

Рисунок 1. Анализ экспрессии гена *At5g61270*.

М - маркеры размера ДНК;

1), 2) растения дикого типа расы Columbia;

3) трансгенные линии с суперэкспрессией части гена *At1g12860*(*superHALF2-ICE2*), содержащей 2-5 экзоны;

4) трансгенные линии с суперэкспрессией полноразмерной копии гена *At1g12860* (*superICE2*) .

Выводы

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что ген *At1g12860*, наряду с контролем морфогенеза, участвует в детерминации ответа клеток *A. thaliana* на холодовой стресс. При этом, так же как ген *ICE1*, исследуемый нами ген включен в каскад регуляторных событий, когда под его контролем находится вторичный активатор транскрипционной активности- ген *At5g61270*. Функция этого гена до последнего времени оставалась неизвестной.

Литература

1. Томилов А.А., Томилова Н.Б., Огаркова О.А., Тарасов В.А. Инсерционный мутагенез *Arabidopsis thaliana*: Увеличение эффективности трансформации прорастающих семян в результате предобработки их ультразвуком // Генетика. 1999. Т. 35. № 9. С. 1214-1222.
2. Ганеева Т.А., Огаркова О.А., Тарасов В.А., Вологовский И.Д. Новые вектора для трансформации двудольных растений // Генетика. 1995. Т. 31. № 8. С. 1085-1091.
3. Томилова Н.Б., Томилов А.А., Огаркова О.А., Тарасов В.А. Идентификация гена, мутация в котором обуславливает возникновение некрозов семядолей при развитии проростков *Arabidopsis thaliana* // Генетика. 2001. Т. 37. №1. С. 36-45.
4. Фурсова О.В., Погорелко Г.В., Авсюк А.Ю., Томилова Н.Б., Томилов А.А., Тарасов В.А., Огаркова О.А. Идентификация потенциального гена – регулятора развития семядолей у проростков *Arabidopsis thaliana*. Докл. Акад. Наук. 2004. Т. 395. №. 5. С. 1-3.
5. Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, Zhu JK. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* // *Genes Dev.* 2003. V. 17. No. 8. P. 1043-54.
6. Thomashow MF. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999,50:571-599

ШЕМЕТУН О.В., ТАЛАН О.О.

Науковий Центр радіаційної медицини АМН України

Україна, 040050, Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail: lshem@ukr.net

МОДЕЛЮВАННЯ РАДІАЦІЙНО ІНДУКОВАНОГО ЕФЕКТУ СВІДКА В УМОВАХ IN VITRO

Різномічне вивчення ефекту свідка є одним з пріоритетних напрямків сучасної медичної генетики. Актуальність його дослідження зумовлюється необхідністю

розкриття механізмів розвитку радіаційно індукованої патології (і, зокрема, онкологічної), яка може бути спричинена не лише прямим радіаційним ушкодженням клітин-мішеней, а й вторинними біологічними змінами в оточуючих неопромінених клітинах.

Найбільш важливі результати з вивчення закономірностей і механізмів розвитку ефекту свідка отримані при використанні експериментального моделювання цього феномену в умовах *in vitro*. Принциповими вимогами при створенні таких моделей є необхідність опромінення лише частини клітин і можливість розрізнення популяцій опромінених та неопромінених клітин при проведенні досліджень. Тому моделювання радіаційно індукованого ефекту свідка в умовах *in vitro* здійснюється, головним чином, з застосуванням альфа-опромінення. Такі моделі дозволяють реєструвати треки від проходження альфа-частинок, що перетинають клітини, безпосередньо пошкоджуючи їх. Варто зауважити, що вперше радіаційно-індукований ефект свідка був описаний Н. Nagasawa і J. Little (1992 р.) саме з застосуванням альфа-опромінення [1].

Використання при дослідженні радіаційно-індукованого ефекту-свідка рентгенівського та гамма випромінювань здійснюється, головним чином, на змішаних міжвидових культурах клітин ссавців, що дає можливість розрізняти опромінені й неопромінені популяції клітин. З застосуванням таких моделей досліджують апоптоз, диференціацію, проліферацію, трансформацію в клітинах-свідках [2, 3].

Вивчення ефекту свідка в клітинах людини вимагає застосування нових методичних підходів. Нами розроблено модель для виявлення ефекту свідка на цитогенетичному рівні з використанням змішаної культури лімфоцитів периферичної крові людини. Така модель складається з популяції опромінених рентгенівськими чи гамма променями в умовах *in vitro* або *in vivo* лімфоцитів та популяції неопромінених лімфоцитів осіб іншої статі, що використовуються як свідок [4, 5]. Головними цитогенетичними маркерами для розрізнення опромінених і неопромінених лімфоцитів при сумісному культивуванні *in vitro* в такій моделі є чоловічі (Y) та жіночі (XX) статеві хромосоми. Вказана модель апробована нами при оцінці цитогенетичного ефекту в неопромінених лімфоцитах людини при культивуванні в змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненими рентгенівськими променями в умовах *in vitro* в дозах 0,25 та 1 Гр [6].

Метою представленої роботи було встановлення можливості індукції ефекту свідка в неопромінених лімфоцитах крові людини при їх сумісному культивуванні в змішаних культурах з опроміненими *in vivo* лімфоцитами.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження були лімфоцити периферичної крові, отримані від 6-ти донорів (3-х чоловічої і 3-х жіночої статі), які заперечували свідомий контакт з іонізуючою радіацією і склали групу контролю та 7-ми ліквідаторів наслідків ліквідації аварії на ЧАЕС, які зазнали опромінення в дозах 1,01-2,37 Гр.

Кров культивували за загальноприйнятим напівмікрометодом D.A. Hungerford. При постановці змішаних культур дотримувалися цього ж методу, але до культуральної суміші в пробірку додавали по 0,3 мл крові від двох осіб різної статі, що розрізнялись за статтю (в контролі) та наявністю опромінення *in vivo* (при моделюванні радіаційно індукованого ефекту свідка).

Цитогенетичний аналіз виконували з застосуванням диференційного G-забарвлення метафазних хромосом з використанням барвника Гімза та трипсину за методом M.Seabright. Це дозволило точно ідентифікувати статеві хромосоми та морфологічні варіанти соматичних хромосом.

Отримані дані опрацьовували з використанням методу порівняння середніх величин за Ст'юдентом-Фішером.

Результати та обговорення

В результаті проведених досліджень встановлено, що частота аберантних клітин та рівень аберацій хромосом ($2,56 \pm 0,53$ на 100 метафаз) в змішаних культурах неопромінених лімфоцитів донорів знаходились на популяційному рівні.

Цитогенетичне обстеження осіб, які зазнали опромінення внаслідок ліквідації аварії на ЧАЕС, показало, що рівні аберацій хромосом в їх лімфоцитах перевищували показники неопроміненого контролю ($p < 0,05$) і статистично не розрізнялись при окремому культивуванні ($5,63 \pm 0,98$ на 100 метафаз) та в змішаних культурах з неопроміненими лімфоцитами осіб іншої статі ($5,21 \pm 0,89$ на 100 метафаз) ($p > 0,05$). Спектр аберацій хромосом не залежав від способу культивування (рис. 1).

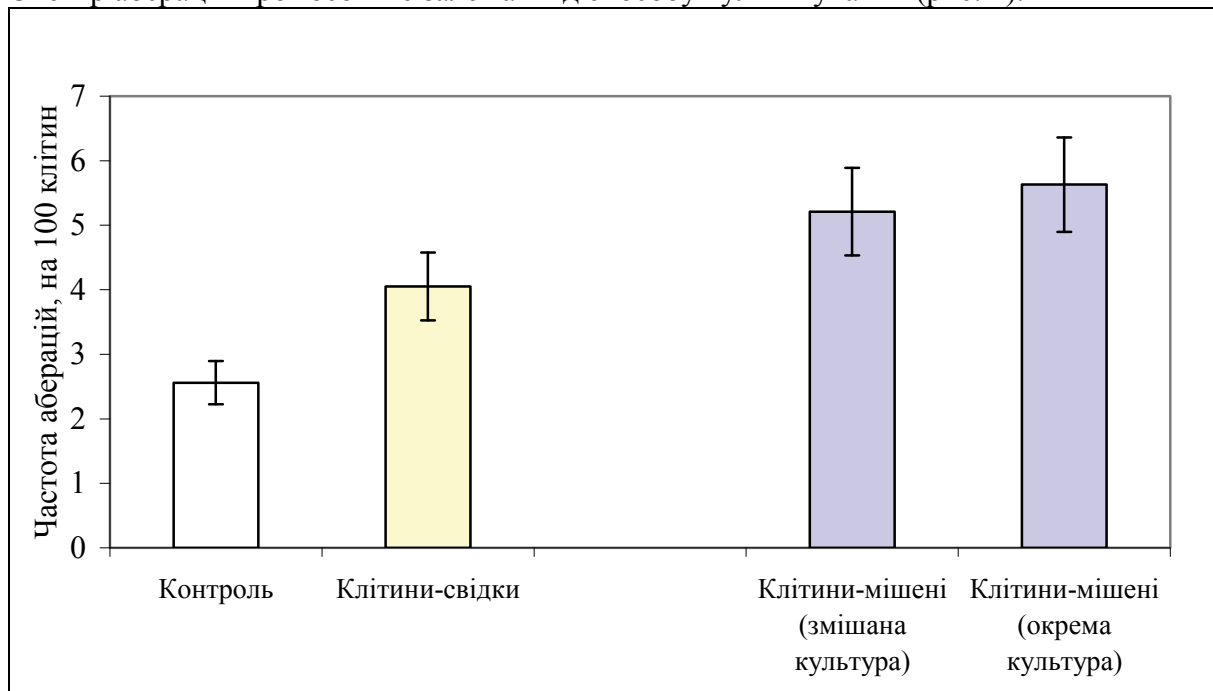


Рис. 1. Частота аберацій хромосом в неопромінених клітинах-свідках та опромінених *in vivo* клітинах-мішенях при культивуванні в змішаних культурах

Цитогенетичний аналіз неопромінених лімфоцитів периферичної крові, що культивувались в змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненими *in vivo*, показав, що частота аберацій хромосом ($4,05 \pm 0,64$ на 100 метафаз) в клітинах-свідках статистично перевищувала контрольний рівень аберацій в змішаний культурах неопромінених лімфоцитів ($p < 0,05$).

Аналіз спектру виявлених пошкоджень показав зростання частоти аберацій хроматидного типу в неопромінених клітинах, що культивувались з опроміненими, до $2,49 \pm 0,50$ порівняно з $1,12 \pm 0,42$ на 100 метафаз в контролі ($p < 0,05$). (рис. 2). Рівень маркерів радіації в клітинах-свідках був на рівні контрольного.

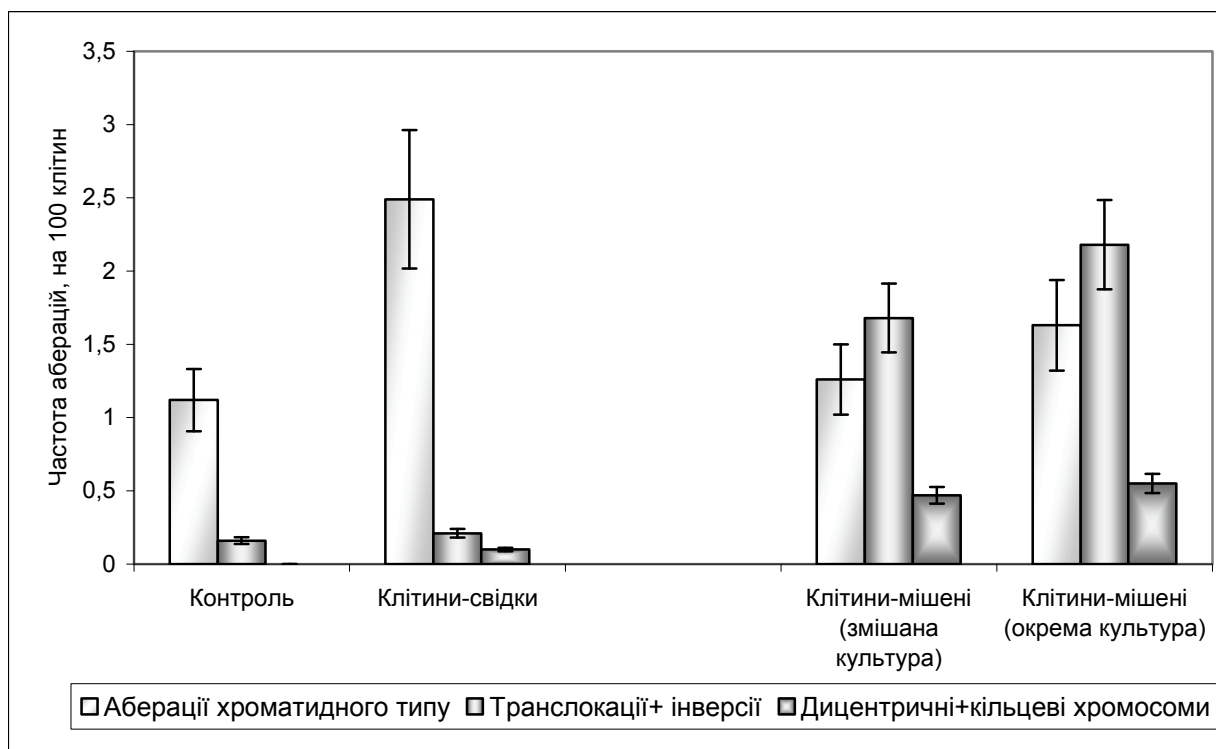


Рис. 2. Частота аберацій хроматидного типу та маркерів дії радіації в клітинах-свідках та опромінених *in vivo* клітинах-мішенях при культивуванні в змішаних культурах

Наведені дані щодо рівня і спектру аберацій хромосом в клітинах-свідках (зростання частоти пошкоджень хроматидного типу та стабільний рівень транслокацій і дицентриків) узгоджуються з результатами наших попередніх дослідів, отриманих при моделюванні ефекту свідка з використанням лімфоцитів крові, опромінених *in vitro* [6].

В лімфоцитах ліквідаторів аварії на ЧАЕС у віддалені строки після опромінення рівень транслокацій, які є стабільними маркерами дії радіації, на порядок перевищував популяційний. Частота нестабільних маркерів дії радіації в 3 рази перевищувала популяційну. Більшість цих пошкоджень була представлена кільцевими хромосомами.

Висновки

З використанням моделі зі змішаної культури опромінених *in vivo* і неопромінених лімфоцитів крові людини зареєстровано радіоіндукований ефект свідка на цитогенетичному рівні. Частота аберацій хромосом в клітинах-свідках зростала за рахунок підвищеної індукції хроматидних розривів.

Література

1. Nagasawa H., Little J. B. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha- particles // *Cancer Res.* – 1992. – Vol. 52. – P. 6394–6396.
2. Луттл Д.Б. Немишеневые эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2007. – Т. 47, № 3. – С. 262-272.
3. Prise K.M., Belyakov O.V., Newman H.C. et al. Non-targeted effects of radiation: Bystander responses in cell and tissue models. // *Radiat. Prot. Dosimetry.* – 2002. – Vol. 99, № 1-4. – P. 223–226.
4. Шеметун О.В., Пілінська М.А., Талан О.О. Підходи до виявлення радіаційно індукованого „ефекту свідка” в соматичних клітинах людини на цитогенетичному рівні // *Українські медичні вісті.* – 2005. – Т. 6, № 1-2. – С. 427.
5. Шеметун О.В., Талан О.О., Пілінська М.А. Модель для дослідження радіаційно-індукованого «ефекту свідка» з використанням лімфоцитів периферичної крові людини // *Журнал АМН України*. – 2006. - Т.12, № 3. - С. 556-565.

6. Шеметун О.В., Талан О.О., Пілінська М.А. Дослідження радіаційно-індукованого «ефекту свідка» з використанням моделі з лімфоцитів крові людини при опроміненні *in vitro* // Журнал АМН України”. – 2007. - Т.13, № 3. - С. 592-599.

Резюме

Приведены результаты исследования радиационно индуцированного эффекта свидетеля с использованием модели из лимфоцитов крови человека. Показано, что в результате этого феномена уровень aberrаций хромосом в необлученных клетках при культивировании в смешанных культурах с облученными *in vivo* в дозах 1,01-2,37 Гр лимфоцитами достоверно превышал контрольный.

Наведені результати дослідження радіаційно індукованого ефекту свідка з використанням моделі з лімфоцитів крові людини. Показано, що внаслідок цього феномену рівень аберацій хромосом в неопромінених клітинах при культивуванні в змішаних культурах з опроміненими *in vivo* в дозах 1,01-2,37 Гр лімфоцитами достовірно перевищував контрольний.

The results of cytogenetic investigation of radioinduced bystander effect with the help of human blood lymphocytes had been presented. It had been shown that as the result of this phenomenon the level of chromosome aberrations in bystander cells cultivated jointly with irradiated *in vivo* in dose 1,01-2,37 Gy was significantly higher, than control level.

ШЕРЕМЕТ Я.О., ЄМЕЦЬ А.І., БЛЮМ Я. Б

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 148, *e-mail: alyemets@univ.kiev.ua*

З'ЯСУВАННЯ РОЛІ ФОСФОРИЛЮВАННЯ ТУБУЛІНУ ПО ЗАЛИШКАМ ТИРОЗИНУ У ФОРМУВАННІ МЕХАНІЗМІВ ХОЛОДОСТІЙКОСТІ РОСЛИННИХ КЛІТИН

Низька температура є одним із найважливіших абіотичних факторів, який впливає на ріст, розвиток та продуктивність рослин. На даний час особливо важливим питанням біології рослин є з'ясування механізмів формування холодостійкості у рослин. Відомо, що температура є одним із основних факторів, що впливає на організацію мікротрубочок (МТ) у рослинній клітині (Wasteneys, 2000). У ряді робіт показано, що низькі температури призводять до катастрофічних змін в організації МТ тваринних клітин, викликаючи їх повну деполімеризацію (Wallin and Strömberg, 1995). Відомо, що динаміка та організація МТ може регулюватись за рахунок посттрансляційних модифікацій тубуліну як основного структурного компоненту МТ (Westermann and Weber, 2003). Нещодавно за допомогою біохімічних методів нами було встановлено, що фосфорилування рослинного тубуліну по залишкам тирозину приймає участь в регуляції чутливості МТ до дії холоду (Blume et al., 2008). Для більш детального вивчення ролі даного типу посттрансляційної модифікації на структурно-функціональні властивості МТ у рослинних клітинах було досліджено кореляцію між процесами фосфорилування/дефосфорилування по залишкам тирозину та стійкістю/чутливістю кортикальних МТ до дії холоду в клітинах коренів проростків *Arabidopsis thaliana* (GFP-MAP4).

Матеріали і методи

Як експериментальний матеріал використовували 4-денні проростки лінії *Arabidopsis thaliana*, що експресує химерний білок GFP-MAP4 (Mathur and Chua, 2000), який декорує нативні структури МТ. Матеріал для проведення експериментів отримували згідно протоколу, описаного нами раніше (Yemets et al., 2008).