

ПОДСЕКЦИЯ «БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ»

Устные доклады

Особенности протекания процесса сперматогенеза в семенных железах самцов белых крыс при воздействии ацетата свинца

Дуденкова Наталья Анатольевна

*Мордовский государственный педагогический институт имени М. Е. Евсевьева, Россия,
Саранск, dudenkova_nataly@mail.ru*

С наступлением половой зрелости в мужских половых железах начинается сперматогенез, который чрезвычайно чувствителен к повреждающим действиям, в том числе и воздействию тяжелых металлов. Однако экспериментальных данных о влиянии тяжелых металлов, в частности свинца, на процесс сперматогенеза недостаточно, не выяснено какое звено гаметогенеза в количественном отношении страдает больше других.

В данной работе с помощью гистологических методов исследования и морфометрического анализа изучены структурные и количественные изменения в различных видах сперматогенных клеток после 7 дней воздействия ацетата свинца в дозе 45 мг/кг/сутки. В качестве биологического тест-объекта в работе использовали белых беспородных половозрелых крыс-самцов массой 200-250 г. Материалом исследования служили семенные железы.

Проведенное морфологическое и морфометрическое исследование показало, что после 7 дней воздействия ацетата свинца происходит изменение формы и уменьшение размеров разных видов сперматогенных клеток, по сравнению с контролем. Отмечено беспорядочное расположение сперматозоидов в просвете канальца. На гистопрепаратах выявлены обрывы хвостов и агглютинация сперматозоидов. Обнаружены извитые семенные канальцы, в просвете которых отсутствовали сперматозоиды. Отмечено уменьшение количества сперматогоний, сперматоцит, сперматид и сперматозоидов, по сравнению с контролем, соответственно на 6,31%, 8,43%, 17,36% и 26,70%. Расчеты индекса сперматогенеза и индекса релаксации (напряженности сперматогенеза) показали, что в контроле они равны соответственно $3,32 \pm 0,15$ и $18,14 \pm 1,72$, а в опыте – $2,98 \pm 0,12$ и $17,33 \pm 1,02$. Таким образом, при воздействии ацетата свинца индекс сперматогенеза снижается на 10,24%, а индекс релаксации – на 4,46%, что говорит об уменьшении функциональной активности семенных желез.

Результаты полученных исследований указывают на токсическое влияние ацетата свинца на семенные железы белых крыс. Выявлено, что при воздействии ацетата свинца снижается продукция всех популяций сперматогенных клеток. Уменьшение числа стволовых клеток – сперматогоний является неблагоприятным прогностическим фактором протекания процесса сперматогенеза.

Автор выражает благодарность за помощь в проведенных исследованиях и подготовке тезисов своему научному руководителю, доктору биологических наук, профессору Шубиной Ольге Сергеевне.

Работа проводилась при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Программы стратегического развития «Педагогические кадры для инновационной России» (госзадание № 2 от 16.03. 2013 г.).

Конструкция, культивирование и морфологический анализ межвидовых химерных эмбрионов, полученных со стволовыми клетками разных лабораторных грызунов

^{1,4}Казак Евгения Александровна, ^{2,3,4}Васькова Евгения Андреевна

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия, kazak.jane@gmail.com, ²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия,

³Новосибирский научно-исследовательский институт патологии; кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия, vaskova@bionet.nsc.ru; ⁴Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Цель данной работы - оценка морфологии и жизнеспособности химерных бластоцист лабораторных грызунов (эмбрион мыши ↔ стволовые клетки (СК) крысы; эмбрион мыши ↔ СК полевки) в условиях *in situ*. Проверка плюрипотентности СК проводилась в условиях *in situ*.

Химерные бластоцисты получены агрегацией 8-кл эмбриона мыши с СК и инъекцией СК в бластоцель мыши. Животные (C57Black/6J, DD/He, 129/Ola, ICR, BALB/cJLacY и OG2) предоставлены ЦКП ГЛЖ (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=132>). Проверены линии полевки (XEN M6, RTS1, SKR134) и крысы (NF7, MR39, dB50, XEN Fisher), меченые прижизненно родамином В. Полученные химерные бластоцисты исследованы методом конфокальной лазерной микроскопии в ЦКП МАБО (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=113>).

Суммарно было получено 128 бластоцист. Эффективность агрегации составила в среднем 50% (34-76%). Потомки меченых СК обнаружены в нормальных и аномальных бластоцистах (27 и 99 соответственно). Инъекционным методом было получено 132 бластоцисты. В 59 из них мы также наблюдали заселение ксеногенными СК эмбриональных и экстраэмбриональных закладок. Доля нормальных бластоцист, полученных в результате манипуляций, варьирует в зависимости от линии СК при использовании как агрегационного, так и инъекционного подхода. Так, в агрегации с СК линии SKR134 интеграция наблюдается чаще в аномальных бластоцистах, при инъекции – в нормальных. Для бластоцист, заселенных потомками линии СК NF7, развитие проходит нормально при использовании обоих методов. Однако для инъекционного протокола эта доля оказалась в целом выше (45-78% - при агрегации, 41-91% - при инъекции).

Таким образом, мы показали, что прижизненное маркирование СК родамином В не снижает их жизнеспособности. Потомки маркированных СК наблюдаются в разных закладках нормальных и аномальных бластоцист. По результатам данного исследования нами разработана новая экспериментальная модель, которая может быть использована для оценки плюрипотентности немышиных СК в условиях *in vivo*.

Влияние L-карнитина в защищенной форме на молочную продуктивность коров

Клементьева Юлия Ивановна

ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии, Россия, Московская область, Подольский район, п.

Дубровицы, klementevajulija@rambler.ru

На высокопродуктивных голштинизированных коровах черно-пестрой породы (на 4 группах, n=32) проведены исследования по определению влияния скармливания карнитина в защищенной форме (витамин В_T) на молочную продуктивность. В научно-хозяйственном опыте установлено, что обогащение рационов высокопродуктивных коров карнитином в защищённой форме в количестве 0,30; 0,45; 0,60 мг соответственно на 1 кг произведенного молока, обеспечивает повышение молочной продуктивности (в пересчете на молоко 4% -ной жирности) на 3,7-10,7% одновременным снижением энергетических затрат на 3,8-10,8% и переваримого

протеина на 3,5-10,3% по сравнению с контрольными животными. Одним из показателей, определяющих качество молока, характеризующим его безопасность, а также состояние здоровья животных является число содержащихся в нём соматических клеток. Количество соматических клеток в среднем в молоке коров контрольной и опытных групп составило соответственно 292,0; 242,5; 217,5; 225,0 тыс. в 1 см³, что было ниже по сравнению с молоком от животных контрольной группы на 49,5-74,5 тысяч в 1 см³, что не превышает нормативов к их содержанию в молоке для отнесения их к высшему сорту. Удержание высокой молочной продуктивности и жирномолочности у животных 2, 3, 4- опытных групп, по-видимому, обусловлено включением карнитина в рацион и участием его в жировом, белковом обмене [2, 1, 3].

Чистая прибыль от реализации продукции в опытных группах лактирующих коров составила соответственно 1458; 4959; 4582,5 руб. на голову.

Таким образом, использование в рационах новотельных коров карнитина в защищенной форме в количестве 45 мг на 1 кг производимого молока. с гепатопротекторным действием повышает молочную продуктивность, качество молока, переваримость питательных веществ рационов.

Морфодинамика фолликулогенеза млекопитающих

Лебедева Татьяна Семеновна, Храмова Юлия Владимировна

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

На сегодняшний день большое внимание уделяется вопросам культивирования овариальных фолликулов *in vitro* с целью получения зрелых ооцитов. Не смотря на значительное количество работ в данной области, существует проблема компетенции выращенного в искусственных условиях ооцита, его способности к оплодотворению и дальнейшему нормальному развитию. Одной из причин неудач в этом направлении исследований может служить неспособность ооцитов *in vitro* достигать нормальных для данного вида размеров. Известно, что размеры фолликула увеличиваются вплоть до овуляции, но динамика роста ооцита изучена в значительно меньшей степени. В связи с этим была поставлена задача проанализировать изменение размера ооцита в зависимости от размера фолликула и стадии его развития.

Для выяснения морфодинамики фолликулогенеза млекопитающих был проведен анализ гистологических препаратов яичников кролика, крысы, мыши. Препараты яичников были сфотографированы с помощью микроскопа Axiovert 25 (C.Zeiss) с цифровой камерой высокого разрешения, а затем с помощью программы ImageJ были проведены измерения диаметров фолликулов и ооцитов, конечные диаметры вычисляли по формуле: $d=\sqrt{(a*b)}$, где а и b - значения взаимно перпендикулярных диаметров.

При оценке стадии развития фолликула по основным морфологическим признакам (форма и количество слоев фолликулярных клеток, наличие лакун) были выделены следующие группы: примордиальные (1), вступившие в рост однослойные фолликулы (2), однослойные фолликулы с пирамидальными клетками (3), двуслойные (4), многослойные (5), лакунарные (6). С помощью измерения морфометрических показателей фолликулов было установлено, что ооцит интенсивно растет до стадии 4, практически достигая видового размера, эта закономерность справедлива для всех трех исследованных видов. На стадии 5 и 6 фолликул увеличивает свои размеры за счет возрастания слоев фолликулярных клеток и формирования лакун, а собственно диаметр ооцита достоверно не увеличивается.

Таким образом, основное увеличение размеров ооцита приходится на гормонезависимый период роста фолликулов. Однако многие процессы, обеспечивающие компетентность ооцита к оплодотворению, проходят в последний (гормонозависимый) период роста фолликулов. По-видимому, низкий процент оплодотворяемости ооцитов, выращенных *in vitro*, связан с тем, что исследователи обращают внимание только на достижение ооцитами морфологической зрелости (выделение 1-го редукционного тельца), но, как правило, не учитывают то, что ооцит не достиг максимально возможного для данного вида размера. Возможно, для успеха оплодотворения ооцита, полученного из фолликула, выращенного *in vitro*, необходимо отбирать ооциты, достигшие максимального видового диаметра.

Создание линий эмбриональных стволовых клеток мыши, несущих делеции некодирующих участков хромосом, для исследования пространственной организации генома

Лукьянчикова Варвара Алексеевна

Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия, taksa_91@mail.ru

Пространственная организация генома играет важную роль в регуляции активности генов. Компактизация хроматина, обеспечивая определенную укладку нитей ДНК, влияет на образование межгенных взаимодействий. Недавние исследования показали существование дополнительного уровня компактизации на стадии интерфазы – уровня топологических доменов. Участки, расположенные внутри одного топологического домена, контактируют между собой значительно чаще, чем участки соседних доменов, которые практически не взаимодействуют друг с другом. Характерный размер домена - ~1 миллион пар оснований. На сегодняшний день остается неясным, каким образом определяются границы доменов, могут ли хромосомные перестройки влиять на доменную организацию?

Целью данной работы является получение двух клеточных линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши, одна из которых содержит делецию участка генома, расположенного между двумя топологическими доменами, а вторая – внутри одного топологического домена.

С помощью компьютерного анализа были выбраны два участка для внесения делеций: междоменный участок (68 тысяч пар оснований) между генами *Cdc7* и *Tgfbr3*, а также внутридоменный участок (85 тысяч пар оснований) вблизи генов *C-kit* и *Kdr*. Оба фрагмента расположены на 5й хромосоме и не содержат кодирующих последовательностей. Гены вблизи делеций (*Cdc7*, *Tgfbr3*, *C-kit*, *Kdr*) имеют значимую активность в ЭСК, а фенотип, мутантный по этим генам, остается жизнеспособным.

С использованием генно-инженерных методов были сконструированы и подготовлены плазмидные вектора, в основе которых лежит система редактирования генома CRISPR/CAS9, обеспечивающая направленное удаление выбранных фрагментов генома. Один из ключевых векторов - gRNA-вектор - был модифицирован нами добавлением олигонуклеотидного адаптера, несущего в своем составе сайты узнавания *Esp31*-эндонуклеазы рестрикции, что позволяет встраивать в него любую последовательность в обычной реакции рестрикции-лигирования. Были собраны и получены gRNA-вектора для четырех сайтов посадки CAS9-нуклеазы.

Мы использовали систему «хромосомных манипуляций», предложенную японскими исследователями, для контроля удаления выбранных фрагментов генома. Она состоит из двух плазмидных конструкций, каждая из которых содержит плечи, гомологичные краям разрезов CAS9-нуклеазы, половинки генов GFP и DsRed, а также ген устойчивости к одному из

антибиотиков (гигромицин/неомицин). Четыре векторные конструкции - по две на каждую из делеций - были нами получены.

Была проведена трансфекция линии ЭСК мыши полученными плазмидами. В данный момент ведется селекция клеточных колоний на культуральной среде для ЭСК, содержащей антибиотики гигромицин и неомицин. В случае успешной делеции фрагмента генома в опытных чашках будет наблюдаться зеленое и красное свечение клеток (восстановление целостности генов флуоресцентных белков GFP и DsRed). В случае неспецифической рекомбинации клоны будут погибать в результате действия дифтерийного токсина, клонированного в одной из векторных конструкций.

Последующий анализ пространственной организации районов генома, фланкирующих делеции, методом 5C позволит определить принципы организации хроматина в топологических доменах.

Закономерности спонтанного и индуцированного химического мутагенеза в развивающихся мужских половых клетках мышей линии 129/IMG

Муджири Наталия Мурадовна

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия; ИБР им.

Н.К.Кольцова РАН, Москва, Россия, mnatalie91@mail.ru

Мыши линии 129/IMG являются гомозиготными по нонсенс-мутации во втором экзоне гена ДНК-полимеразы йота (Pol η), в результате чего этот фермент теряет свою каталитическую активность. Известно, что в норме Pol η обладает самой низкой точностью синтеза на матрице неповрежденной ДНК среди всех известных ДНК-полимераз. Максимальная активность Pol η наблюдается в семенниках взрослых животных. Установлено, что мыши линии 129/J являются радиорезистентными и при мутациях, обусловленных радиационным облучением, отсутствие тканеспецифической активности Pol η способствует сохранению семенников. Однако сперматогенез у этих животных не изучен.

Цель данной работы состояла в цитогенетическом изучении сперматогенеза у мышей линии 129/IMG в норме и после воздействия модельного мутагена дипина. Для этого семенники мышей фиксировали на 14, 28, 56 и 100сут после однократного внутрибрюшинного введения дипина в генетической дозе 30мг/кг. Для оценки частоты встречаемости хромосомных аномалий был использован метод учета сперматогониальных и мейотических микроядер. Оценку частоты генных точечных мутаций (и/или микроделеций) проводили по критерию аномалий форм головок спермиев (АФГС).

Показано, что на 28 и 56сут фиксации в опыте выход сперматогониальных клеток с микроядрами (4,4 и 5,2%, соответственно) превышает уровень спонтанного мутагенеза (1,5 и 3,3%). На 100сут после действия в контроле частота появления aberrантных сперматогониев достигла 11%, тогда как в опыте, напротив, уменьшилась по сравнению с 56сут более, чем в два раза (2,2%). Увеличение частоты встречаемости генетически aberrантных округлых сперматид в опыте по сравнению с контролем было установлено только на 56сут фиксации (с 0,6 до 1,9%). Также показано, что на 28 и 56сут фиксации частота появления АФГС увеличивалась соответственно от 1,2 и 1,7%, в контроле до 6,8 и 21,9% - в опыте, а на 100сут фиксации она вновь достигала уровня, наблюдаемого при спонтанном мутагенезе.

Итак, в процессе развития мышей линии 129/IMG изменения частот индуцированных микроядерных aberrаций в популяции сперматогониев и округлых сперматид незначительны. Эти частоты на порядок ниже тех, которые ранее были обнаружены в аналогичных экспериментах на мышцах-гибридах CBA/C57Bl6 и мышцах линии SAMP1, склонных к

ускоренному старению. На основании полученных данных можно допустить, что хромосомные структуры мужских половых клеток мышей линии 129/IMG проявляют высокую устойчивость к кластогенному эффекту дипина, вещества-радиомиметика. С другой стороны, увеличение числа АФГС в семенниках опытных мышей линии 129/IMG на 28 и 56сут говорит о возможности индуцирования дипином обратимых генных изменений в сперматоцитах I порядка и стволовых сперматогониальных клетках.

Клетки Сертоли половозрелых мышей разных линий *in vitro*.

Влияние условий культивирования

Павлюченкова Светлана Михайловна

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

smilesweta@yandex.ru

Ранее нами было показано, что при культивировании клеток Сертоли (КС) половозрелых мышей линии C57Bl/6 происходит отчетливое разделение исходно гомогенной популяции на две, различающиеся по морфологии и пролиферативной стратегии. В развитие этого принципиально важного наблюдения выполнено сравнительное исследование культур *in vitro* КС взрослых мышей разных линий, изучено влияние условий культивирования, пролиферативная активность и экспрессия специфических для КС маркеров.

Суспензии клеток семенников 3-мес. мышей линии C57Bl/6 и F1 гибридов CBA×C57Bl/6 высаживали в концентрации $3,2 \cdot 10^5$ к-к/см² в среду DMEM/F12 с добавлением 1%, 5% или 10% FBS, инкубировали при 37°C, через сутки отмывали все неприкрепившиеся клетки. Мониторинг поведения клеток в культуре проводился ежедневно. Он дополнялся иммуноцитохимическим анализом с использованием антител к кластерину (clu, маркер КС любого уровня дифференцировки), ki67 (маркер пролиферирующих клеток) и MIS (маркер недифференцированных КС).

При культивировании КС мышей линии C57Bl/6 в среде с добавлением 1% FBS монослой формировался на 14 сут. При этом популяция КС в соответствии с полученными ранее данными разделяется на два типа клеток - мелкие КС с небольшими ядрами (около 40% клеток), часть из которых является MIS⁺/ki67⁺, и крупные КС с большими ядрами, иногда двуядерные, которые не экспрессируют MIS, но являются clu⁺ и редко clu⁺/ki67⁺. При культивировании в среде с добавлением 5% FBS монослой формируется на 7 сут. При культивировании в среде с добавлением 10% FBS монослой не формируется, однако уже на 4-е сут образуется несколько многослойных образований, статично сохраняющихся на протяжении всего времени наблюдения (до 21 сут). Они состоят в основном из мелких КС, являющихся MIS⁺/ki67⁺-клетками, а также миоэпителиальных клеток.

КС мышей F1 гибридов CBA×C57Bl/6 при культивировании в среде с добавлением 1% FBS формируют монослой на 15 сут. При этом популяция КС, как и при культивировании КС мышей линии C57Bl/6 разделяется на два типа – мелкие и крупные. Однако мелкие КС преобладают, большая часть из них является MIS⁺/ki67⁺. При культивировании в среде с добавлением 5% FBS монослой образуется на 10 сут. При культивировании в среде с добавлением 10% FBS на 4 сут, в отличие от КС мышей линии C57Bl/6, формируется полноценный монослой.

Таким образом, эффект разделения популяции КС половозрелых мышей при культивировании не зависит от линии мышей, но его реализация отличается, что выражается как в различном соотношении КС двух популяций – мелких и крупных, так и во времени формировании монослоя.

Белки теплового шока как возможные посредники изменения морфогенеза регенерирующего хвоста тритона под действием внешних факторов

Радугина Елена Александровна

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, Москва,

elena.radugina@gmail.com

В ИБР РАН был отмечен эффект изменения формы регенерирующего хвоста тритона *Pleurodeles waltl* (Michahelles, 1830) при увеличении гравитационной нагрузки: формирование загнутого книзу регенерата. Этот эффект можно рассматривать как пример действия неспецифического физического фактора на процессы морфогенеза. Механизмы таких воздействий малоизучены, а имеющиеся данные в основном получены на клеточных культурах и раннем эмбриональном материале.

Обсуждаемый эффект был многократно воспроизведен в лаборатории и описан морфометрически и гистологически. Для изучения его механизмов проводили анализ пролиферативной активности клеток с помощью включения БрдУ и анализ экспрессии белков теплового шока (БТШ) Hsp70, 90 с помощью методов иммуногистохимии и ПЦР, а также изучали влияние теплового шока на форму регенерата.

Морфометрический анализ показывает, что различие формы на субстрате и в аквариуме достоверно и статистически значимо со стадии дифференцировки, хотя обратимо при отмене воздействия. В основе внешнего проявления загиба лежат гистологические изменения: изгиб эпендимной трубки, формирование хрящевого тяжа под углом к позвоночнику, уплотнение бластемы и утолщение эпидермиса в дорсоапикальной области. Возможно, при этом имеет место неравномерное изменение пролиферации клеток: было показано ее усиление в апикальном эпидермисе регенератов на субстрате. Впервые была показана экспрессия БТШ в ходе регенерации хвоста тритона. Выяснилось, что еженедельное воздействие теплового шока влияет на форму регенератов, с равной вероятностью приводя к образованию загнутых книзу (как на субстрате) и кверху регенератов.

Роль гравитационной нагрузки в изменении морфогенеза подтверждается экспериментом по регенерации с перегрузкой 2g, в котором был получен такой же загиб хвоста, как на субстрате. Однако гравитационная нагрузка – не единственный фактор, приводящий к изменениям морфогенеза. Тот факт, что сходные изменения наблюдаются при действии теплового шока, позволяет предположить, что в обоих случаях работают одинаковые механизмы, использующие БТШ. Наряду с этими соображениями, накапливаются литературные данные о роли БТШ в регенерации и об их активации при изменении гравитационной нагрузки. В связи с этим мы рассматриваем их изучение как перспективное для исследования механизмов действия физических факторов на морфогенез.

Строгие критерии Крюгера в норме и при нарушении сперматогенеза

Савикина Ксения Геннадьевна

Центр репродукции человека и ЭКО, Россия, Ростов-на-Дону, otuscops88@gmail.com;

Южный федеральный университет, Россия, Ростов-на-Дону

Для обследования бесплодных пар лабораторное исследование эякулята является неотъемлемой частью, необходимой для диагностики функциональных нарушений половых желез и принятия решения о фертильности мужчины. Строгие критерии Т. Крюгера оценки морфологии сперматозоидов лежат в основе принятия решений о проведении

интрацитоплазматического введения сперматозоида (ИКСИ). При этом информативность этого критерия при нормоспермии исследована недостаточно. Целью нашей работы был поиск проявления строгих морфологических критериев Крюгера в зависимости от концентрации сперматозоидов и их подвижности.

В исследовании были использованы данные спермограмм 100 мужчин от 18 до 49 лет, обратившихся в Центр репродукции человека и ЭКО (г. Ростов-на-Дону). В пяти исследуемых группах была рассмотрена зависимость между такими показателями, как концентрация/подвижность сперматозоидов и результатами оценки морфологии сперматозоидов по строгим Критериям Крюгера.

Результаты анализа распределения строгих морфологических критериев Крюгера анализировали с учетом количества и подвижности сперматозоидов у пациента - нормоспермия, олигоспермия, олигоастеноспермия и астеноспермия. Наиболее встречаемые дефекты сперматозоидов при всех исследованных нарушениях сперматогенеза – дефекты головки. При этом наибольшее количество дефектов головки сперматозоидов наблюдалось в группе мужчин с олигоспермией. Показатели дефектов шеи имеют наибольший процент в группе нормоспермии, при концентрации сперматозоидов от 15 до 30млн/мл. Показатели дефектов хвоста практически одинаковы во всех группах обследованных.

Выводы: При олигоспермии и нормоспермии (концентрация сперматозоидов от 15-30млн на 1мл) у мужчин наблюдаются различные дефекты в морфологии сперматозоидов, но одинаково малое число нормальных сперматозоидов. Анализ эякулята не дает однозначного ответа о мужской фертильности, но является индикатором вероятного фертильного потенциала. Таким образом, рекомендуется проведение ИКСИ при нормоспермии, если концентрация сперматозоидов не превышает 30млн/мл. Анализ данных также позволил рекомендовать проведение оценки спермограммы с обязательным включением оценки сперматозоидов по строгим критериям Крюгера в программе ИКСИ.

Изучение эмбриотоксичности 1,1 НДМГ на *Danio rerio* (Zebrafish)

Сайлаубекова Пакизат Нурсултанкызы

Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби, факультет Биологии и биотехнологии, Алматы, Казахстан, pakizats@gmail.com

Несимметричный диметилгидразин (1,1 НДМГ) широко используется в ракетно-космической деятельности в качестве топлива. 1,1 НДМГ отнесен Всемирной организацией здравоохранения к особо опасным химическим соединениям (Suimenbaev В.Т., 1997).

Для исследования эмбриотоксичности высоких доз 1,1 НДМГ был использован так называемый DarT (*Danio rerio* (Hamilton, 1882) tertatogenic assay) тест. Использование эмбрионов *D. rerio* в качестве объекта исследований имеет ряд преимуществ: быстрое развитие (через 72 часа после оплодотворения происходит выклев личинок), прозрачность хориона позволяет анализировать эмбрионы на всех стадиях эмбриогенеза, маленький размер позволяет использовать для опытов чашки Петри и культуральные планшеты (Busquet et al, 2008).

Для исследования использовали жизнеспособную икру *D. rerio*, полученную от здоровых производителей в лаборатории. Экспозиция зародышей начиналась со стадии поздней бластулы, когда легко отделить неоплодотворенные икринки. В опытах с однократным воздействием 1,1 НДМГ, зародыши были разбиты на 6 групп по 55 икринок в каждой. Экспозиция зародышей 1,1 НДМГ в концентрациях 0,25%, 0,5 %, 1%, 2,5% и 5% от объема среды проводилась в чашках Петри в течение 3 часов. Анализ эмбрионов проводили с использованием стереомикроскопа Motic DM 143, с смонтированной камерой.

Смертность эмбрионов в контроле составляла 9%, что позволяет считать результаты эксперимента валидными. По результатам исследования экспозиция зародышей исследуемыми концентрациями 1,1-НДМГ приводила к полному лизису эмбрионов в течение 3 часов, при этом хорион оставался неповрежденным. Таким образом концентрации гептила 0,5% можно рассматривать как минимальную концентрацию, вызывающую гибель 100% эмбрионов в течение 3 часов. При добавлении 1,1-НДМГ из расчета 0,25% объема среды только 11% зародышей пережили экспозицию. При анализе последних в течение 48 часов после оплодотворения наблюдались значительная задержка развития и последующая гибель на стадии ранней фарингулы. Отмечены практически полное отсутствие пигментации зародышей, недоразвитие структур мозга и глаза, слуховых плакод, деформация желтка.

Ранний онтогенез мезонефроса личинки Жабы зеленой (*Bufo viridis*)

Светашева Диана Рафаиловна

Астраханский государственный технический университет, Институт рыбного хозяйства, биологии и природопользования, Астрахань, Россия, svetashevadr@yandex.ru

Исследована формирующаяся ткань мезонефроса у личинок зеленой жабы. Исследование проводилось на сериях срезов личинок зеленой жабы (*Bufo viridis* Laurenti, 1768) на конечных стадиях личиночного развития, приготовленных и окрашенных по общепринятым методикам О.В. Волковой, Ю.К. Елецкого [1]. На 16-ые сутки почка представляла собой два параллельных тела вдоль позвоночника. Резко выражена дифференцировка тканей органа. Висцеральный край почки представлен более плотным скоплением эпителиальной ткани. В этой части почки идет интенсивное формирование почечных канальцев и почечных телец. Дистальный край почки характеризовался наличием сформированных почечных канальцев и почечных телец. Расположены они более рыхло, чем у висцерального края. Просвет периферических канальцев, диаметр которых достигал $4,4 \pm 0,15$ мкм больше, чем висцеральных, просвет, которых составлял, в среднем, $1,8 \pm 0,1$ мкм, как более молодых. Диаметр канальцев, как показали наблюдения, увеличивался по мере увеличения возраста личинки. Происходящие морфологические изменения в мезонефросе у личинок этого возраста свидетельствуют о сложной пространственной и функциональной дифференцировке органа. Межканальцевая ткань мезонефроса личинки была представлена ретикулярными клетками, между которыми были рассредоточены формирующиеся клетки крови. Дифференцирующиеся элементы крови у внешнего края почки были более рассредоточены и малочисленны чем у внутреннего края почки, где располагались более плотно. Дифференцировались клетки эритропоэтического (60%), гранулоцитопоэтического (30%) и агранулоцитопоэтического (10%) рядов. Среди всех развивающихся клеток, преобладали дефинитивные эритроциты (45%), но так же в большом количестве присутствовали бластные и созревающие клетки крови грануло- (13%) и эритропоэтического (4%) ряда. У личинок этого возраста было мало клеток лимфоидного ряда (3%). У клеток эритропоэтического ряда регистрировался пойкилоцитоз. Кроме этого, у 15% эритроцитов была отмечена полихромазия, что является показателем неполноценной зрелости клеток. На 20 день личиночного развития жабы заметно лишь незначительное уплотнение межканальцевой ткани почки в каудальной части. Отмечено, что нарастание нефрогенной ткани идет в дистальном направлении. Просвет канальцев в краниальной части мезонефроса больше чем в каудальной и не изменился по сравнению с личинками 16-го дня развития. Выявлено, что диаметр просвета почечного канальца зависел не от возраста личинки, а увеличивался по мере формирования самих канальцев. Число новообразующихся канальцев увеличивается по мере развития личинки и самого органа. Таким образом, почка растет за счет увеличения числа вновь

образующихся элементов. У личинок этого возраста среди формирующихся кроветворных элементов также доминировали клетки эритропоэтического ряда, при этом они образовывали группы – эритропоэтические островки. Клетки грануло- и агранулоцитопоэтического рядов были расположены хаотично. При этом гранулоцитов насчитывалось до 35%, агранулоцитов около 15%. Анализ проведенного исследования мезонефроса личинок жаб показал, на протяжении всего исследованного периода развития почка наряду со своей основной функцией – выделения, выполняла функцию кроветворения. Изучение структуры органа показало, что периферических или центральных зон кроветворения в органе не выявлено, все кроветворные элементы располагаются хаотично, за исключением эритроцитов, которые образовывали эритропоэтические островки на конечных этапах раннего онтогенеза. Развивалась почка поэтапно, дифференцируясь пространственно и структурно по мере роста и развития личинки.

Глиальная и нейрональная дифференцировка клеток тканевых и суспензионных нейротрансплантатов в мозге взрослого реципиента

Сухинич Кирилл Константинович

*ФГБУ «Институт Биологии Развития им. Н.К.Кольцова» РАН; Россия; Москва,
transpl@hotmail.com*

Нейротрансплантация – это один из эффективных подходов к стимуляции регенерации в ЦНС. В качестве материала для пересадки применяют малодифференцированные клетки, в частности фетальные. Выбор возраста донора ткани для трансплантации имеет огромное значение. Целью работы было сравнить способности к дифференцировке клеток тканевых и суспензионных трансплантатов эмбрионального неокортекса мышей разного возраста в мозге взрослого реципиента.

Проводилась трансплантация фрагментов либо суспензий единичных клеток (получали ферментативным путем) неокортекса эмбрионов GFP мышей (линии C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J) разных возрастов (E12.5; E14.5; E19.5) в мозг взрослым реципиентам. Через 7, 30, 60 суток проводили иммуногистохимический анализ ткани срезов мозга.

Мы наблюдали, что уже на 7-е сутки после пересадки фрагментов эмбриональной нервной ткани от E12.5, клетки трансплантатов дифференцировались в глиальном направлении. Вероятно, что столь ранняя активация глиогенеза связана с повреждением при заборе материала и/или влиянием микроокружения мозга реципиента. В результате, в трансплантатах от E12.5 может не доставать некоторых типов нейронов из-за раннего переключения с нейрогенеза на глиогенез. При трансплантации ткани других возрастов также выявляется глиальная дифференцировка на 7-е сутки, однако это не противоречит нормальному ходу развития. В качестве маркера дифференцированных нейронов использовались антитела против NeuN. В случае трансплантации фрагментов эмбриональной нервной ткани E12.5 и E14.5, дифференцированные нейроны выявлялись только на 30-е сутки. Согласно литературным данным экспрессия NeuN в неокортексе начинается на E17.5, таким образом идет задержка дифференцировки клеток. В случае пересадки ткани от E19.5, нейроны удается наблюдать уже на 7-е сутки, что согласуется с нормальным развитием, поскольку на этом сроке нейрогенез уже завершен. При трансплантации суспензии эмбриональной нервной ткани от E14.5 и E19.5, нейроны начинают выявляться только на 30-е сутки. Можно предполагать, что отсутствие NeuN положительных клеток на 7-е сутки связано с видом трансплантата. Известно, что при повреждении мозга NeuN положительные клетки в области травмы перестают детектироваться, хотя некоторые могут сохранять свою жизнеспособность. При получении суспензии клетки сильно повреждаются, что приводит к супрессии синтеза белка NeuN.

Таким образом, исследования показали, что при трансплантации эмбриональной нервной ткани идет ускорение глиогенеза и задержка процесса дифференцировки в нейроны. В результате, при пересадке эмбриональной нервной ткани периода раннего нейрогенеза в трансплантатах может не доставать некоторых типов нейронов.

При поддержке РФФИ, грант № 14-04-31117 мол_а.

Гистологическое исследование стробилиции полипа сцифомедузы

Сухопутова Алёна Валентиновна

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия, Ellebi@mail.ru

В жизненном цикле *Aurelia aurita* Linnaeus 1758 присутствует смена полового и бесполого поколений: медузы и полипа соответственно. Полип путем множественных поперечных перетяжек образует эфиры, личинки медуз - этот процесс называется стробилиция. Ход стробилиции и морфогенезы, обеспечивающие этот процесс, на данный момент не достаточно изучены.

С помощью прижизненных наблюдений, гистологических срезов и методов электронной микроскопии в данной работе было изучено развитие эфиры от появления зачатка на теле полипа до отделения сформировавшейся личинки. Исследование было проведено на двух линиях полипов *A. aurita* разного происхождения.

В ходе развития стробилы, полипа на стадии стробилиции, созревает от 3 до 16 эфир, наиболее зрелые находятся на оральном конце. Формирование края эфиры происходит асимметрично, можно выделить ведущую сторону. По данным моего исследования, время развития эфиры из полипоидной ткани очень вариабельно. Однако последовательность этапов развития личинки консервативна. В своей работе мне удалось выделить стадии стробилиции полипов *A. aurita*, описать этот процесс на макроморфологическом и гистологическом уровнях. Интересно, что на начальных этапах развития будущей эфиры эндодерма опережает в развитии эктодерму. Для каждого из этапов есть характерные гистологические и макроморфологические признаки.

По результатам наблюдений, гистологических данных и данных электронной микроскопии была создана таблица развития эфиры, выделены отдельные этапы развития личинки и стробилы в целом, описан ряд морфогенезов, вовлеченных в этот процесс.

Гепатопротекторные свойства мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов, выделенных из печени и сыворотки крови

¹*Сырчина Мария Сергеевна, ¹Налобин Денис Сергеевич, ²Рыбакова Елена Юрьевна,*

³*Мальцев Дмитрий Игоревич, ¹Алипкина Светлана Ивановна,*

¹*Тарлычева Анастасия Александровна*

¹*МГУ имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, кафедра эмбриологии;*²*ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН;*³*ФГБУН «Институт элементарных органических соединений им. А.Н. Несмеянова» РАН, Москва, Россия;*

Denis.Nalobin@gmail.com

Фиброз печени является следствием многих хронических заболеваний и часто приводит к развитию цирроза, печеночной недостаточности, портальной гипертензии. Для пациентов с прогрессирующим фиброзом или его финальными стадиями показана исключительно пересадка печени. Но в то же время современные представления о фиброзе и механизмах его развития

позволяют прибегнуть к поиску альтернативных путей терапии. В настоящее время осуществляется поиск различных эндогенных и экзогенных факторов, способных редуцировать фибротические процессы в печени. В частности, был выделен особый класс соединений – мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ) локализованных во внеклеточном матриксе, способных проявлять репаративные свойства, за счет дополнительной активации клеточных источников регенерации в тканях.

Целью данной работы является изучение влияния МГТБ, выделенных из печени и сыворотки крови, на восстановление печени мыши на фоне токсического повреждения. В эксперименте использовали двухмесячных мышей самцов (C57Bl x CBA)F1. Для создания модели индуцированного фиброза проводили внутрибрюшинное введение CCl_4 2 раза в неделю (1 мкл/г веса в виде 30% масляного раствора). Мыши опытных групп получали с питьевой водой МГТБ или лекарственный препарат Эссенциале Форте в качестве контроля. На 10-ые, 18-ые, 25-ые сутки мышей выводили из эксперимента и проводили забор гистологического материала. Окраску полученных срезов проводили по методу Маллори. Степень развития фиброза оценивали по шкале METAVIR.

На 10-ые и 18-ые сутки инъекции CCl_4 на гистологическом уровне не было обнаружено видимых различий между экспериментальными группами. На 25-ые сутки в группе CCl_4 можно увидеть как формирующиеся септы в порто-портальном направлении, так и участки, где уже произошло практически полное смыкание порто-портальных септ. Такая картина соответствует стадиям F2 – F3 шкале METAVIR. В группах, где на фоне инъекций CCl_4 животные получали МГТБ печени отмечалось выраженное снижение степени фибротизации печени, которое заключалось в наличии единичных незавершённых септ, что соответствует стадиям F0-F1. В группе, где животные получали МГТБ сыворотки крови, гистологическая картина показала чрезвычайно сильное развитие порто-портальных септ, общий вид близок к группе CCl_4 ; похожая ситуация наблюдается в группе с препаратом Эссенциале Форте.

Таким образом, можно сделать вывод о наличии гепатопротекторных свойств у МГТБ, выделенных из печени.

Регенерация пигментной системы прокровов у личинок шпорцевой лягушки

Xenopus laevis D

Точило Ульяна Алексеевна, Рунова Вероника Алексеевна,

Молчанов Александр Юрьевич

*МГУ имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, кафедра эмбриологии, Москва,
Россия, Yanulyana@gmail.com*

У хладнокровных позвоночных животных имеется система, образованная высокоспециализированными клетками, сочетающими в себе свойства и нервной, и эпителиальной ткани – это пигментная система. Она выполняет, в основном, камуфлирующую и терморегуляционную функции. Пигментная система амфибий включает в себя три вида клеток: меланофоры, ксантофоры и иридофоры. Они появляются в течение онтогенеза из клеток нервного гребня, расселившихся по дерме. Первыми становятся заметны меланофоры. Их отличительной чертой является наличие пигментных гранул, наполненных меланином. Меланофоры, как благодаря собственной фоточувствительности, так и под действием

эндокринного сигнала способны перемещать гранулы к центру клетки и к периферии. Очевидно, что данное качество требует от клетки высокой степени организации внутриклеточной среды, но, тем не менее, меланофор способен к митотическому делению. Благодаря митозу и дифференцировке меланофоров *de novo* осуществляется увеличение числа этих клеток у головастика в течение почти всего периода личиночного развития. Последние исследования показали [1], что у личинок шпорцевой лягушки присутствуют два периода, когда дифференцировка происходит наиболее активно (I этап - стадии 34-46; III этап - стадии 52-56). Стадии определялись по таблицам нормального развития (Nieuwkoop and Faber 1956). В промежутке между 47 и 51 (II этап) численность клеток мало изменяется, меланофоры увеличиваются в размерах. Характер митотической и пролиферативной активности значительно варьирует в зависимости от функционального состояния пигментной системы, связанной с фоновой адаптацией.

В работе впервые был выявлен процесс восстановления дермальных меланофоров после подкожного механического разрушения клеток у личинок шпорцевой лягушки. Операцию проводили под наркозом, надавливая стеклянным капилляром на кожу личинки, и проводя его от вентро-латеральной глаза до проекции аорты. При этом ран не возникало. В результате операции на оперированном участке под кожей наблюдали разрушение меланофоров. В течение последующих двух дней участок полностью очищался от пигментных гранул за счет работы макрофагов. Опытные и контрольные животные содержались при постоянной температуре и низкой освещенности на черном фоне. Рисунок распределения пигмента в клетках был постоянным. Наблюдение проводили в течение 12 дней, в течение которого, как правило, личинки проходили 2-3 стадии в развитии. Характер восстановления зависел от стадии развития личинки.

Для двух опытных групп 48-50 стадии и 52-53 показано, что прирост количества меланофоров на исследуемом участке в течение периода восстановления выше, чем у контрольных групп (контр/опыт 5/18% и 21/51%, соответственно). Показано, что у личинок в опытной группе на 48-50 стадии наблюдалась тенденция увеличения митотической активности меланофоров по сравнению с контролем, что нехарактерно для II этапа, тогда как у группы 52-53 стадии митозов в опытной группе не было. Однако дифференцировка новых меланофоров в этой опытной группе происходит менее активно, по сравнению с личинками 48-50 стадий. Эти данные свидетельствуют о различиях регенерационного потенциала пигментной системы, соответствующего ее онтогенетическим особенностям [1] на II и III этапе.

Использование методов акустической микроскопии для исследования скелета японского перепела *Coturnix coturnix japonica*

Храмцова Елена Александровна

*Институт биохимический физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия,
alyonushk@gmail.com*

Развитие современной биологии и медицины требует постоянного совершенствования методов и технологий исследования живых объектов. Биологические системы являются наиболее сложными в исследовании, а большинство методов не дают возможность изучать биологические объекты без активного воздействия на них. Необходимость проведения исследований без грубого вмешательства в процессы жизнедеятельности объекта очевидна, и поэтому поиск и разработка новых методов, приближающих нас к исследованию живых систем в их естественном состоянии, - сохраняет свою актуальность.

Одними из перспективных для проведения прижизненного морфологического и микроанатомического анализа неповреждающим способом являются методы, основанные на использовании ультразвука. Ультразвук легко проникает в толщу плотных непрозрачных тканей; визуальные изображения, получаемые с помощью ультразвуковых аппаратов, имеют хороший контраст без применения красителей; короткоимпульсные ультразвуковые сигналы низкой интенсивности не оказывают негативного влияния на объект и на исследователя. Однако применение ультразвуковых систем в биологии развития до недавнего времени сдерживалось их низким разрешением. Разработка нового класса приборов – акустических микроскопов, - открыла новые возможности применения ультразвуковых методов в биологии развития.

Методом ультразвуковой микроскопии высокого разрешения были проведены исследования костной ткани эмбрионов японского перепела (*Coturnix coturnix japonica dom.*) на разных стадиях развития. Особенностью костной ткани является высокий акустический импеданс костной ткани, а так же цилиндрическая форма костей, что провоцирует возникновение артефактов на стадии сканирования и трудности при интерпретации результатов. При подготовке к исследованию, особое внимание было уделено позиционированию объекта, фокусировке и выбору ширины акустических ворот.

Для детального анализа и подтверждения акустомикроскопических данных, были изготовлены препараты по методике Доусона.

В результате всех полученных с помощью акустической микроскопии данных, составлены таблицы нормального развития, что позволило шагнуть в ультразвуковых исследованиях дальше и проанализировать эмбрионы, находящиеся в паталогическом состоянии, параллельно сравнивая их с нормальным развитием без дополнительных гистологических исследований. При анализе влияния факторов космического полета, достаточно четко удалось установить стадию, на которой погиб эмбрион (если произошла преждевременная гибель), изменения кальциевого обмена, а так же установить возможные причины гибели эмбриона (недоразвитие систем и органов).

Гены семейств *Ag1* и *Ras-dva* участвуют в процессе регенерации у низших позвоночных

Шандарин Игорь Николаевич

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва,
shandarin.igor@yandex.ru*

Низшие позвоночные (рыбы, амфибии) способны эффективно регенерировать повреждённые ткани и органы, в отличие от высших позвоночных (рептилии, птицы, млекопитающие). Недавно мы обнаружили гены из семейств *Ag1* и *Ras-dva*, которые пропадают именно у высших позвоночных. Мы предположили, что эти гены могут быть вовлечены в регуляцию процессов регенерации у низших позвоночных, а их утрата высшими позвоночными обусловила резкое снижение способности к регенерации у последних. Ранее нами было показано, что гены семейства *Ag1* сильно активируются в ходе регенерации у головастиков лягушки *Xenopus laevis*. Целью настоящей работы было изучение активности и роли генов *Ag1* и *Ras-dva* в процессе регенерации на модели регенерации плавников у рыб вида *Danio rerio* и конечностей у головастиков лягушки *Xenopus*.

В работе были использованы следующие методы: ПЦР в реальном времени (для сравнения уровня экспрессии генов на разные дни после ампутации), гибридизация *in situ* (для

локализации экспрессии) и инъекции морфолиновых олигонуклеотидов (для блокирования действия определённого гена).

В результате было установлено, что ген *Ag1*, кодирующий секретируемый белок из группы дисульфид изомераз белков, в норме активно экспрессируется в эпителии плавников рыбы *Danio*. Было показано, что уровень экспрессии гена *Ag1* в плавниках рыбы снижается в течение первых двух дней после ампутации, но возрастает на 5ый день до базового уровня. Получены предварительные данные, указывающие на то, что ингибирование активности гена *Ag1* в хвостовых плавниках *Danio* у животных опытной группы приводит к явному подавлению процессов регенерации, по сравнению с контрольной группой. Также удалось установить, что в норме гены *Ras-dva1* и *Ras-dva2*, относящиеся к семейству малых ГТФаз Ras-dva, очень слабо экспрессируются в тканях зачатков конечностей *Xenopus* и плавников *Danio*. При ампутациях соответствующих придатков тела на первый и второй день после ампутации был детектирован активный рост уровня экспрессии генов *Ras-dva1* и *Ras-dva2* в регенератах зачатков конечностей *Xenopus* и плавников *Danio*. В сумме полученные данные указывают на вовлеченность генов *Ag1* и *Ras-dva* в регуляцию процессов регенерации у низших позвоночных.

Грант РФФИ 13-04-01516.

Создание линий эмбриональных стволовых клеток мыши, коэкспрессирующих нейрональный маркер β -тубулин III и EGFP

Шевцова Анастасия Андреевна

ФГБОУ ВПО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, факультет естественных наук, Новосибирск, Россия; ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, shevtcova.anastasya@gmail.com

Одним из важных направлений биологии развития является изучение нейрогенеза. На сегодняшний день есть несколько методов, позволяющих целенаправленно и высокоэффективно изменять геном: ZFN, TALEN и CRISPR/Cas9. Для изучения нейрогенеза мы решили создать линию эмбриональных стволовых (ЭС) клеток с EGFP под контролем эндогенного промотора β -тубулина III, маркера нейрональных клеток.

Мы получили пять линий ЭС клеток мыши с диплоидным числом хромосом. Для сайт-специфической встройки мы использовали метод TALEN. Трансфекция ЭС клеток конструкцией EGFP/PGAPuro-PA позволила получить клоны, у которых вместо стоп-кодона гена β -тубулина III вставлена кассета, содержащая репортерный ген EGFP и селективный ген устойчивости к пуромицину. Всего мы получили 179 клонов, 6 из них имели целевую встройку. После проведения цитогенетического анализа было выявлено три клон с диплоидным числом хромосом. Для проверки функциональности трансгена клоны ЭС клеток дифференцировали в монослое в нейральные клетки. На 9-й и 13-й дни дифференцировки в телах и отростках клеток идентифицировали экспрессию EGFP. Специфичность дифференцировки в нейроны подтвердили с помощью иммуноцитохимического окрашивания на NF200, компонент промежуточных микрофиламентов нейронов. Для усиления сигнала EGFP в нейрональных клетках мы удалили кассету гена устойчивости к пуромицину из клонов ЭС клеток с помощью обработки плазмидой CRE-2A-GFP.

Таким образом, мы получили линии трансгенных ЭС клеток, в которых EGFP коэкспрессируется с эндогенным геном β -тубулина III. Эти линии можно использовать для изучения процессов нейральной дифференцировки *in vitro*. В дальнейшем мы планируем получить химерных животных введением ЭС клеток в бластоцисту. Это позволит создать новую трансгенную линию мышей для изучения нейрогенеза не только *in vitro*, но и *in vivo*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-31205 мол_а.

Характер и пути влияния пролактина на морфофункциональные изменения в стареющих яйцеклетках домашней коровы

Шедова Екатерина Николаевна

Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства, Россия, Подольск, shedvek@yandex.ru

Основным фактором, определяющим фертильность самок у млекопитающих, является качество ооцитов, которое снижается в процессе постовуляторного старения. При этом функциональные изменения, происходящие при постовуляторном старении яйцеклеток *in vivo*, аналогичны изменениям, протекающим в созревших ооцитах во время пролонгированного культивирования *in vitro*. Следовательно, культивирование ооцитов, достигших метафазы второго деления мейоза, представляет удобную модель для изучения роли различных физиологических факторов, в том числе эндокринных, в механизмах защиты овулировавших яйцеклеток от преждевременного старения. При использовании данной модели в представленной работе были исследованы характер и пути влияния гипофизарного гормона пролактина на состояние хромосом в метафазе II и спонтанную партеногенетическую активацию яйцеклеток домашней коровы (*Bos taurus taurus*). С этой целью созревшие *in vitro* ооциты культивировали в составе ооцит-кумулюсных комплексов или изолированно в течение 12-48 ч в присутствии и в отсутствие бычьего пролактина (50 нг/мл) и затем подвергали цитогенетическому анализу. В процессе пролонгированного культивирования обнаружено постепенное возрастание ($P < 0.01$) частоты аномальных изменений морфологии метафазных хромосом в окруженных кумулюсом ооцитах с 16.6% (0 ч) до 30.0% (12 ч), 56.3% (24 ч) и 72.0% (36 ч). Внесение пролактина в среду приводило к снижению ($P < 0.001$) этой частоты до 15.6%, 38.6% и 52.6% через 12, 24 и 36 ч соответственно. Удаление клеток кумулюса обуславливало сходное торможение деструктивных изменений хромосом ($P < 0.01$). В то же время пролактин не влиял на дегенеративные трансформации метафазных хромосом в изолированных ооцитах. К 36 ч пролонгированного культивирования у 20.7% ооцитов, окруженных кумулюсом, наблюдалось спонтанное снятие блокады мейоза II, тогда как пролактин снижал ($P < 0.001$) долю таких клеток до 5.4%. В отсутствие клеток кумулюса частота партеногенетической активации ооцитов не отличалась от таковой, выявленной в ооцит-кумулюсных комплексах. В свою очередь, пролактин уменьшал долю изолированных яйцеклеток с признаками партеногенетической активации через 48 ч культивирования (с 18.7% до 6.0%, $P < 0.001$). Таким образом, пролактин может тормозить деструктивные изменения метафазных хромосом в процессе старения яйцеклеток. Этот гормональный эффект, очевидно, связан с ингибированием негативного влияния клеток кумулюса, сопряженных со зрелыми ооцитами. Кроме того, пролактин способен поддерживать блокаду мейоза II путем прямого воздействия на стареющие гаметы. В то же время клетки кумулюса не влияют на спонтанную партеногенетическую активацию яйцеклеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 13-04-01888).

Влияние осмотического шока на формирование колоний индуцированных стволовых клеток из клеток мышинных эмбриональных фибробластов линий C57BL/6 и C57BL/6Kaiso

Шумская Валерия Сергеевна, Жигалова Н.А., Прохорчук Е.Б.

Метил-ДНК-связывающий белок Каизо является членом семейства ВТВ/POZ (Broad complex, Tramtrak, Bric á brac/Pox virus, and Zinc finger) транскрипционных факторов и содержит два функциональных домена: N-концевой ВТВ/POZ домен и три «цинковых пальца» C2H2 типа на C-конце. Генетический нокаут гена *Каизо* у мышей не приводит к ярко выраженному фенотипу, мышцы остаются здоровыми и фертильными.

Китайские учёные обнаружили, что в условиях культивирования клеток в среде с повышенным содержанием соли (добавление 100mM NaCl) во время процесса репрограммирования, опосредованного вирусами несущими «факторы Яманаки» (Oct3/4, Sox2, c-Мус и Klf4), значительно увеличивается количество индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Подобное усиление репрограммирования было связано с активацией генов и изменением уровня метилирования генома.

С другой стороны в нашей лаборатории было показано, что Каизо теряет посттрансляционную модификацию – сумоилирование и меняет свою локализацию в клетках млекопитающих в условиях гиперосмотического стресса.

Поэтому целью нашей работы явилось изучить роль белка Каизо в процессе формирования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) в нормальных условиях и в условиях гиперосмотического стресса.

Мы использовали мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФ) двух клеточных линий: линия дикого типа C57BL/6 и с генетическим нокаутом по гену *Каизо* – линия C57BL/6/Kaiso. МЭФ были трансфицированы лентевирусной конструкцией, несущей «факторы Яманаки» (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мус) и в процессе репрограммирования одна группа клеток культивировалась в стандартных условиях, а вторая группа в среде с добавлением 100mM NaCl.

Количество клонов ИПСК оценивали путем обсчета количества позитивно окрашенных колоний на щелочную фосфатазу. Мы показали, что формирование ИПСК происходит значительно активнее в клетках линии C57BL/6/Kaiso, чем в клетках дикого типа C57BL/6. В свою очередь, гораздо меньше колоний из МЭФ дикого типа образуется в ответ на добавление 100mM NaCl, а в клетках C57BL/6/Kaiso добавление соли усиливает формирование колоний. Оказалось, что МЭФ C57BL/6/Kaiso, репрограммируются в ИПСК активнее.

Мы предполагаем, что Каизо может быть одним из ключевых факторов в молекулярных процессах, связанных с ответом клеток на гиперосмотические условия при репрограммировании.