

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ISSN 0041-3771

ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIIYA

2014. Том 56
2014. Vol. 56

9



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

«НАУКА»

и как они соотносятся со структурой хроматина в последних, остается открытым.

Инфузории являются удобной модельной системой для выяснения этих вопросов. Каждая клетка инфузорий содержит одновременно ядра двух типов — транскрипционнонеактивные, мелкие генеративные ядра (микронуклеусы) и (обычно одно) большое полиплоидное активное соматическое ядро (макронуклеус). Все исследованные к настоящему времени инфузории можно разделить на две большие группы: виды, где геном макронуклеусов представлен молекулами ДНК генного размера (0.5—25 т. п. н.) и ДНК размером в несколько сотен т. п. н. (ДНК субхромосомного размера). В данной работе исследования проводили на инфузориях *Paramecium tetraurelia*, которая относится к субхромосомному типу (размер молекул ДНК макронуклеуса 50—800 т. п. н.).

Для определения распределения сайтов репликации в макронуклеусе *P. tetraurelia* делящиеся клетки отсаживали в чашки Петри, в которые добавляли BrdU через разные сроки после деления. Сайты репликации визуализировали в конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 с помощью флуоресцентно меченных антител. Обнаружено, что на всех стадиях S-фазы сайты репликации распределяются более или менее равномерно по всему объему макронуклеуса.

Электронно-микроскопические данные показывают, что хроматин макронуклеуса в инфузориях *P. tetraurelia* имеет вид телец размером ~0.1—0.2 мкм, равномерно распределенных по объему макронуклеуса. При снижении активности структура хроматина ядра практически не изменялась. Полученные результаты отличаются от результатов, полученных нами в предыдущих работах на инфузориях *Bursaria truncatella*. В них при голодании тельца, расположенные в центральной части макронуклеуса, увеличиваются в размере, сближаются и агрегируют, в то время как тельца на периферии макронуклеуса остаются одиночными. При этом и распределение сайтов репликации в макронуклеусе *B. truncatella* на протяжении S-фазы было неравномерным: в периферической части ядра располагаются ранореплицирующиеся гены, в то время как в центральной части — позднеплицирующиеся.

Полученные данные могут свидетельствовать о разной пространственной организации ядер высших эукариот и соматических ядер инфузорий, обусловленной различной молекулярной организацией их геномов. В частности, если у Metazoa хроматин с ранореплицирующимися генами находится в центральном компартменте ядра, то в макронуклеусе *P. tetraurelia* рано- и позднеплицирующиеся гены распределены более или менее равномерно по всему объему соматического ядра.

РИБОЗИДЫ НИКОТИНАМИДА И НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ — КЛЮЧЕВЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА NAD В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА.

© В. А. Ливинская,¹ К. А. Шабалин,¹ К. Б. Неринский,¹ М. А. Ходорковский,¹ М. Циглер,² А. А. Никифоров.^{1,3}

¹НИК «Нанобиотехнологии», С.-Петербургский государственный политехнический университет, veronika.livinskaya@gmail.com, ²Университет г. Бергена, Норвегия, и ³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Никотинамидадениндинуклеотид (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) является переносчиком электро-

нов и водорода в окислительно-восстановительных реакциях ключевых метаболических путей. Не так давно было установлено, что NAD также является субстратом для нескольких семейств регуляторных белков, контролирующих такие ключевые процессы в клетке, как экспрессия генов, правильное прохождение по клеточному циклу, репарация ДНК, апоптоз и старение. NAD-зависимые регуляторные ферменты АДФ-рибозилтрансферазы, поли-АДФ-рибозилполимеразы, деацетилазы белков (сиртуины) и АДФ-рибозилциклазы используют NAD в качестве субстрата и расщепляют его на никотинамид и АДФ-рибозу, поэтому клетке необходимо постоянно синтезировать NAD, чтобы пополнять его внутриклеточные запасы. На сегодняшний день основные пути биосинтеза NAD описаны достаточно хорошо, однако мало известно о взаимодействиях между внутри- и внеклеточными путями NAD и его ключевых метаболитов. Основными предшественниками синтеза NAD являются никотинамид (Nam), никотиновая кислота (NA) и рибозиды никотинамида (NR) и никотиновой кислоты (NAR). Ранее нами было показано, что все метаболиты NAD, добавленные во внеклеточную среду, поддерживают синтез внутриклеточного NAD, однако динуклеотиды (NAD и NAAD) и мононуклеотиды (NMN и NAMN) расщепляются до соответствующих рибозидов NR и NAR, которые входят в клетку посредством описанных переносчиков нуклеозидов.

В данной работе, используя экспериментальную модель на основе клеток печени человека HepG2, мы показали, что рибозиды NR и NAR могут выходить из одних клеток и выступать в роли предшественников для синтеза NAD в других клетках, независимо от использования Nam и NA. В клетках HepG2 отсутствует фермент NAPRT, который отвечает за синтез NAD из NA. При этом синтез NAD из Nam подавляли ингибитором фермента NamPRT. После временной трансфекции клеток HepG2 вектором, кодирующим фермент NAPRT, выживали не только трансфицированные клетки, но и большинство нетрансфицированных соседних клеток. Это означает, что метаболиты NAD, отличные от Nam и NA, выходят из трансфицированных клеток и выступают в роли предшественников для синтеза NAD в нетрансфицированных клетках. Выход рибозида NAR из клеток в питательную среду был подтвержден методом ЯМР-спектроскопии. Однако механизм образования рибозидов NR и NAR в клетках человека на сегодняшний день неизвестен. В рамках данной работы мы подтвердили гипотезу о том, что цитозольные 5'-нуклеотидазы человека могут дефосфорилировать мононуклеотиды NMN и NAMN с образованием соответствующих рибозидов NR и NAR. Нами было показано, что 5'-нуклеотидазы человека CN-II и CN-III дефосфорилируют NMN и NAMN in vitro и in vivo.

Таким образом, мы впервые описали механизм образования рибозидов NR и NAR в клетках человека, а также продемонстрировали их способность выходить из одних клеток и выступать в роли предшественников синтеза NAD в других клетках.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-01765-а и 14-04-32117-мол_а).

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕСИММЕТРИЧНОГО ДИМЕТИЛГИДРАЗИНА НА СТРУКТУРУ СИНАПТОСОМ-

НОГО КОМПЛЕКСА СПЕРМАТОЦИТОВ У МЫШЕЙ. © А. В. Ловинская,¹ С. Ж. Колумбаева,¹ С. К. Абилов,^{2,3} Т. М. Шалахметова,¹ О. Л. Коломиец.² ¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, alovinska@rambler.ru, ²Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, и ³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова.

Космическая индустрия, стремительно развивающаяся в последние десятилетия, способствует появлению новых экологически опасных факторов, негативно влияющих на состояние окружающей среды и здоровье человека. Результаты российских и казахстанских комплексных экспедиционных работ на местах падения остаточных частей космических ракет свидетельствуют о наличии компонента ракетного топлива несимметричного диметилгидразина (НДМГ, гептил) и продуктов его окисления в почве, воде и растениях в концентрациях, превышающих ПДК. Поэтому всестороннее изучение влияния данного ксенобиотика на организм представляет несомненную актуальность.

Целью настоящего исследования явилось изучение генотоксического действия НДМГ на синаптомемный комплекс (СК) половых клеток. Объектом исследования явились самцы лабораторных мышей линии BALB/cYwal в возрасте 3 мес. Для интоксикации использовали водный раствор НДМГ, введение осуществляли внутрибрюшинно в дозах 6.6 и 66.0 мг/кг; время воздействия — 3 ч. Получение тотальных препаратов распластанных СК проводили по методу Наварро и соавторов (Navarro et al., 1981) с модификациями Коломиец и соавторов (Kolomiets et al., 2010). Проводили иммуноцитохимический анализ СК. СК и осевые элементы хромосом окрашивали с помощью кроличьих антител против белка SCP3 при разведении 1 : 250 (Abcam, Cambridge, Великобритания); гистон γ H2AX выявляли с помощью мышиных антител против гистона γ H2AX, 1 : 200 (Abcam, Cambridge, Великобритания); центромеры — с помощью IgG человека против белков кинетохора (CREST), 1 : 500 (Antibody Incorporated, California, США). В качестве вторичных антител использовали соответственно бычьи IgG против IgG кролика, конъюгированные с FITC, в разведении 1 : 400 (Invitrogen, США); козы IgG против IgG человека, конъюгированные с Alexa Fluor 546, 1 : 200 (Invitrogen, США); козы IgG против IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 546, 1 : 800 (Jackson, США).

У интактных животных сперматоциты с поврежденным СК составили 13.07 %. При этом были выявлены клетки с единичной фрагментацией СК (12.16 %), с изгибами и петлями СК (6.25 %), а также клетки с ассоциацией аутосом с XY-бивалентом (1.71 %). При введении животным НДМГ в дозах 6.6 и 66 мг/кг уровень клеток с поврежденным СК статистически значимо возрос по сравнению с контролем и составил соответственно вводимым дозам 74.19 и 80.91 %. Спектр наблюдаемых повреждений СК был достаточно широким. Имела место фрагментация СК (мейотическая «катастрофа» и единичная фрагментация), которая составила 38.67 и 51.45 %. Клетки с ассоциацией аутосом и полового бивалента составили 25.17 и 38.12 %, с изгибами и петлями СК — 53.17 и 60.42 % соответственно при минимальной и максимальной используемых дозах. НДМГ также вызывал нарушение формирования полового тельца (1.22 и 2.33 %), кольцевые СК (1.22 и 4.44 %) и десинапсис половых хромосом (2.18 и 7.24 %) соответственно при дозах

6.6 и 66 мг/кг. Аналогичные нарушения отсутствовали в половых клетках интактных животных.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено генотоксическое действие НДМГ на половые клетки мышей, проявившееся в изменении структуры синаптомемного комплекса сперматоцитов.

Работа выполнена в рамках проекта МОН РК ГР № 0112РК00580.

ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ АГРЕГАЦИИ ХРОМАТИНА В ЯДРАХ ООЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА НА ИНИЦИАЦИЮ МЕЙОТИЧЕСКОГО СОЗРЕВАНИЯ И ФОРМИРОВАНИЕ МЕТАФАЗНЫХ ПЛАСТИНОК. © Д. Ф. Салимов,¹ А. Лопата,² Я. Нагаи,³ Т. В. Лисовская,¹ И. Г. Портнов,¹ А. Мива,³ Д. М. Отсуки.³ ¹Центр семейной медицины, Екатеринбург, Россия, dfsalimov@mail.ru, ²Отделение акушерства и гинекологии Королевского госпиталя, Мельбурн, Австралия, и ³Клиника Нагаи, Саитама, Япония.

Одной из отличительных особенностей структурно-функциональной организации ядра гамет и ядра соматических клеток является формирование кариосферы: агрегация хроматина вокруг неактивного ядрышка (центрального тела). Кариосфера описана в ооцитах профазы мейоза для большого количества видов беспозвоночных, позвоночных животных и человека (Gruzova, Parfenov, 1993). Установлено, что после инициации мейотического созревания ооцитов человека хромосомы сохраняют агрегированное состояние вплоть до формирования веретена первого деления мейоза (Otsuki, 2007). По степени агрегации хроматина вокруг центрального тела кариосферы выделяют два типа кариосфер — с высокой (SN) и низкой (NSN) степенями конденсации хроматина (Combelles et al., 2002; Miyara et al., 2003). На сегодняшний день является актуальным изучение ультраструктуры и функций кариосферы.

Использовали GV-ооциты, полученные после контролируемой овариальной суперовуляции. Микрофотографии кариосфер двух групп GV-ооцитов (группа SN и группа NSN) оценивали в динамике с использованием рельефного и дифференциального интерференционного контрастов. Время инициации созревания — разрыва ядерной оболочки (GVBD) — и время завершения созревания — экстрезии первого полярного тела (PB) — определяли методом цейтраферной микровидеосъемки (Primo Vision, Vitrolife, Швеция) с интервалом 5 мин. Биопсию веретена первого мейотического деления проводили с использованием лазера (OCTAX, MTG, Германия) и микроманипуляционной установки (Narishige, Япония) в культуральной среде Universal IVF Medium (MediCult, Орджио, Дания) с добавлением 5 мкг/мл цитохалазина D (Sigma). Выделенные метафазные пластинки фиксировали на стеклах и исследовали на уровень анеуплоидий методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) по 5 хромосомам (набор MultiVision PB, Vysis, США).

Исследовано 109 GV-ооцитов. Обнаружена зависимость между степенью агрегации хроматина на поверхности центрального тела кариосферы и способностью GV-ооцитов к созреванию в культуре in vitro. В ооцитах группы SN уровни GVBD и экстрезии полярного тела составили 87.2 и 74.4 %, тогда как в группе NSN — 45.2 и 19.4 % соответственно ($P < 0.01$). В то же время в группе NSN-ооцитов, вступивших в созревание, среднее время