

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ, ИНГИБИРУЮЩИХ МЕЛАНОГЕНЕЗ ШЕРСТИ У ОВЕЦ

Косимов Р.Б., д.б.н., профессор, Нуров У. Дж., к.б.н., ст. преп., ТНУ

Ключевые слова: меланогенез, шерстная продуктивность, пигмент меланин, гибрид, ингибирование, депигментация, фермент тирозиназа, слияние клеток.

Разработанные клеточные подходы к изучению механизма ингибирования меланогенеза у гибридов полугрубошерстных овец, могут быть широко использованы в овцеводстве, с целью повышения эффективности селекции по шерстной продуктивности и получения качественной шерсти для нужд промышленности. Эффективные способы отбора по шерстной продуктивности и производству полугрубой белой шерсти от гибридов овец таджикской породы имеют большое практическое значение в рационализации программ, при конструировании депигментированных высокопродуктивных пород овец.

Формирование пигмента меланина в шерсти овец и его ингибирование - весьма сложный комплексный процесс, на течение которого влияет множество факторов. К настоящему времени проведено большое количество исследований, посвященных разработке различных аспектов проблемы депигментации волосяного покрова животных.

Обзор литературы

Проанализировав ряд работ [2], можно прийти к выводу, что абсолютное и относительное количество эумеланиновых и феомеланиновых гранул в волосах, определяющих окраску, следует рассматривать как окончательный результат деятельности меланоцитов и их взаимодействие с кераноцитами.

Фирагут Дж. А. с соавторами (2003) установили, что главные процессы меланогенеза осуществляются в меланоцитах - большая часть факторов, ингибирующих процесс, действует именно на этом этапе. Факторы биохимического и генетического характера, контролирующие количество и качество активных молекул фермента тирозиназы, оказывают прямой эффект на течение меланогенеза. Вероятно, именно эта возможность изменения активности основного фермента реализуется в качестве одного из основных регуляторных механизмов процесса [7].

По мнению других ученых [3, 5], премеланосомы, формирующиеся в комплекс Гольджи, имеют специфическую сложную упорядоченную структуру белкового матрикса, листки которого связываются с определенным числом молекул тирозиназы. Нормальное функционирование этих своеобразных органелл, безусловно, контролируется биохимическими факторами и может ингибироваться какими-либо внешними агентами, поступающими в меланоцит.

По данным [6], важным регуляторным механизмом, контролирующим эффективность работы меланоцита, следует считать изменение способности клетки поддерживать внутреннюю стабильную химическую среду (например, концентрацию цистеина или глутитиона). Другие ученые [4] установили, что недостаток меди в рационах пигментированных животных ослабляет окраску шерсти. Биосинтез меланина ингибируется, также при понижении концентрации в клетке свободного тирозина, при недостаточно высокой концентрации тирозиназы, необходимой либо для быстрого превращения тирозина в ДОФА, либо при увеличении содержания в среде конкурентных веществ, например, фенилаланина.

Методы исследования

Слияние клеток меланосомы и клеток ЭФО было проведено с помощью электроимпульсной установки. Метод электрослияния при центрифугировании основан на электропробое мембран контактирующих клеток. С этой целью центрифугируемые клетки подвергались в осадке действию высоковольтных электрических импульсов (2,5 - 3 кВ/см) продолжительностью 30 - 50 мкс. [1]. После электрообработки клетки меланосомы живут, как правило, не более 14-18 ч, и поэтому через 24 ч можно избежать

чрезмерных снабжений клеток-партнеров, которые трудно отличить от слияний. Через 24 ч после слияния с клетками культур, ядра клеток меланосомы заметно набухают, но не теряют свою специфически овальную форму. К 48 ч после слияния, ядра клетки меланосомы в гетерокарионах подвергаются дальнейшему разбуханию, однако их характерная морфология, как правило, все еще сохраняется. Следует отметить, что для изучения брались только те гетерокарионы, в которых идентификация ядра клеток меланосомы не вызывала затруднений.

Результаты и их обсуждения

Мы считаем, что для полного выявления факторов, ингибирующих меланогенез шерсти у овец, необходимо исследовать влияние молекулярно-клеточных факторов. Большой интерес, в качестве объекта, для подобных исследований меланогенеза представляют гибриды таджикской породы овец, так как секционировалась она по шерстной продуктивности, что привело к глубоким преобразованиям характера волосяного покрова, формированию новых свойств волосяных фолликулов.

Одним из подходов изучения природы факторов, контролирующих ингибирование меланогенеза, является комплексное исследование биохимических механизмов блока пролиферации в меланоцитах. Клетки меланосом приобретают свойства, терминальной дифференцированности, когда определенные участки ДНК, в частности блок генов, контролирующих процессы меланогенеза, прекращают свою функцию, но деление клеток меланосом не прекращается, то есть синтез ДНК протекает нормально.

Согласно нашей гипотезе, сульфгидрильные соединения (глутитион и цистеин) подавляют активность тирозиназы, так как связывают медь, активирующую этот фермент. Поэтому изменения концентрации SH-групп в среде (в цитоплазме меланоцита) оказывают непосредственное влияние на течение меланогенеза. Этот механизм действует при самых разнообразных обстоятельствах, либо ингибируя, либо интенсифицируя меланогенез. Наблюдаемое в волосяных фолликулах ягнят гибридов таджикской породы, в течение первых недель-месяцев постнатального онтогенеза, почти полное ингибирование меланогенеза обусловлено возрастанием концентрации в крови и тканях сульфгидрильных групп, вследствие увеличения интенсивности роста пуховых и переходных волокон.

Мы поставили перед собой цель выявить природу факторов, блокирующих синтез гранул пигмента меланина у отдельных гибридов овец таджикской породы, имеющих различные окраски шерстного покрова; выявить биохимические и молекулярные характеристики пигментных клеток и волосяных фолликулов, тесно коррелирующих с содержанием меланина в волосах; исследовать выявление клеточных и других факторов, ответственных за задержку пигментации ягнят гибридов таджикской породы, имеющих различные генотипы окраски.

Культура клетки меланомы мы получали из 1,5 месячного эмбриона овцематок, гибридов таджикской породы, имеющие палевую окраску, кроющие волосы на головы. Предварительные исследования показали, что при инкубации в течение 24 ч в полной культуральной среде с ³H-тимидином более чем 92 % метка включается в ядра эмбриональные фибробласты овец (ЭФО) и клетки меланосомы. Через 24 ч после слияния клеток меланосомы + ЭФО, примерно в 10% гетерокарионов с ядрами ЭФО, синтезировавшими ДНК, то есть происходит подавления репликации в ядрах подледного (табл.).

Уже через 48 часов было обнаружено небольшое, но достоверное подавление синтеза ДНК в гетерокарионах. Таким образом, слияние с клетками меланосомы влияет на текущий синтез ДНК в ядрах ЭФО и подавляет вступление последних в S-период. Было необходимо выяснить, влияет ли слияние клеток ЭФО с клетками меланосомы на текущий синтез ДНК в ядрах ЭФО. С этой целью, клетки меланосомы сливали с ЭФО частично синхронизованными в S-фазе клеточного цикла (24 часа после сывороточной стимуляции покоящейся культуры). Фиксацию проводили через 2 и 4 ч после слияния. Индекс реактивации в ядрах меланосомы через 2 ч и 4 ч после слияния существенно уменьшался.

Регуляция синтеза ДНК в гетерокарионах клетки предшественников меланоцита и клеток + ЭФО

Срок после слияния (ч)	Число исследованных ГК	Доля меченых ядер ЭФО в гомокарионах (%).	Доля меченых в среднем слившихся ядер ЭФО.	Доля меченых среди ядер ЭФО в ГК (%).	Индекс подавления синтеза ДНК в ядрах меланосомы в ГК (%).	Индекс реактивации ядер клеток меланосомы в ГК, %
24	211	80,2±3,8	92,3±1,9	12,6±4,8	74,8	30,6
24	288	85,2±3,5	89,7±1,7	9,5±6,6	80,5	36,8
48	241	86,0±3,1	91,4±1,7	10,2±5,5	73,3	35,2
24	298	85,2±3,8	90,2±1,5	10,8±5,4	76,9	28,9
48	212	88,7±3,1	92,2±1,5	10,2±7,6	77,7	28,8

Нами, на модели гетерокарионов выявлена природа клеточных факторов, блокирующих синтез пигмента меланина у отдельных особей таджикской породы овец, имеющих белую окраску шерсти. Также установлено угнетающее влияние клеточных факторов, на различные структуры пролиферации и на синтез пигмента меланина. Установлено наличие некоторых белковых клеточных факторов, блокирующих репликацию в клетках меланобласти, и частично выявлены внутриклеточные механизмы, препятствующие репликаций при терминальной дифференцировке клеток меланобласти. Установлено, что предшественник меланоцита после утраты способности синтезировать пигмент меланина синтезируют факторы, препятствующие синтезу ДНК в ядре клеток-партнеров. Обнаружено также ингибирующее действие на меланогенез генов, определяющих уникальную структуру, густоту и скорость роста, а также неоднородность шерсти таджикской породы овец.

Литература

1. Абидор И.Г., Барбул А.И., Желев Д. Электростимулируемое слияние клеток при центрифугировании: и электрические свойства клеточных осадков-//Биологические мембраны, 1989.- Том 6.- С. 1296-1313.
2. Лях С.П., Рубан Е.Л. Микробный меланин- Москва: Наука, 1998.- 210 с.
3. Ватти К.В., Алексеевич Л.А. Сравнительная генетика и онтогенетика окрасок у животных. Физиологическая генетика- Москва: Наука, 2001.- С. 326-350.
4. Махмудов М. И. Медная недостаточность и нарушения шерстного покрова овец. Сборник работ молодых ученых и аспирантов- Алма-Ата, Казахстан, 1998.- т. 1.-С. 553-555.
5. Sealy R.C., Hyde J.S., Felix C.C., Menon I.A., Prota G. Emulations and Pheomelanins: Characterization by electron spin resonance spectroscopy. Science, 2002, V. 21, № 4559, P. 545-547.
6. Prota G., Rorsman H., Rosengren A. -M. and Rosengren E. Phaeomelanin Pigments from' a Human Melanoma. Experientia, 2005, v. 32, n. 8, P. 97-971.
7. Farragut J. A., Jimenez M. Origin of pigment cells from the Neural crest in the mouse embryo. Physiol. Zool., 2003, v. 20, pp. 248-265.

АННОТАЦИЯ

ОМУЗИШИ ТАЪСИРИ ОМИЛҲОИ МОЛЕКУЛАВИИ ҲУҶАЙРА БА РАВАНДИ ҚАТЪ ГАРДИДАНИ МЕЛАНОГЕНЕЗ ДАР ПАШМИ ГЌСФАНДОН

Мо бо истифода аз модули гетерокарион табиати хуҷайравӣ доштани омилҳои қатқунандаи синтези пигменти меланиро дар пашми гибридохи гўсфандони зоти тоҷикӣ, ки ранги сафед доштанд, муайян намудем. Инчунин таъсири қатқунанда

доштани ин омилҳои ҳуҷайравӣ ба сохторҳои гуногуни пролифератсияи синтези пигменти меланин низ муайян карда шуд.

Калимаҳои калидӣ: меланогенез, маҳсулнокии паши, пигменти меланин, гибрид, қатқунандаи синтез, сафедшавии паши, ферменти тирозиназа, боҳамомехтакунии ҳуҷайра.

АННОТАЦИЯ

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ, ИНГИБИРУЮЩИХ МЕЛАНОГЕНЕЗ ШЕРСТИ У ОВЕЦ

Согласно нашей гипотезе, сульфгидрильные соединения (глутитион и цистеин) подавляют активность тирозиназы, так как связывают медь, активирующую этот фермент. Поэтому изменения концентрации SH-групп в среде (в цитоплазме меланоцита) оказывают непосредственное влияние на течение меланогенеза. Наблюдаемое в волосяных фолликулах ягнят гибридов таджикской породы, в течение первых недель-месяцев постнатального онтогенеза, почти полное ингибирование меланогенеза обусловлено возрастанием концентрации в крови и тканях сульфгидрильных групп, вследствие увеличения интенсивности роста пуховых и переходных волокон.

Ключевые слова: меланогенез, шерстная продуктивность, пигмент меланин, гибрид, ингибирование, депигментация, фермент тирозиназа, слияние клеток.

ANNOTATION

STUDYING THE INFLUENCE OF MOLECULAR-CELL FACTORS THAT INHIBIT WOOL MELANOGENESIS IN SHEEP

We have revealed on the heterocaryon model the nature of cellular factors blocking the synthesis of the melanin pigment in individual individuals of the Tajik sheep breed hybrids with white coat color. The inhibitory effect of cellular factors on various proliferation structures and on the synthesis of melanin pigment has also been established.

Key words: melanogenesis, woolly productivity, pigment melanin, hybrid, inhibition, depigmentation, tyrosinase enzyme, cell fusion.