

25. Honeth G., Stafflin K., Kalliomäki S., Lindvall M., Kjellman C. Chemokine-directed migration of tumor-inhibitory neural progenitor cells towards an intracranially growing glioma. *Exp Cell Res*, 2006, 312, 8: 1265-1276.
26. Shah K., Bureau E., Kim D.E., Yang K., Tang Y., Weissleder R., Breakefield X.O. Glioma therapy and real-time imaging of neural precursor cell migration and tumor regression. *Ann Neurol.*, 2005, 57, 1: 34-41.
27. Yuan X., Hu J., Belladonna M.L., Black K.L., Yu J.S. Interleukin-23-expressing bone-marrow-derived neural stem-like cells exhibit antitumor activity against intracranial glioma. *Cancer res.*, 2006, 66, 5: 2630-2638.

РАЗРАБАТЫВАЕТСЯ ПРОБЛЕМА

ОСОБЕННОСТИ РАСПОЛОЖЕНИЯ ХРОМОСОМ В ЯДРАХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO

А.В. Лавров, Я.И. Вольдгорн

Учреждение Российской академии медицинских наук Медико-генетический научный центр

РАМН, Москва, avlavrov@yandex.ru

Важная роль в регуляции экспрессии генов принадлежит эпигенетическим механизмам, в т.ч. трёхмерному строению хроматина в ядре. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются перспективной моделью изучения роли строения ядра в процессах дифференцировки, сопровождающейся значительными изменениями в экспрессии многих генов. Цель данной работы – изучение особенностей расположения хромосом в ядрах МСК на ранних и поздних пассажах культивирования МСК. Проанализировано более 400 ядер девяти культур МСК. Центромеры хромосомы 6 находятся на большем (0,68), а хромосомы 18 на меньшем (0,49) радиальном расстоянии. Гомологи каждой хромосомы лежат на различных радиальных расстояниях. Между МСК, полученными из жировой ткани и костного мозга, различий в радиальных расстояниях хромосом не выявлено. После восьмого пассажа происходит дистальное смещение центромеры хромосомы 6 (0,66 против 0,72), что может свидетельствовать о старении или спонтанной дифференцировке клеток.

Ключевые слова: хромосомная территория, строение интерфазного ядра, мезенхимная стволовая клетка.

Изучение структуры и пространственной организации интерфазного ядра, как основы регуляции генома на эпигенетическом уровне, является неотъемлемой составляющей современных исследований в области клеточной биологии. Изучение структуры хроматина в клеточном ядре ведётся уже более 20 лет. Показано не только неслучайное расположение хромосом в ядре, но и влияние пространственной укладки хроматина на такие важные функции, как, например, клеточную дифференцировку. Однако до сих пор не существует единого мнения о закономерностях изменений архитектуры ядра при функционально различных его состояниях и принципах реорганизации хроматина при переходе ядра из одного функционального состояния в другое. Несмотря на то, что существование хромосомных территорий (ХТ), как самостоятельных структурных единиц интерфазного ядра, было доказано в 1980 г.[4], до сих пор остаётся неизвестным, каким образом формируется и поддерживается уникальное для разных типов клеток высших эукариот взаимное расположение хромосомных территорий и какие причинно-следственные связи существуют между особенностями строения ХТ и активностью генов в соответствующих хромосомах. Особый интерес представляет изучение стволовых клеток, например, мезенхимных стволовых клеток человека (МСК). МСК широко используются в клинических исследованиях при разработке методов клеточной терапии распространённых заболеваний. МСК являются интересной моделью изучения роли строения ядра в процессах дифференцировки. Целью настоящей работы является изучение строения ядер МСК на примере анализа расположения отдельных аутосом в клетках на ранних и поздних пассажах культивирования МСК.

Материал и методы

Получение клеток.

МСК из жировой ткани и костного мозга выделяли и культивировали согласно описанному ранее [1; 3] – выделенные мононуклеарные клетки культивировали в полной ростовой среде (DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), 10% FBS (Perbio HyClone, США), гепарин 8 Ед/мл (ПанЭко, Россия), L-глутамин 2мМ (ПанЭко, Россия), FGF-b 10нг/мл (ПанЭко, Россия), пенициллин/стрептомицин (ПанЭко, Россия)) при температуре 37⁰С и CO₂ 5%. Через 24-48 ч неприлипшие клетки удаляли со сменой среды и далее среду меняли каждые 3-4 дня. МСК из жировой ткани были любезно предоставлены ГУЗ г. Москвы «Банк стволовых клеток департамента здравоохранения г. Москвы», а также получены самостоятельно. МСК из костного мозга были любезно предоставлены ЗАО «РеМеТэкс». От пациентов получены письменные добровольные согласия.

Проведение FISH-анализа.

Для проведения FISH-анализа клетки отмывали от среды в DPBS (Панэко, Россия) и фиксировали ледяным метанолом. Денатурацию, гибридизацию и отмыв проводили по стандартному протоколу Vysis (США). Для проведения FISH-анализа интерфазных ядер использовали цетромерные зонды фирмы Vysis, Inc. на хромосомы 6, 8, 11, 18. Для окраски ядер использовали DAPI. Препараты анализировали под микроскопом AxioImager с комплектом интерференционных фильтров (Zeiss, Германия) с помощью программного обеспечения FISH-анализа (Fish View System, Applied Spectral Imaging).

Результаты

Проанализировано 9 различных культур МСК на разных пассажах (табл. 1). Пассажи до 4 включительно отнесены к ранним, а пассажи, начиная с 8 – к поздним. Для анализа выбрали хромосому 18, как одну из наиболее часто изучаемых в подобных исследованиях – бедную генами хромосому, расположенную обычно на периферии ядра; хромосому 6, как несущую ряд генов, связанных с недифференцированным статусом стволовых клеток, а также генов, задействованных в характерных для МСК путях дифференцировки – остео- и адипогенном.

Таблица 1. Характеристики проанализированных культур.

№ культуры	Пассаж	Источник	Проанализированные хромосомы	
			6	18
MSC-1	Ранний	КМ	+	+
MSC-2	Ранний	КМ	+	
MSC-3	Ранний	КМ	+	
MSC-3	Поздний	КМ	+	
MSC-4	Поздний	КМ	+	
MSC-5	Ранний	ЖТ	+	
MSC-6	Ранний	ЖТ	+	+
MSC-7	6	ЖТ	+	+
MSC-7	Поздний	ЖТ	+	+
MSC-8	6	ЖТ	+	+
MSC-9	6	ЖТ	+	+

КМ- костный мозг; ЖТ – жировая ткань.

Размеры ядер.

Ранее мы показали, что в культуре МСК из жировой ткани клетки гетерогенны по размерам ядер [2], поэтому в данной работе при проведении FISH-анализа оценивали также площадь ядер. Действительно, клетки оказались гетерогенными по размерам ядер. Разброс значений отличался значительной величиной – минимальные значения отличались от максимальных в несколько раз (табл. 2). Распределение размеров ядер отклонялось от нормального - около 16% ядер были значительного размера, что определяло появление правого «хвоста» у распределения. В дальнейшем при анализе радиальных расстояний учитывали размер анализируемых ядер.

Таблица 2. Размеры ядер в культивируемых МСК.

№ культуры	n	Медиана, пиксель	Минимальное значение, пиксель	Максимальное значение, пиксель
MSC-6 P	39	32016	17579	53877
MSC-7 6	19	27089	7384	59598
MSC-7 П	32	32913	18315	61637
MSC-8 6	78	74872	11408	212968
MSC-9 6	63	39403	23909	71154

P – ранний пассаж; П – поздний пассаж.

В каждой культуре наблюдалось большинство клеток с ядрами среднего размера и примерно 20% клеток – с ядрами маленького и большого размера.

Радиальные положения хромосом.

Для оценки и сравнения расположения хромосом в интерфазном ядре используют безразмерную относительную величину – радиальное расстояние. Радиальное расстояние представляет собой отношение расстояния от центра ядра до FISH-сигнала к расстоянию от центра до края ядра, отмеренному по радиусу, проходящему через изучаемый сигнал зонда. Радиальные расстояния в изученных культурах не отличались между культурами. Медианы радиальных расстояний центромер 6 и 18 составили 0,68 и 0,48, соответственно. При сравнении в одной и той же культуре и в целом по всем культурам центромера 18 лежала на меньшем расстоянии, чем центромера 6 ($p < 0,001$, критерий Колмогорова-Смирнова) (табл. 3). Различия положения центромер в зависимости от размера ядра выявлены не были. При

сравнении культур на ранних и поздних пассажах было обнаружено, что в клетках на поздних пассажах хромосома 6 находится дистальнее (0,66 на ранних и 0,72 на поздних $p=0,042$; критерий Манна-Уитни). Хромосома 6 была выбрана для анализа, так как на ней находятся гены, определяющие недифференцированное стволовое состояние МСК, например, *OCT4*, экспрессия которого характерна для МСК [6], а также связанные с типичными направлениями дифференцировки МСК в адипо- и остеогеном направлениях: *BMP6*, *HDAC2*, *RUNX2*. Поэтому обнаруженное различие в положении хромосомы 6 может отражать процессы старения и/или спонтанной дифференцировки в культуре.

Радиальные положения гомологов. Во всех проанализированных культурах было отмечено ярко выраженное различное положение гомологичных хромосом (табл. 3). Различия в положении гомологов часто объясняются их разной активностью. Известно, что такое расположение нарушается за счёт сближения гомологов в нейронах головного мозга при некоторых психических заболеваниях [5].

Таблица 3. Медианы радиальных расстояний центромер хромосом 6, 8, 11 и 18.

Номер культуры	Хромосомы и гомологи				Хромосомы	
	6пр	6д	18пр	18д	6	18
MSC-1 P	0,57	0,67	0,43	0,73	0,64	0,52
MSC-2 P	0,44	0,79			0,61	
MSC-3 P	0,64	0,88			0,72	
MSC-3 П	0,58	0,84			0,71	
MSC-4 П	0,62	0,82			0,72	
MSC-5 P	0,59	0,79			0,74	
MSC-6 P	0,58	0,64	0,40	0,60	0,59	0,48
MSC-7 6	0,53	0,78	0,46	0,67	0,67	0,53
MSC-7 П	0,61	0,87	0,34	0,60	0,73	0,43
MSC-7 П	0,55	0,76	0,41	0,62	0,69	0,51
MSC-8 6	0,55	0,76	0,38	0,66	0,65	0,46
MSC-9 6	0,54	0,73	0,36	0,61	0,64	0,47

P – ранний пассаж, П – поздний пассаж; пр – проксимальный гомолог данной пары, д – дистальный гомолог данной пары. Серым отмечены пары значений, уровень значимости различий в которых составил менее 0,025.

Выводы

Показано, что центромеры хромосомы 6 находятся на большем (0,68), а хромосомы 18 на меньшем (0,48) радиальном расстоянии. МСК из жировой ткани и костного мозга не отличаются друг от друга по изученным параметрам. Наблюдается разница в положении центромер гомологов каждой хромосомы. При длительном культивировании (более 8 пассажей) происходит изменение строения ядра, что отражается в дистальном смещении центромеры хромосомы 6, и может свидетельствовать о старении или спонтанной дифференцировке клеток.

Дальнейшее изучение архитектуры хроматина интерфазных ядер в культуре МСК при культивировании и дифференцировке позволит выявить особенности положения хромосомных территорий в стволовых и дифференцированных клетках, а также приблизиться к пониманию механизмов эпигенетической регуляции активности генома и поддержания стволовых свойств с помощью ремоделирования объёмной структуры хроматина.

Список литературы

1. **Бочков Н.П., Воронина Е.С., Катосова Л.Д., Никитина В.А.** Цитогенетическое исследование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека в процессе культивирования. Медицинская генетика. 2009, 8, 12, 90: 3-6.
2. **Лавров А.В., Смирнихина С.А.** Гетерогенность ядер и пролиферативный потенциал МСК-подобных клеток в культуре стромально-васкулярной фракции жировой ткани. Цитология. 2010, 52, 8: 616-620.
3. **Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К.** Стромальные клетки костного мозга и кроветворное микроокружение. Архив патологии. 1982, 10: 3-11.
4. **Cremer C., Cremer T., Fukuda M., Nakanishi K.** Detection of laser-UV microirradiation-induced DNA photolesions by immunofluorescent staining. Hum. Genet. 1980, 54, 1: 107-110.
5. **Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B.** Genomic Landscape of the Alzheimer's Disease Brain: Chromosome Instability - Aneuploidy, but Not Tetraploidy - Mediates Neurodegeneration. Neurodegener Dis. 2011, 8, 1-2: 35-37.
6. **Tai M.H., Chang C.C., Kiupel M., Webster J.D., Olson L.K., Trosko J.E.** Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. Carcinogenesis. 2005, 26, 2: 495-502.