (Прг), фолликулостимулирующего (ФСГ), лютеинизирующего (Лг), эстрадиола (Е-2)) проводили методом ИФА с использованием стандартных наборов реагентов на спектрофотометре Multiscan Labsystems (Финляндия).

В молочной железе крольчих всех трех групп на фоне достоверной динамики гормонов увеличивались диаметр сосудов обменного звена микроциркуляторного русла, площадь железистых долек, число нервных волокон и их окончаний.

В строме органа отмечалась тенденция к уменьшению жировой ткани, многочисленные капилляры обеспечивали значительное увеличение артериального притока крови к железистым долькам и альвеолам органа, активизацию секреторного цикла в лактоцитах и наполнение молозивом полостей большинства альвеол.

В ядре и цитоплазме лактоцитов отмечен активный синтез компонентов секрета. Регулируемое гормонами сокращение миоэпителиоцитов, оплетающих лактоциты альвеол, способствует выведению секрета во внутридольковый проток. Во внутридольковых трабекулах отмечается незначительное количество деградирующих адипоцитов и ядер фиброцитов.

Сравнивая структуры лактогематического барьера молочной железы крольчих, на фоне применения препаратов селена отмечалась тенденция к их увеличению. А именно: диаметр капилляра, объем ядра и самого лактоцита в железе крольчих первой опытной группы, соответственно, в 1,1, 1,03, 1,1 раза, второй – в 1,2, 1,04, 3,4 раза был больше таковых показателей у крольчих контрольной группы.

В первый час после окрола процент выхода IgG из крови в молозиво составил 78% в контрольной группе, 84% - в первой и 84,3% во второй опытных группах. Концентрация иммуноглобулина в сыворотках крови и молозива у крольчих первой опытной группы, соответственно, была выше контрольного показателя на 15,2% и 24,3%, а во второй опытной группе – на 17% и 26,7%.

Проведенное исследование показало, что в первый час после окрола регистрируемая взаимосвязь половых гормонов со структурами гематотканевого барьера обуславливала высокую вариабельность диаметра сосудов обменного звена за счет интенсивного притока крови, активизацию в лактоцитах цитоплазматического синтеза и секреции, а также, что немаловажно, лабильность структур цито- барьера и его высокую проницаемость, в том числе и для IgG.

Морфометрический анализ характеристик митохондрий в скелетномышечной ткани больных детей врожденной миопатии центрального стержня

Виноградская Ирина Сергеевна

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития, Россия, Москва, Irina_www@mail.ru

Среди большого количества исследованных болезней человека одной из наиболее распространенных групп являются нервно-мышечные болезни, среди которых особое место занимает врожденная миопатия центрального стержня. При патологии мышечной ткани возрастают энергетические запросы, которые требуют увеличения размеров всего митохондриома мышечного волокна. Это может быть достигнуто тремя путями: увеличением числа митохондрий (пролиферация), увеличением размеров митохондрий (гипертрофия) и одновременно, как за счет пролиферации, так и за счет гипертрофии. В связи с этим необходим тщательный анализ морфометрических характеристик митохондрий в скелетномышечной ткани этих больных на ультраструктурном уровне.

Проанализированы биоптаты поперечнополосатой мышечной ткани у 21 больного с врожденной миопатией центрального стержня в возрасте от 4 до 22 лет с помощью методов световой и электронной микроскопии.

При врожденной миопатии центрального стержня явное предпочтение отдается второму механизму – гипертрофии митохондрий. Об этом ясно свидетельствует высокая степень положительной корреляции между удельным объемом митохондрий и их размерами (с площадью $R=0,61$; достоверность $p<0,05$, с периметром $R=0,60$; достоверность $p<0,05$), а также отсутствие корреляционной зависимости между удельным объемом митохондрий и их относительным количеством в мышечном волокне. Кроме того, увеличение размеров органелл сопровождается их удлинением, более крупные митохондрии имеют вытянутую, эллипсоидную форму. Об этом ясно свидетельствует положительная корреляция между формой «эллипс» и размерами этих органелл (с площадью $R=0,98$; достоверность $p<0,05$, с периметром $R=0,97$; достоверность $p<0,05$). Стоит отметить, что со степенью тяжести заболевания достоверно отрицательно коррелируют удельный объем, относительное количество и форма «эллипс» субсарколеммальных митохондрий ($R= -0,86$; достоверность $p<0,05$, соответственно). Также выявлены корреляции с биохимическими показателями в крови пациентов.

Таким образом, можно предположить, что в качестве ведущего компенсаторного механизма используется гипертрофия с формированием вытянутых форм митохондрий в мышечной ткани при нервно-мышечном «немитохондриальном» заболевании – миопатии центрального стержня. Повышенное скопление под сарколеммой эллипсоидных органелл наиболее эффективно приводит к снижению степени тяжести заболевания.

Гистохимическая характеристика популяции тучных клеток лимфатических узлов мышцы

Гусельникова Валерия Владимировна

Санкт-Петербургский Государственный университет, Россия, г. С.-Петербург, Guselnicova.Valeriia@yandex.ru

Несмотря на многолетние исследования тучных клеток (ТК), многие вопросы, связанные с их происхождением и развитием, продолжают оставаться открытыми. Целью данного исследования стало гистохимическое изучение ТК лимфатических узлов мышцы. В работе использовано 10 самцов мышей линии СВА возрастом 1,5-2 месяца. Поднижнечелюстные лимфатические узлы фиксировали в смеси СФУ или жидкости Карнуа, и после стандартной

гистологической проводки заливали в парафин. Срезы окрашивали раствором толуидинового синего или альцианового синего–сафранина с докраской ядер гематоксилином Майера. В рамках данного исследования в лимфатических узлах мыши была описана многочисленная популяция ТК. ТК были локализованы преимущественно в пределах синусов лимфатического узла и крайне редко выявлялись в составе лимфоидной ткани коркового и мозгового вещества. Обнаруженные ТК характеризовались округлой, реже – вытянутой формой и размерами 10-25 мкм. Некоторые ТК демонстрировали признаки частичной дегрануляции. Используемая методика двойного окрашивания ТК альциановым синим–сафранином позволила одновременно выявить в лимфатических узлах мыши четыре стадии созревания ТК, различающихся по степени сульфатированности гепарина в составе их гранул. ТК стадии I характеризовались наличием гранул, окрашенных в синий цвет вследствие сродства их компонентов исключительно к альциановому синему (Alc+ гранулы). Среди гранул ТК стадии II более половины составляли Alc+ гранулы, но присутствовали и окрашенные сафранином в красный цвет Saf+ гранулы. Все ТК стадии III характеризовались преобладанием в цитоплазме Saf+ гранул и содержали единичные Alc+ гранулы. ТК стадии IV содержали в цитоплазме исключительно Saf+ гранулы. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что в лимфатических узлах мыши в норме идет процесс массового созревания ТК, что, в свою очередь, ставит вопрос о природе клеток-предшественников ТК. Полученные результаты могут, таким образом, иметь важное значение в рамках обсуждения проблемы происхождения ТК, особенно учитывая факт существования лимфоидной гипотезы происхождения ТК, согласно которой предшественниками ТК могут служить лимфоциты.

Автор выражает благодарность научному руководителю, доктору биологических наук, профессору А.В. Полевщикову.

Работа поддержана грантами СПбГУ № 1.38.80.2012 и ДВО РАН № 12-1-П7-05.

Динамика микротрубочек в различных областях фибробласта

Зворыкина Екатерина Игоревна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет Россия, Москва

Микротрубочки (МТ) являются важным компонентом цитоскелета клеток. Однако их динамика и пространственная организация исследованы далеко не полностью. В частности, актуальным является вопрос о локальной регуляции динамики МТ в разных частях клетки. В связи с этим в рамках данной работы было проведено описание динамического поведения системы МТ в различных областях фибробласта. Растущие концы МТ в клетках линии 3Т3 визуализировались в результате трансфекции клеток плазмидой концевых белков микротрубочек (EB1 и EB3) и тубулином, связанных с флуоресцентной меткой. Были проанализированы скорости и длины периодов роста отдельных МТ с помощью цейтраферной съемки на конфокальном микроскопе. Популяция МТ в клетке была разделена на три группы, в зависимости от места начала их роста в клетке: непосредственно от centrosомы, во внутренней цитоплазме и в дистальной части клетки. Отдельно были проанализированы МТ, достигающие до края клетки.

Для дистальной области значения параметров составили: $s=4,7\pm 2,8$ мкм , $v=14,7\pm 5,7$ мкм/мин. Для centrosомальных МТ - $s=5,6\pm 3,6$ мкм , $v=16\pm 6,6$ мкм/мин. Во внутренней цитоплазме - $s=6,8\pm 2,9$ мкм , $v=20,6\pm 8,2$ мкм/мин. Для групп МТ, достигающих до края клетки, были получены следующие данные: в дистальной области - $s=5,8\pm 3,4$ мкм , $v=14,7\pm 5,7$ мкм/мин, в глубоко лежащей цитоплазме - $s=7,7\pm 4,5$ мкм, $v=16\pm 4,7$ мкм/мин. Микротрубочки, начинающиеся на centrosоме, не достигали до края клетки. Для оценки достоверности

полученных значений сравнивались показатели, полученные в клетках, экспрессирующих различные маркеры.

Скорости роста микротрубочек в рассматриваемых областях клетки достоверно различались между собой ($p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни). Тогда как длина периодов роста сходна в анализируемых группах). Рост МТ в цитоплазме клеток ЗТЗ характеризуется ограниченной процессивностью – средняя длина треков составляет 5-10 мкм, что значительно меньше радиуса клетки. Наибольшая скорость роста характерна для микротрубочек в глуболежащей цитоплазме, на краю клетки скорость снижается.

Работа выполнена в лаборатории клеточной подвижности, зав. И.А. Воробьев, грант РФФИ 13-04-40189-Н с использованием оборудования, поставленного по программе развития МГУ.

Синапсис и мейотическая инактивация хроматина половых хромосом у слепушонки восточной *Ellobius tancrei*

Кашинцева Анна Александровна

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
koly4kina2009@mail.ru*

Известно, что сценарии поведения половых хромосом и особенности инактивации хроматина половых хромосом или процесс MSCI (*Meiotic Inactivation of Sex Chromosomes*) в профазе I мейоза у самцов и самок млекопитающих различны. Детали этих событий определяют дальнейшую судьбу мейоза. Особый интерес в этом отношении представляет слепушонка восточная *Ellobius tancrei*. У самок и самцов этого вида половые (XX) хромосомы изоморфны по G- и C-окраске. Кроме того, этот вид обладает широкой хромосомной изменчивостью с диплоидными числами от $2n = 54 - 32$ при $NF = 56$.

Задачами исследования было описание особенностей синапсиса хромосом и распределения белков, участвующих в MSCI, у самцов и самок гомозиготной формы и у внутривидовых гибридов, гетерозиготных по Робертсоновским транслокациям. Материал для исследования любезно предоставлен д.б.н. И.Ю. Баклушинской (ИБР им.Н.К. Кольцова РАН).

Тотальные препараты распластанных синаптонемных комплексов (СК) получали путем спредирования сперматоцитов и ооцитов на поверхности капли 0,2М сахарозы. Препараты СК многократно иммуноокрашивали «выжигая» свечение флуорохромов, использованных на предыдущих этапах окрашивания (по Матвеевскому С.Н.).

У самцов и самок кариоморфы *E. tancrei* ($2n = 34$) половые хромосомы XX в профазе I мейоза синаптируют различно. У самок XX синаптируют по всей длине. Начиная со стадии пахитены, белки MSCI (BRCA-1; SUMO-1; ATR; gammaH2AX) не выявляются в хроматине XX бивалента и, следовательно, сайленсинг хроматина прекращается.

У самцов гомологичный синапсис с формированием СК происходит только в прителомерных участках XX хромосом, интерстициальная часть половых хромосом остается асинаптированной. Половой бивалент выселяется на периферию ядра и формирует типичное половое тельце. Согласно правилу «синапсис или сайленсинг», инактивация хроматина XX хромосом выявляется до стадии диплотены. Впервые установлено, что различные белки MSCI занимают специфические области в половом биваленте самцов *E. tancrei*. Показано, что структура, которую традиционно считали «ядрышкоподобным тельцем», иммуноокрашивается антителами к SUMO-1, что характерно для хроматина, а не для ядрышка.

SA-β-галактозидаза и гетерохроматиновый маркер HP1-γ при ускоренном старении и высоком риске новообразований в дермальных фибробластах человека

Куранова Мирья Леонидовна

Работа выполнена в Институте цитологии РАН (ИИЦ РАН), Санкт-Петербург, Россия

E-mail: miryakuranova@gmail.com

Известно, что при старении в клеточной популяции увеличивается количество бета галактозидазы (SA-β-галактозидаза), лизосомно ассоциированного фермента, катализирующего реакцию гидролитического отщепления не редуцирующих остатков β-D-галактозы в β - галактозидах. Количество гетерохроматинового маркера HP1-γ, наоборот, уменьшается из-за его важной функции – упаковки молчащих генов в неактивные гетерохроматиновые домены. При повышенном риске трансформации, наоборот, количество HP1-γ резко увеличено, а SA-β-галактозидазы уменьшено.

На пассажах сходного порядка (10-14) нами было изучено количество этих двух маркеров в клеточных линиях от пациентов с заболеванием преждевременного старения атаксия-телангиэктазия (АТ) разных форм тяжести. Из-за крайне слабой способности к пролиферации клеток с клеточной линией пациентки с мутацией 5382insC в гене BRCA1 (BRCA1) работали на более ранних пассажах (2-4). В качестве контроля использовали линию здорового донора (VH-10). Количество SA-β-галактозидазы детектировали при помощи программы ТТЕСТ, приравнивая оптическую плотность маркера к его количеству. Интенсивность флуоресценции HP1-γ (в усл.ед. интенсивности) измеряли в программе ImageJ после непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания клеток.

Результаты измерений показали, что средняя интенсивность флуоресценции HP1-γ наиболее высокой оказалась в клетках линии BRCA1 (в 2,3 раза больше контроля), что характерно для опухолевых клеток и клеток с высоким риском новообразований. Наименьший уровень гетерохроматинового маркера, как и было описано ранее, оказался в клетках линии с более легкой формой АТ (АТ6SP) (в 5,3 раза меньше контроля). В клетках линии наиболее тяжелой формы АТ (АТ8SP) - в 1,9 раз меньше контроля. В линиях мозаичной формы АТ (АТ1SP и АТ1SP) в 1,6 раз меньше.

Наименьшее количество SA-β-галактозидазы, как и полагалось, оказалось в контроле, наибольшее – в клетках линии BRCA1 (в 9,2 раза больше контроля). В линии АТ8SP – в 3,4 раза больше контроля, в клетках АТ6SP в 3,9. В линиях мозаичных форм АТ (АТ1SP и АТ9SP) в 2,9 и 2,2 раза больше, чем в контроле, соответственно.

Полученные данные подтверждают факт предтрансформационного старения клетки.

Работа выполнена при поддержке грата РФФИ №12-06-00189а и гранта Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

Влияние паклитаксела на процесс энтоза в культуре клеток MCF-7

Мамичев Иван Андреевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва, Mamichev-ivan@rambler.ru

Энтоз является одним из вариантов клеточного каннибализма – процесса внедрения одной опухолевой клетки в другую. Поглощенная клетка может не только деградировать в составе каннибалической вакуоли, но и покидать ее через продолжительный промежуток времени. Возможно, энтоз защищает внедрившуюся клетку от воздействия лекарственных препаратов, в частности паклитаксела. Для проверки этой гипотезы было проведено исследование влияния паклитаксела (125 нМ, 24 ч, 48 ч) на процессы энтоза в культуре клеток MCF-7 (карцинома

молочной железы человека). Использовали методы иммуно- и цитохимии и статистической обработки данных.

Воздействие паклитакселем приводит к стабилизации микротрубочек, накоплению К-митозов, клеток с микроядрами и последующей гибели клеток. Статистический анализ показал, что каннибалический индекс практически не меняется на протяжении 48 ч воздействия ($1,2 \pm 0,9$ (24ч), $1,9 \pm 0,6$ (48 ч)). В присутствии паклитаксела и клетка-каннибал и поглощенная клетка могут вступать в К-митоз. В контроле митотический индекс (МИ) среди поглощенных клеток значительно выше (17% (24 ч) и 8,8%(48 ч)), по сравнению с МИ в популяции (2% и 1,6% соответственно), что может быть связано с нарушением прохождения митоза. Воздействие паклитаксела снижает МИ поглощенных клеток до уровня МИ в популяции. МИ среди клеток-каннибалов соответствует МИ в популяции через 24 ч и падает до 0 к 48 ч культивирования. Воздействие паклитаксела не влияет на динамику изменения МИ среди клеток-каннибалов. Изменение доли клеток с микроядрами среди поглощенных клеток (14,7 % (24 ч) и 41 % (48 ч)) соответствует накоплению таких клеток в популяции (15% (24 ч) и 30% (48 ч)), что может отражать внедрение клеток с микроядрами и/или деление поглощенных одноядерных клеток. Среди клеток-каннибалов через 24 ч воздействия увеличивается доля клеток с микроядрами (32 % (24 ч) и 42 % (48 ч)). Возможно, клетки с микроядрами являются более удобной мишенью внедрения.

В целом, воздействие паклитаксела на клетки культуры MCF-7 не препятствует внедрению, поглощению и деградациии клеток. По-видимому, нахождение клетки внутри каннибалической вакуоли не защищает ее от воздействия паклитаксела.

Взаимодействие нормальных и опухолевых клеток эпителиального происхождения при сокультивировании: гетеротипический клеточный каннибализм *in vitro*

Милованова Надежда Викторовна, Гаранина Анастасия Сергеевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, milovanova.nv@gmail.com

В 1952 г. в научной литературе впервые отмечено явление, при котором живая клетка гемопоэтического происхождения внедряется в опухолевую клетку с образованием картин «клетка-в-клетке». Данный процесс подробно описан Хамблом с коллегами в 1956 г. и назван «эмпериполез», или гетеротипический клеточный каннибализм (КК). В 2007 г. Оверхольцер с коллегами описали гомотипический КК, энтоз, при котором взаимодействуют клетки одной линии. Сейчас энтоз довольно широко изучен, однако гетеротипический КК между клетками не гемопоэтического происхождения практически не описан. Исходя из этого, целью нашей работы явилось, во-первых, исследование возможности гетеротипического КК при сокультивировании нормальных и опухолевых клеток эпителиального происхождения, и, во-вторых, анализ судьбы внедрившейся клетки внутри клетки-каннибала при гетеротипическом КК. Работу проводили на клетках линий А431 (эпидермоидная карцинома человека), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека) и HaCaT (нормальные кератиноциты человека). Использовали методы световой и флуоресцентной микроскопии, сканирующей (СЭМ) и трансмиссионной электронной микроскопии, прижизненного наблюдения и маркирования клеток. Структуры «клетка-в-клетке» обнаружены в каждой из исследуемых культур. С помощью СЭМ мы доказали локализацию внедренной клетки внутри клетки-каннибала при гомотипическом КК для каждой клеточной линии. Затем мы сокультивировали HaCaT с эпителиальными опухолевыми клетками (А431; MCF-7), а также клетки двух опухолевых линий (MCF-7 и А431). Одну из популяций метили в течение 2 сут бромдезоксипридином (BrdU). В первом варианте сокультивирования меченые и немеченые клетки сливали в

суспензионном состоянии. Во втором — к клеткам, прикрепленным к субстрату, добавляли клетки из суспензии. При сокультивировании нормальных и опухолевых клеток мы обнаружили случаи как гомо-, так и гетеротипического КК. Для гетеротипического КК также доказано, что внедренная клетка находится внутри клетки-каннибала. Сокультивирование опухолевых клеток, полученных из эпителиев разных органов, также сопровождается гомо- и гетеротипическим КК, причём гомотипический КК преобладает над гетеротипическим при каждом варианте сокультивирования. При сокультивировании HaCaT с опухолевыми клетками (A431 и MCF-7) наблюдается увеличение каннибалической активности HaCaT. Кроме того, при добавлении клеток A431 в суспензионном состоянии к клеткам HaCaT на субстрате не происходит внедрения HaCaT в клетки A431, в отличие от похожего эксперимента с клетками MCF-7. Возможно, в опухолевых клетках ингибированы процессы узнавания и внедрения в них нормальных клеток того же типа. Также нами показано, что деградация внедрившейся клетки в ходе как гомо-, так и гетеротипического КК идет за счет активации кислого везикулярного компартмента в обеих клетках-участницах. В ходе работы нами впервые доказана возможность гетеротипического КК между клетками эпителиального происхождения разных линий. Также установлен способ гибели внедрившейся клетки внутри клетки-каннибала в обоих вариантах КК. Мы предполагаем, что взаимодействие нормальных клеток с опухолевыми может усиливать опухолевую прогрессию и обеспечивать гетерогенность опухоли за счет индукции аномальных митозов и стимуляции анеуплоидии. Не исключено, что гетеротипический КК может встречаться *in vivo* на границе опухолей и здоровых тканей при инвазии и метастазировании.

Перспективы применения куркумина при хронических гепатозах

Миянович Ольга, Катина М.Н.

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань,
olja.mijanovic@gmail.com*

В последние годы актуальна проблема борьбы с хроническими гепатозами, фиброзом, циррозом печени. Продуктами внеклеточного матрикса (ВКМ) при фиброзе являются миофибробласты, основным источником которых долго считали активированные звездчатые клетки печени (ЗКП). Зная механизм активации профиброгенных клеток, можно подавлять его, и, таким образом, тормозить развитие фиброза печени (ФП).

Куркумин, известный в качестве приправы, так же используется в традиционной медицине. Он обладает антибактериальным, противовирусным, противогрибковым, антипролиферативным, антиоксидативным, противовоспалительным, ангиогенным и противоопухолевыми эффектами. Куркумин напрямую взаимодействует со ЗКП, где подавляет экспрессию транскрипционного фактора NF- κ B, ответственного за синтез компонентов ВКМ. Он так же подавляет синтез ДНК, индуцирует апоптоз ЗКП.

Из желчных протоков четырехдневных крыс Wistar методом эксплантации получили культуры порталных фибробластов (ПФ), из фрагментов печени - ЗКП. Экспрессию α -гладкомышечного актина (α -ГМА) в культурах ЗКП и ПФ оценивали методами иммуноцитохимии и проточной цитометрии. Цитотоксический эффект куркумина на ЗКП и ПФ измеряли MTS тестом. Способность куркумина вызывать апоптоз ЗКП и ПФ исследовали на оборудовании xcelligence (roche) по влиянию на клеточный индекс (КИ), методами иммуноцитохимии и проточной цитометрии после окрашивания на AnnexinV-FITC-PI. Уровень экспрессии α -ГМА после добавления куркумина оценивали полуколичественным иммуноблоттингом.

На основании экспрессии α -ГМА показали, что не только ЗКП, но и ПФ являются источником миофибробластов и продуцентами ВКМ. С повышением концентрации куркумина растет цитотоксичность его растворов. Концентрация 50мкМ вызывала стойкое снижение КИ, т.е. апоптоз части ЗКП и ПФ, оставшиеся клетки прекращали делиться (не было нарастания КИ). Согласно результату иммуноблоттинга, синтез α -ГМА в ПФ и ЗКП снижался, т.е. клетки переходили в покоящееся состояние. Таким образом, было показано, что не только ЗКП, но и ПФ участвуют в ФП, а культуры ПФ могут служить *in vitro* моделью ФП, схожей с ЗКП. Куркумин вызывает апоптоз ЗКП и ПФ и снижает в них синтез ВКМ, таким образом, он перспективен в качестве лекарственного средства при ФП.

Морфологические изменения секреторных клеток поджелудочной железы в условиях врожденного гипотиреоза

Остапенко Ольга Валериевна

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, кафедра гистологии и эмбриологии, Киев, Украина, ostapenco82@yandex.ua

В настоящее время в Украине, а также в других странах СНГ наблюдается рост патологии щитовидной железы (ЩЖ). Увеличение количества больных является одним из проявлений последствий аварии на Чернобыльской АЭС. У большинства пациентов диагностируется гипофункция ЩЖ разной степени [1, 2]. Вопрос морфологических изменений в различных органах в условиях гипотиреоза изучен не достаточно. Отдельные работы посвящены структурным изменениям сердца, коры головного мозга, яичников [3-5]. Однако изменения компонентов поджелудочной железы при дефиците гормонов ЩЖ изучены не достаточно. Целью данного исследования было установить морфологические изменения со стороны секреторных клеток поджелудочной железы в результате развития врожденного гипотиреоза.

Эксперимент был проведен на белых крысах-самцах, массой 180-220 г. Врожденный гипотиреоз моделировался путем угнетения функции щитовидной железы мерказолилом на протяжении всей беременности. После рождения новорожденные животные получали тиреостатик с молоком матери, а в дальнейшем – при самостоятельном приеме пищи. Особенности влияния дефицита гормонов щитовидной железы определяли у животных в возрасте 1,5 месяца. Адекватность модели врожденного гипотиреоза подтверждена иммуноферментным анализом.

В результате проведенного электронно-микроскопического исследования были выявлены изменения в виде отставания в развитии органа и дистрофических изменений. Наиболее яркие изменения выявлены в органеллах синтеза (грЭПС, КГ), митохондриях, и секреторных гранулах. Цистерны грЭПС теряют характерное параллельное расположение, формируются везикулы и вакуоли. Резко снижено количество митохондрий, часть из которых характеризуется просветлением матрикса, нарушением целостности мембран, слабо различимыми кристами, количество которых резко снижено. В результате активации процессов ПОЛ на месте мембранных органелл образуются миелиноподобные тельца. Количество секреторных гранул значительно снижено. Большая часть секреторных гранул содержит прозимоген.

Проведенное исследование показало, что состояние врожденного гипотиреоза у животных в возрасте 1,5 месяца приводит к патологическим изменениям со стороны паренхимы, а также стромального компонента и микроциркуляторного русла. Изменения структурной организации приводит к функциональным нарушениям поджелудочной железы.

Оценка количества когезинов с использованием флуоресцентной микроскопии и высокопроизводительного микроскопического скрининга в разных фазах клеточного цикла

¹Пожарская Василиса Арсеньевна, ²Черепанинец Варвара Дмитриевна, ²Жиронкина Оксана Андреевна, ³Стрелкова Ольга Сергеевна

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия, vasskaliska@gmail.com; ²МГУ, биологический факультет и НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия; ³МГУ, факультет биоинженерии и биоинформатики и НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия

Когезин – высококонсервативный мультисубъединичный комплекс, одной из функций которого является удерживание сестринских хроматид вместе до их расхождения в митозе. Особенности динамики связывания и характер взаимодействия когезинов с нативным хроматином в контексте сложной архитектуры интерфазного ядра на различных стадиях клеточного цикла до конца не известны. Работа выполнена на культуре мышечных клеток 3Т3. Для описания распределения когезинов по хроматину на разных стадиях клеточного цикла флуоресцентные изображения клеток обработаны программой, написанной на макроязыке в среде ImageJ. Для анализа ультраструктурного распределения когезинов использована микроскопия с суперразрешением. Написан макрос, с помощью которого на изображениях по флуоресцентному сигналу DAPI – красителя, селективно связывающего ДНК – выделяли область ядра. Затем производили разделение ядер по стадиям клеточного цикла. Дифференциацию G/S производили по интегральной интенсивности сигнала репликативной метки, дифференциацию ранняя S/поздняя S производили по стандартному отклонению сигнала репликативной метки, и G₁/G₂ – по интегральной интенсивности сигнала DAPI. Анализ данных по средней и интегральной интенсивности сигнала Smc3 – субъединицы когезинового комплекса - в разных фазах клеточного цикла показывает увеличение обоих параметров при продвижении по клеточному циклу от G₁ к G₂. На изображениях, полученных с суперразрешением, в S фазе присутствует как диффузный сигнал Smc3, связывающего хроматин независимо от прохождения репликации, так и колокализирующиеся с репликативной меткой, интенсивно окрашиваемые в поздней S фазе, то есть во время репликации гетерохроматина, фокусы Smc3. Связывание хроматина когезинами и репликация практически не разделены во времени, так как яркие фокусы репликативной метки и Smc3 в значительной степени перекрываются. Полученные в этой работе и ранее данные позволяют предположить механизм, согласно которому дополнительное связывание когезинов с хроматином в процессе репликации в местах синтеза ДНК происходит как в эухроматине, так и в гетерохроматине, после чего плотность их посадки на хроматине падает. Дальнейшая когезия сестринских хроматид осуществляется разными механизмами в разных фракциях хроматина: в эухроматине когезию обеспечивает небольшое количество диффузно распределенных когезинов, а в гетерохроматине близкое расположение сестринских хроматид обеспечивается плотной упаковкой хроматина.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 13-04-00885 И.И.К).

Морфологические изменения иммунной системы при экспериментальном остром и хроническом язвенном колите

Постовалова Екатерина Андреевна

МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия; ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва, Россия, ekaterinapostovalova@gmail.com

Воспалительные заболевания кишечника, представленные болезнью Крона (БК) и язвенным колитом (ЯК) широко распространены в разных странах. В последние 20 лет частота встречаемости ЯК возросла в 15, а БК в 5 раз. ЯК - мультифакториальное заболевание, обусловленное генетическими особенностями, дисбиотическими и иммунологическими нарушениями. Изучение при ЯК иммунологических нарушений с одновременной оценкой изменений органов иммунной системы и периферической крови (ПК) возможно только на экспериментальных моделях.

Цель работы - исследование морфофункциональных изменений иммунной системы у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 при экспериментальном остром (ОЯК) и хроническом язвенном колите (ХЯК), индуцированном декстрансульфатом натрия (ДСН). ЯК моделировали заменой питьевой воды на 1% водный раствор ДСН в течение 5 суток. Животных выводили из эксперимента на 7-е и 28-е сут от начала потребления ДСН. Проведено морфологическое и морфометрическое исследование тимуса, брыжеечных лимфатических узлов (БЛУ), ободочной кишки. С помощью проточной цитофлюориметрии в ПК и клеточной суспензии, выделенной из БЛУ, определяли состав лимфоцитов. Использовали антитела к CD3 (Т-лимфоциты), CD19 (В-лимфоциты), CD4 (Т-хелперы), CD8 (цитотоксические Т-лимфоциты), Foxp3 (регуляторные Т-лимфоциты) фирмы «eBioscience».

На 7-е сутки при гистологическом исследовании ободочной кишки выявлен ОЯК: поверхностные и глубокие эрозии; крипт-абсцессы; выраженная воспалительная инфильтрация слизистой оболочки (СО) нейтрофилами, гистиоцитами, лимфоцитами; отек и расширение лимфатических сосудов. В тимусе - акцидентальная инволюция II степени: уменьшена объемная доля коркового слоя; границы между корковым и мозговым слоями очагово-нечеткие; количество телец Гассалья увеличивалось, среди них - кистоподобные полости и тельца с отложением кератогиалина. В БЛУ лимфоидные узелки - крупные с широкими светлыми центрами, выраженная синусная макрофагальная реакция. в БЛУ статистически значимо возрастало количество цитотоксических и регуляторных Т-лимфоцитов и снижалось – лейкоцитов, лимфоцитов, Т-хелперов и В-лимфоцитов. В ПК при ОЯК уменьшалось процентное содержание В-, относительное и абсолютное количество Т-регуляторных лимфоцитов. На 28-е сутки в ободочной кишке выявлялся хронический колит: крипты деформированы, расширены, заполнены слизью, отмечался очаговый фиброз СО, воспалительная инфильтрация из лимфоцитов, гистиоцитов, плазмоцитов. Увеличивалось число лимфоидных узелков. В тимусе - акцидентальная инволюция II степени: картина «звездного неба» в корковом слое; увеличение числа тимических телец Гассалья, среди них кистоподобные тельца, тельца с кератогиалином. В БЛУ - гиперплазия В и Т зон и выраженный синусный гистиоцитоз. При ХЯК в БЛУ возрастало процентное содержание лимфоцитов по сравнению с контролем. В ПК при ХЯК, в отличие от ОЯК, повышалось относительное содержание В- и снижалось – цитотоксических Т-лимфоцитов. При ХЯК по сравнению с контролем и ОЯК возрастало содержание регуляторных Т-лимфоцитов.

Таким образом, при ОЯК и ХЯК развивается акцидентальная инволюция тимуса, гистиоцитоз БЛУ. Изменение субпопуляционного состава наиболее выражено в ПК, и они характеризуются повышением содержания регуляторных Т-лимфоцитов.

Нейроно-глиальные соотношения в переднем кортикальном ядре миндалевидного комплекса мозга у крыс линии WAG/Rij

Садртдинова Индира Илдаровна

Башкирский государственный университет, Уфа, Россия, indira.ildarovna@mail.ru

В настоящее время исследования структур головного мозга при половом диморфизме представляют собой актуальную проблему нейробиологии. Известно, что переднее кортикальное ядро миндалевидного комплекса мозга является зоной полового диморфизма.

Целью нашей работы стал сравнительный анализ количественных особенностей плотности нейронов, суммарной и сателлитной глии в переднем кортикальном ядре у половозрелых крыс линии WAG/Rij (30 самцов и 22 самки), массой тела 200-220 г. Изучали серийные фронтальные срезы толщиной 10 мкм, окрашенные крезоловым фиолетовым по Нисслию с помощью микроскопа МБИ-11 (ЛОМО, Россия) при 40-кратном увеличении, что делает возможным дифференцировку нейронов и глии. Статистическую обработку проводили с использованием программы «Statistica 5.5».

В составе переднего кортикального ядра выявлены 3 зоны: поверхностная, поверхностная клеточная, глубокая. В поверхностной зоне нами обнаружены единичные нейроны, в связи с чем сравнительный анализ проводили в двух вышележащих клеточных слоях.

Результаты исследования показали, что количество нейронов у самцов крыс было выше, чем у самок: в поверхностной клеточной зоне $11,93 \pm 0,21$ и $10,23 \pm 0,24$ соответственно ($p < 0,001$), в глубокой зоне $15,47 \pm 0,36$ и $13,68 \pm 0,29$ соответственно ($p < 0,01$). Плотность суммарной глии в поверхностной клеточной зоне ниже у самок $21,45 \pm 0,53$, чем у самцов $23,97 \pm 0,50$ ($p < 0,01$), в глубокой зоне достоверных различий не обнаружено.

Несомненный интерес представляет определение процентного соотношения сателлитной глии к общей, т.к. количество сателлитной глии указывает на степень активности нейронов. Доля сателлитной глии в общем числе глиальных клеток в поверхностной клеточной зоне составила у самцов 9,32%, у самок выше - 11,26%, а в глубокой зоне 8,61% и 14,75% соответственно ($p < 0,05$).

Полученные нами данные по плотности расположения нейронов, общей и сателлитной глии в переднем кортикальном ядре миндалевидного комплекса мозга указывают на половые различия: у самцов крыс показатели нейронов и суммарной глии достоверно выше во всех зонах. Однако величина процентного отношения сателлитной глии к общей была выше у самок как в поверхностной клеточной, так и в глубокой зонах. Установленные количественные отличия в изучаемой нами структуре головного мозга, вероятно, могут в определенной степени обуславливать различия функционирования мозга.

Влияние белка ядрышка SURF6 на пролиферацию клеток человека HeLa

Самойлова Дарья Викторовна

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет; Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва,

dashasam@mail.ru

SURF6 – эволюционно консервативный белок ядрышка эукариот, участвующий в процессинге рРНК. SURF6 оверэкспрессирован при некоторых онкологических заболеваниях и является маркером пролиферативного состояния лимфоцитов. Поскольку роль SURF6 человека в регуляции клеточной пролиферации до сих пор не изучена, то целью работы стало исследование влияния индуцированного уменьшения содержания SURF6 методом РНК-интерференции (нокдауна SURF6) на пролиферацию и жизнеспособность клеток HeLa.

Для нокдауна SURF6 клетки HeLa трансфицировали РНК-дуплексами siRNA SURF6 («Ambion», США), в качестве контроля клетки трансфицировали негативными РНК-дуплексами siRNA negative («Ambion»). Для исследования также применялись методы иммуноблоттинга, проточной цитофлуориметрии, иммуноцитохимии.

Результаты работы показали, что нокдаун SURF6 приводит к пятикратному уменьшению содержания белка, видимому на блотах, в суммарных лизатах клеток через 48-72 ч после трансфекции. Понижение содержания SURF6 при нокдауне отмечено и на клеточном уровне методом иммуноцитохимии. Данные проточной цитофлуориметрии указывают на то, что нокдаун SURF6 приводит к уменьшению содержания апоптотических клеток по сравнению с контролем почти в 2 раза через 48-72ч после трансфекции. Доля клеток в G1/G0 периоде клеточного цикла при этом уменьшается почти на 20% на последнем сроке. Содержание клеток в S периоде клеточного цикла, напротив, возрастает на 17% по отношению к контролю. Анализ митотического индекса на фиксированных клетках проводился с помощью микроскопии после окрашивания хроматина DAPI. Было отмечено значимое возрастание митотического индекса при нокдауне SURF6 через 48-96 часов после трансфекции.

Выводы:

1. Нокдаун SURF6 не вызывает гибели клеток HeLa при данных экспериментальных условиях.
2. Частичный нокдаун SURF6 оказывает положительное влияние на пролиферацию клеток HeLa, о чем говорят увеличение митотического индекса, доли клеток в S-периоде и уменьшение доли клеток в G0/G1-периодах.

Стимулирующие эффекты нокдауна SURF6 в культуре HeLa противоречат данным, полученным при изучении пролиферации дрожжевых клеток и культивируемых фибробластов мыши NIH 3T3. Принимая во внимание эти наблюдения, можно полагать, что позитивное влияние SURF6 на пролиферацию опухолевых клеток человека HeLa связано с особенностями их метаболизма.

Работа финансировалась грантом Президента Российской Федерации (МК-6426.2013.4).

Клеточные методы диагностики синдромов с дефектами ответа на повреждение ДНК – синдрома Секкеля и атаксии-телеангиэктазии.

Туренко Анастасия Сергеевна, Куранова Мирья Леонидовна, Возняк Ольга Леонидовна
Санкт-Петербургский Государственный Политехнический Университет, Санкт-Петербург, Россия, miryakuranova@gmail.com; anastasintur@gmail.com

Синдром Секкеля 1 (CC1, OMIM:210600) и атаксия-телеангиэктазия (АТ, OMIM:208900) являются тяжелыми наследственными аутосомно-рецессивными заболеваниями, развивающимися при наличии приводящих к их функциональной неактивности мутаций в генах протеинкиназ АТР и АТМ соответственно. Протеинкиназы АТМ и АТР являются ключевыми участниками глобального клеточного ответа на повреждения ДНК и имеют общий спектр белков-мишеней.

Для работы были взяты полученные в лаборатории радиационной цитологии ИНЦ РАН линии первичных фибробластов SsSP1 (пациента с CC1) и AT8SP (пациента с АТ). В качестве контроля использовали первичные фибробласты здорового донора VH-10. Выявление функционально активной протеинкиназы АТМ и сайтов фосфорилирования белков-мишеней протеинкиназ АТМ и АТР после воздействия 50 мкг/мл радиомиметика (блеомицина) проводили методом непрямой иммунофлуоресценции с одновременным окрашиванием антителами к фосфорилированной форме протеинкиназы АТМ (p-АТМ) и фосфорилированных

сайтов белков-мишеней протеинкиназ АТМ и АТР. Через час после облучения клетки окрашивали, антитела к сайтам фосфорилирования белков-мишеней протеинкиназ АТМ-АТР выявлялись вторыми антителами, конъюгированными с Су-5 (красное свечение), а антитела к р-АТМ выявлялись вторыми антителами, конъюгированными с FITC (зеленое свечение).

При анализе изображений, полученных после окрашивания, в клетках здорового донора выявлялись фокусы рАТМ (зеленое свечение) и фокусы сайтов фосфорилирования белков-мишеней протеинкиназ АТМ и АТР (красное свечение), которые при совмещении (merge) частично совпадали (оранжевое окрашивание) в зонах активности АТМ, а частично – не совпадали в зонах активности протеинкиназы АТР, что свидетельствовало об активации в ответ на повреждение ДНК обеих этих киназ. В клетках АТ8SP зеленое свечение отсутствовало, то есть активная форма р-АТМ не выявлялась. Наблюдаемые фокусы красного свечения свидетельствует об активности в этих клетках только протеинкиназы АТР. В клетках SsSP1наблюдается и зеленое и красное свечение, но при совмещении изображений все фокусы совпадают и дают оранжевую окраску, что свидетельствует об активности только одной протеинкиназы АТМ.

Таким образом, нами был предложен новый метод подтверждения клинического диагноза атаксии-телеангиэктазии и синдрома Секкеля на клеточном уровне.

*Работа выполнена в Институте цитологии РАН (ИНЦ РАН), Санкт-Петербург, Россия
Работа выполнена при поддержке грата РФФИ №12-06-00189а и гранта Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».*

Эффективность клонирования фибробластов при изменении вектора гравитации

Хотянович Маргарита Олеговна

*Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь,
Pochta_margo@mail.ru*

Вопросы влияния изменения вектора гравитации на формирование клеток и тканей на разных этапах онтогенеза весьма актуальны. Недостаточно изучено воздействие микро- и гипергравитации на разные типы клеток. Целью работы явился анализ эффективности клонирования – показателя, отражающего способность к пролиферации отдельных клеток.

В экспериментах на культуре клеток фибробластов человека FLv изменяли на $\angle 60^\circ$ положение флаконов относительно горизонтальной плоскости. Поворот осуществляли осторожно через 40-48 часов после достижения конfluence в 70%. Сопоставляли результаты наблюдений пролиферативной активности клеток во флаконах (2 флакона), один из которых на протяжении всего эксперимента (24 часа) находились в горизонтальном положении (серия 1), другой располагали под углом $\angle 60^\circ$ (серия 2). Затем через 24 часа осуществляли клонирование клеток, выращенных во флаконах серии 1 и серии 2 с последующим сравнительным анализом. Эффективность клонирования определяли по способности одиночных живых клеток (100 клеток на чашку Петри диаметром 35 мм) проявлять пролиферативную активность и формировать колонии в отсутствие клеточных контактов. Подсчет клонов производили в 5 чашках для каждой серии с использованием инвертированного микроскопа NY-2E (Zeiss Inc., Германия). Оценивали эффективность клонирования (ЭК) – отношение количества образовавшихся клонов к общему количеству высеянных клеток на чашку.

Установлено, что клеток первой серии эффективность клонирования составила 66,5%, а клеток второй – 64,5%. Эффективность клонирования фактически не отличается от вышеуказанной серии опытов. Следует отметить, что для колоний фибробластов, клетки

которых предварительно перед клонированием на протяжении 24 часов располагались во флаконах под углом $\angle 60^\circ$, характерен ряд особенностей. Такие колонии характеризуются большими размерами, край колоний неровный, с мозаичными впадинами, участками с нарушенным монослоем клеток, что свидетельствует об изменении межклеточных коммуникаций. Для колоний, клетки которых предварительно перед клонированием на протяжении 24 часов располагались в горизонтальном положении, характерны меньшие размеры и диаметры, край колоний ровный, доминировали популяции округлой формы.

Таким образом, сдвиг направления действия равнодействующей силы не сопровождался изменением эффективности клонирования, но претерпевает трансформацию структура клеток.

Пластичность миграционных механизмов - новое свойство опухолевых стволовых клеток

Чикина Александра Сергеевна

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», НИИ Канцерогенеза, лаборатория механизмов канцерогенеза, Россия, Москва, alexsandrachikina@yandex.ru

Существуют три основных способа движения индивидуальных клеток: мезенхимальное, амeboидно-филлоподиальное и амeboидное. В норме клетки используют один из типов движения, исключение составляют стволовые клетки, для которых характерна пластичность миграционных механизмов - способность изменять тип движения в зависимости от условий среды. Одним из факторов, вызывающих смену типа движения, является адгезивность субстрата. Снижение адгезивности ведет к переходу с мезенхимального на амeboидный тип движения (МАП). Появление пластичности также наблюдается в ходе опухолевой прогрессии, что ведет к увеличению эффективности клеточной миграции. Однако не все опухолевые клетки подвергаются МАП. Мы предположили, что пластичностью обладают именно опухолевые стволовые клетки (ОСК). Признаками стволовых клеток фибросаркомы являются экспрессия CD133 и множественная лекарственная устойчивость. Цель работы – определить, является ли пластичность механизмов миграции характерным свойством именно ОСК. Материалы и методы: культура клеток HT1080-фибросаркома человека. МАП достигался культивированием клеток на субстрате пониженной адгезивности (стекла, обработанные раствором PolyHEMA (0,2мкМ)), способность к множественной лекарственной устойчивости определяли с помощью оценки выбрасывания флуоресцентного красителя Hoechst 33342. ОСК выделяли методом MACS (Magnetic activated cell sorting) по селективному маркеру CD133, их тип движения оценивали с помощью DIC. Только 29% популяции опухолевых клеток подвергаются МАП на субстрате сниженной адгезивности, в то время как 71% популяции не переходит на использование альтернативных способов движения. Степень выбрасывания Hoechst 33342 у клеток, которые приобрели морфологию амeboидного типа движения, оказалась в 2 раза выше по сравнению с теми, которые не проявили пластичности миграционных механизмов. После выделения субпопуляции ОСК оказалось, что все CD133⁺ клетки мигрируют амeboидным способом, в то время как CD133⁻ способности к амeboидному типу движения не показали. Таким образом, пластичность миграционных механизмов свойственна именно ОСК. Это, по всей видимости, является критически важным при формировании метастазов, так как клетки, из которых произойдет формирование вторичного опухолевого очага, должны не только самоподдерживаться и обеспечивать непосредственно формирование метастаза (канонические свойства ОСК), но и эффективно достигать места его будущей локализации.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-01473а.