

regulators into β -cyclodextrin. *In vitro* cultivation. HPLC-analysis of secondary metabolites. **Results.** Periwinkle was cultivated in MC medium with addition of the complexes of plant growth regulators (2.4-D; BA; GA) with β -cyclodextrin. For comparison the plants were grown in the medium without β -cyclodextrin. It has been established that the insertion of β -cyclodextrin complexes with growth regulators stimulated plant growth by increasing the mass, lengthening of the stem and roots, increase of branching and rooting, as well as caused intensification of the biosynthesis of vincamine indole alkaloid. Moreover, the obtained complexes showed prolonged action on the culture of periwinkle callus cells. **Conclusions.** The complexes of growth regulators with β -cyclodextrin considerably change the properties of hormones, causing both morphological and biochemical changes of plants.

Key words: *Vinca minor* L., cyclodextrin complexes, plant growth regulator.

УДК 577.1+576.5:591. 111.1

ЛИХАЧЕВА Л.И., ШПИЛЕВАЯ С.П., РУБАН Т.А., ГУЛЬКО Т.П., КОРДИУМ В.А.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,

Украина, 03143, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: kordium@imbg.org.ua

КЛЕТочная ЭКСТРУЗИЯ ДНК ЛЕЙКОЦИТАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Представления о наследственном материале клетки – ДНК непрерывно меняются. Вначале считалось, что геном почти полностью стабильный материал, который менять могут только мутации, и в норме его пребывание только внутриядерное. Позже, на основании многочисленных данных сформировалось представление о горизонтальном переносе генетической информации и была выдвинута концепция «нестабильности генома» [1]. Сегодня геном рассматривают уже как особую структуру, которой свойственна одновременно высочайшая консервативность, обеспечивающая наследственность, и столь же высокая подвижность. В литературе описаны различные варианты перемещения ядерного материала как внутри клетки, так и его за ее пределы. К наиболее часто наблюдаемым относится, например, формирование микроядер – одного или многих – что может происходить как в результате отщепления их ядром, так и вследствие нарушения митотического деления, когда вокруг не включенных во вновь сформированные ядра отдельных хромосом обособляется цитоплазма и формируется оболочка. Микроядра клеток при этом могут либо оставаться внутри клетки, либо покидать ее пределы. Все эти варианты поведения ядер наблюдались нами в культуре *in vitro* [2]. Проводимые нами в настоящее время исследования, связанные с использованием клеток белой крови в качестве одного из компонентов взаимодействующей системы для изучения переноса генетической информации, позволили наблюдать новые картины поведения

хроматина, характерные для их ядер.

В 2004 году было обнаружено, что нейтрофилы (гранулярные лейкоциты) могут формировать особые внеклеточные тяжи, состоящие из ДНК и белков, так называемые NETs (Neutrophil Extracellular Traps), с помощью которых эти гранулоциты захватывают и поражают различные бактерии [3]. Основными структурными компонентами NETs являются ДНК, гистоны (H1, H2A, H2B, H3 и H4) и гранулярные белки. Дальнейшие исследования показали, что такой способностью к катапультированию ДНК обладают также эозинофилы [4]. За годы, прошедшие с момента открытия феномена NETs, появилось много работ, подтверждающих и дополняющих первые результаты. Оказалось, что способностью к выбросу ДНК за пределы клетки обладают лейкоциты разных организмов [5, 6], а также, что не только бактерии, но и многие другие патогенные организмы стимулируют образование таких ДНК-овых ловушек и погибают от их действия [7]. Другие исследования показали, что гранулярные лейкоциты, в ответ на инфекцию, могут выбрасывать как ядерную, так и митохондриальную ДНК [8]. При этом выброс ядерной ДНК приводит к гибели клетки, в то время как при катапультировании митохондриальной ДНК клетки остаются живыми. Кроме того, образование NETs может быть спонтанным, без стимуляции, и происходить при стрессах, аутоиммунных и других патологиях [9–12].

Все это указывает на общебиологическое

значение выброса ДНК за пределы клетки и привело к появлению нового понятия «NETosis», отнесенного к еще одному выявленному типу программируемой клеточной смерти [7]. Но, так же, как и для других танатогенных систем, не понятна роль ДНК, высвобождаемой лейкоцитами в очень широких масштабах. Интересным фактом, который может пролить свет на роль вышедшей из клетки ДНК в составе NETs, являются сообщения о том, что гистонные белки могут служить эффективными векторами для переноса генов в клетки [13–15] и высказывается мнение, что гистонофекция может быть перспективным методом для невирусного переноса рекомбинантных нуклеиновых кислот при генной терапии [16].

В связи с общебиологическим значением, большим интересом и существованием многих непонятных деталей и механизмов горизонтального переноса генетической информации мы поставили ряд задач, решение которых позволило бы нам ближе подойти к пониманию рассматриваемой проблемы. Ранее нами была показана возможность переноса генетической информации по появлению свечения в эмбриональных мышечных фибробластах после их контакта с клетками периферической крови мышей, несущих ген *gfp* и синтезирующих белок GFP [17]. Одним из механизмов передачи генетического материала в описанной нами системе может быть выброс ДНК из клеток крови и поглощение ее фибробластами, который наблюдался нами при работе с клетками белой крови как животных, так и человека.

Материалы и методы

Клетки крови выделяли из цельной крови, содержащей в качестве антикоагулянта ЭДТА, путем центрифугирования крови в капиллярах. Полученный слой лейкоцитов, содержащий нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, а также примесь эритроцитов, отбирали, промывали в среде RPMI, ресуспендировали в этой же среде, подсчитывали количество клеток, и наносили их на предметное стекло с последующей фиксацией в парах формалина, а также параллельно добавляли соответствующий объем клеток крови к клеткам культуры тканей, которые представляли собой свежeweделенные эмбриональные фибробласты мыши, пропассированные на соответствующей среде (ДМЭМ с 10 % ЭТС, по 100 ЕД /мл

пенициллина и стрептомицина,) при 37 °С, 80 % влажности и 5 % CO₂. После экспозиции (1,5–2 часа) избыток клеток крови смывали, препараты промывали питательной средой и фиксировали в парах формалина. Полученные фиксированные препараты окрашивали флуоресцентным реагент–интеркалятором Hoechst 33342. или Syber–Green. Микроскопирование окрашенных препаратов проводили на микроскопе МЛ–2 (ЛОМО, Россия) с использованием фильтров HQ 470|50 (exiter) и HQ 525|50(emitter) (Croma Technology Corp., США). Конфокальную сканирующую микроскопию осуществляли на системе CarlZeiss Laser Scanning System LSM 510 (CarlZeiss, Германия) (AXIOSKOP–2ZEISS). Для предупреждения выгорания люминесценции препарата в течение сеанса конфокальной микроскопии использовали раствор фенилендиамина в качестве антипригарного препарата (anti-bleach agents) [18].

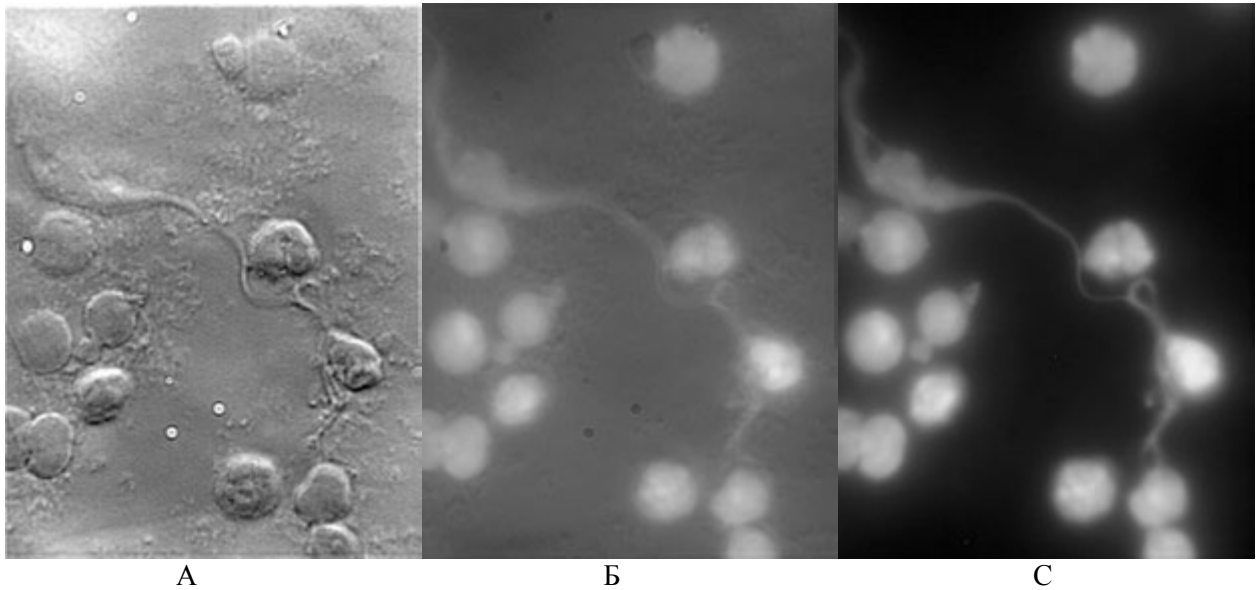
Результаты и обсуждение

При работе с клетками белой крови, как животных (мышей), так и человека, нами наблюдался выброс ДНК за пределы этих клеток. На рис. 1 представлены лейкоциты, выделенные из крови мышей, которые выплескивают ДНК в окружающее пространство, и, как видно, в этот процесс могут вовлекаться несколько клеток белой крови.

Такие же эффекты наблюдались и в суспензии лейкоцитов человека (рис. 2).

Выбросы ДНК из клеток белой крови наблюдались как в их монокультуре, так и при добавлении лейкоцитов к клеткам культур тканей. Так, на рис. 3 представлен выброс ДНК из клеток белой крови мышей при их нанесении на мышечные эмбриональные фибробласты. Видно, что тяжи ДНК, вышедшие из клетки крови (1) направлены к ядрам клеток фибробластов (2) и контактируют с ними.

Одним из объяснений наблюдаемого нами явления – выплескивания ДНК из одних клеток и ее контакт с другими клетками может быть предположение о том, что высвобождаемый клеточный материал в виде полноценной ДНК, может поглощаться другими клетками и является одним из механизмов переноса генетической информации в горизонтальном направлении. Данные исследования очень интересные и перспективные.

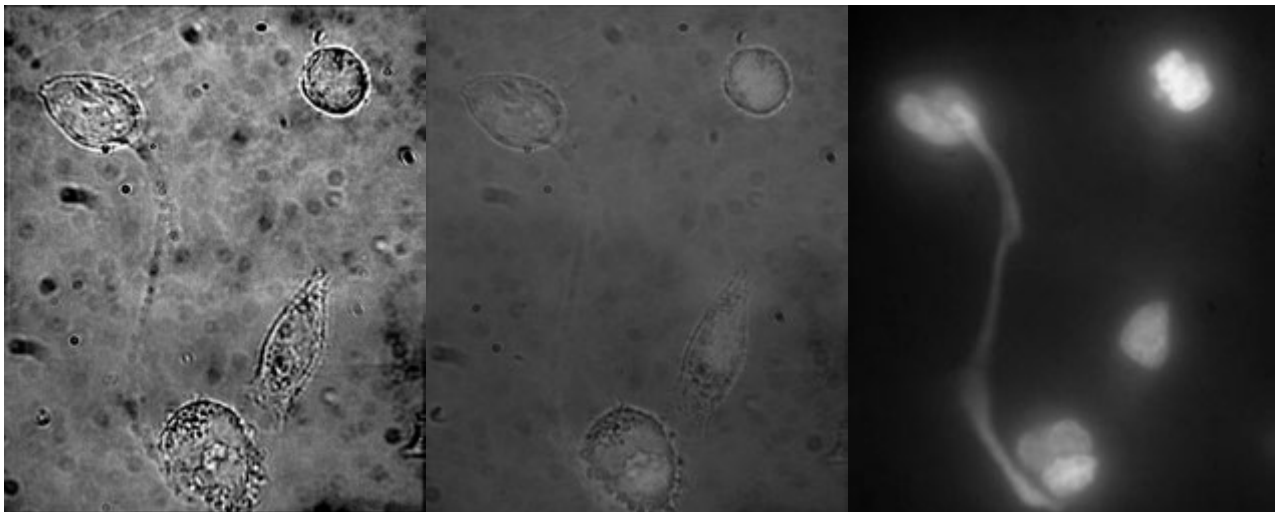


А

Б

С

Рис. 1. Вытекание ДНК из клеток крови мыши (окраска Хекстом 33342: А – микроскопия в проходящем свете; Б – совмещенное освещение; С – люминесцентная микроскопия)



А

Б

С

Рис. 2. Вытекание ДНК из клеток крови человека (окраска Хекстом 33342: А – микроскопия в проходящем свете; Б – совмещенное освещение; С – люминесцентная микроскопия)

Выводы

Было показано, что клетки периферической крови млекопитающих могут выбрасывать нити хроматина из ядер как в монокультуре, так и в присутствии клеток

культур тканей. Сделано предположение, что описанное явление может служить одним из механизмов передачи генетической информации между клетками млекопитающих.

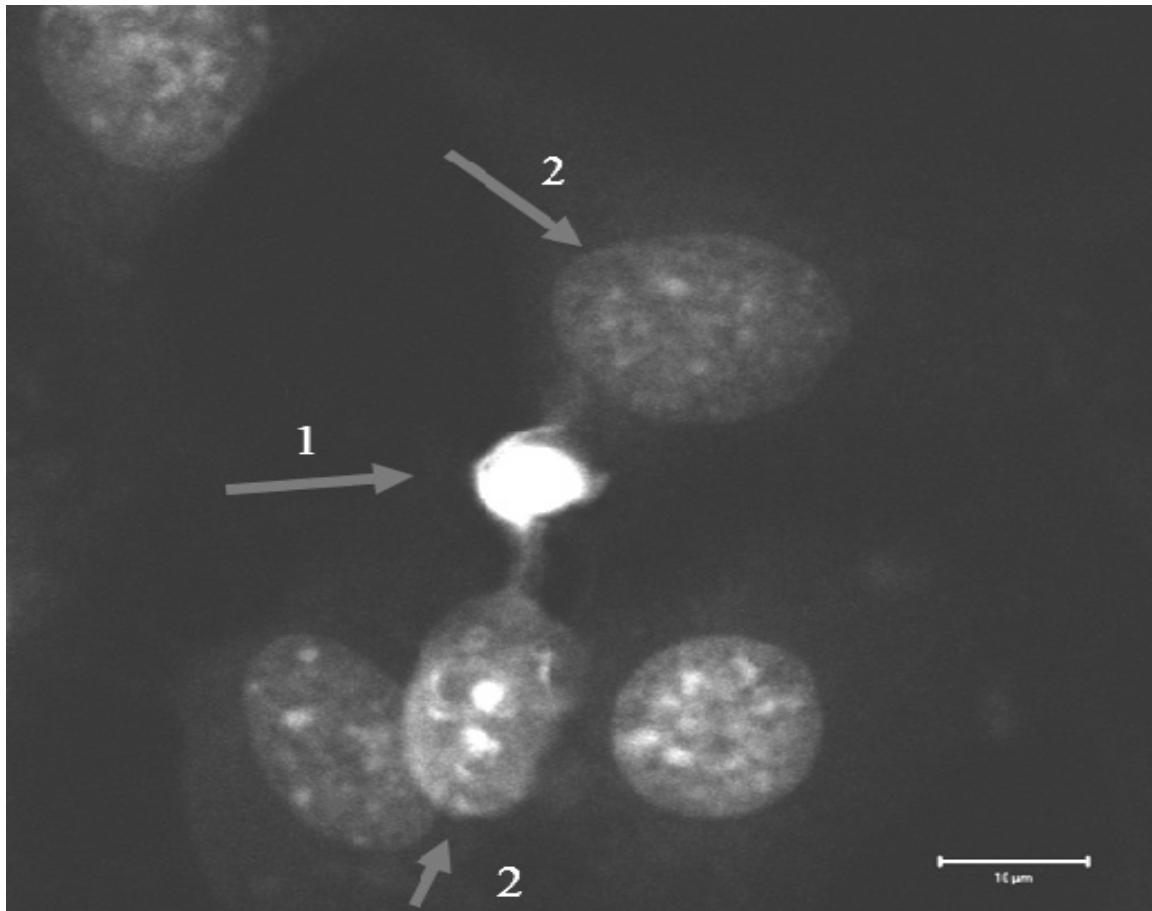


Рис. 3. Вытекание ДНК из лейкоцита мыши (1) в присутствии мышинных фибробластов (2). Конфокальная микроскопия, окраска Syber-Green

Литература

1. Golubovsky M.D. Gene Instability and Mobile Elements: A history of its Research and Discovery // *Studies in the history of Biology*. – 2011. – 3, N 4. – P. 60–78.
2. Кордюм В.А., Шпилевая С.П., Рубан Т.А., Сухорада Е.М. Концепция обмена генетическим материалом между клетками млекопитающих // *Биополимеры и клетка*. – 2005. – 21, № 4. – С. 335–345.
3. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlermann Y., Weiss D.S. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science*. – 2004. – 303. – P. 1532–1535
4. Yousefi S., Goid J.A., Andina N., Lee J.J., Kelly A.M. et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense // *Nature Medicine*. – 2008. – 14. – P. 949–953.
5. Palic' D., Ostojic' J., Andreasen CB, Roth JA Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from neutrophils // *Dev Comp Immunol*. – 2007. – 31, N 8. – P. 805–816
6. Wardini A.B., Guimara'es-Costa A.B., Nascimento MTC., Nadaes N.R. et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus // *J. of General Virology*. – 2011. – 91. – P. 259–264.
7. Remijsen Q., Kuijpers T.W., Wirawan E., Lippens S. et al. Dying for a cause: NETosis mechanisms behind an antimicrobial cell death modality // *Cell Death Differ*. – 2011. – 18, N 4. – P. 581–588.
8. Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E., Schmid I., Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps // *Cell Death Differ*. – 2009. – 16. – P. 1438–1444.
9. Dworski R., Simon H-U., Hoskins A., Yousefi S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways // *J Allergy Clin Immunol*. – 2011. – 127, N 5. – P. 1260–1266.
10. Thomas G.M., Carbo C., Curtis B.R., Martinod K., Mazo I.B. et al. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice // *Blood*. – 2012. – 119, N 26. – P. 6335–6343.
11. Simon D., Hoesli S., Roth N., Staedler S., Yousefi S., Simon H-U. Eosinophil extracellular DNA traps in skin diseases // *J Allergy Clin Immunol*. – 2011. – 127, N 1. – P. 194–199.
12. Demers M., Krause D.S., Schatzberg D., Martinod K. et al. Cancer predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis // *PNAS*. – 2012. – 109, N32. – P. 13076–13081.

13. Соловьева С.С., Кудряшова Н.В., Ризванов А.А. Перенос рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки (трансфекция) с помощью гистонов и других ядерных белков // КТТИ. – 2011. – YI, № 3. – С. 29–40.
14. D.Balicki, E.Beutler. Histone H2A significantly enhances in vitro DNA transfection // Mol Med. –1997. – 3, N 11. – P. 782–787.
15. Y.Lucius, A. Haberland, S.Zaitsev, R.Dalluge, M.Schneider, M.Bottger. Structure of transfection–active Histone H1/ DNA complexes // Molecular Biology Reports. – 2002. – 28. – P. 157–165.
16. Каоуасс М., Beaulieu R., Balicki D. Histonefection: Novel and potent non-viral gene delivery // J. Control Release. – 2006. – 113, N 3. – P. 245–254.
17. Лихачева Л.И., Шпилева С.П., Рубан Т.А., Гулько Т.П., Кордюм В.А. К вопросу идентификации и изучения переноса генетической информации между клетками млекопитающих // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Київ, 2013. – 12. – С. 137–140.
18. Johnson G.D., Davidson R.S., McNamee K.C., Russell G., Holborow E.J.. Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomena and its remedy // J. Immun. Meth. – 1982 – 55 – P. 231–242.

ЛИХАЧОВА Л.І., ШПЫЛОВА С.П., ГУЛКО Т.П., РУБАН Т.А., КОРДИУМ В.А.

Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 150, e-mail:kordium@imbg.org.ua

CELLULAR EXTRUSION OF DNA BY MAMMALIAN LEUKOCYTES

Aims. The study of cellular extrusion of DNA of mammalian leukocytes. **Methods.** Leukocytes were isolated from human blood and mice in the capillaries by centrifugation. Human leukocytes and part white blood cells of mice placed onto a slide and fixed. Another portion was applied to mice leukocytes embryonic fibroblasts, after 1.5–2 hour exposure preparations were fixed. The resulting specimens were stained with fluorescent dyes Hoechst 33342 DNA. or Syber-Green and analyzed by standard fluorescence microscopy.

Results. Microscopy results showed that the emissions of DNA from leucocytes into the extracellular space as observed in their monoculture or in the presence of fibroblasts, while the extracellular DNA the nuclei of leukocytes is contacted with the fibroblasts. **Conclusion.** These results demonstrate that mammalian leukocytes may release DNA into the extracellular space as in monoculture and in co-culture with tissue culture cells. It is suggested that the phenomenon described here can serve as described here can serve as.

Key words: cellular extrusion of DNA, extracellular space.

УДК 577.21:577.164.1

ЛУЖЕЦЬКИЙ Т.Б., СЕМКІВ М.В., КШАНОВСЬКА Б.В., ДМИТРУК К.В., СИБІРНИЙ А.А.

Інститут біології клітини НАН України,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16, e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua

ПІДВИЩЕННЯ ТЕРМОТОЛЕРАНТНОСТІ ПРОМИСЛОВИХ СПИРТОВИХ ДРІЖДЖІВ ШЛЯХОМ ДЕРЕПРЕСІЇ ГЕНІВ СИНТЕЗУ ТРЕГАЛОЗИ

Етанол на сьогодні є найбільш поширеним рідким паливом, що отримується з поновлювальної сировини – біомаси. Упродовж останніх років об'єм промислового виробництва етанолу зростає за рахунок використання спирту у транспортному секторі. Етанол використовується в автомобільних двигунах як додаток до бензино-етанольних сумішей або у чистому вигляді в спеціалізованих двигунах.

Основним способом отримання етанолу є алкогольна ферментація цукристих субстратів за допомогою спиртових дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Перетворення гексоз до етанолу шляхом гліколізу – екзотермічний процес, пов'язаний з вивільненням енергії, що частково

вивільняється у вигляді теплоти. Тому бродильні апарати потребують охолодження до оптимальних температурних умов (34–35 °С) при алкогольної ферментації за участі сахароміцетів. Охолодження промислових ємностей вимагає суттєвих енергетичних затрат. Селекція або конструювання штамів дріжджів *S. cerevisiae* здатних до ефективної алкогольної ферментації при температурах, що перевищують 35 °С, здешевило би отримання спирту за рахунок зниження затрат на охолодження бродильних чанів, а також знизило б різницю температур для подальшої перегонки браги до етанолу. При підвищеній температурі продуктивність алкогольної ферментації зростає. Отже,