

ТРУДЫ
ПО ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
И ПРИКЛАДНОЙ ГЕНЕТИКЕ

Выпуск 2

Харьков
2003

УДК 576.315.4:611.018.7:632.11

ИЗМЕНЕНИЕ СТЕПЕНИ КОМПАКТИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В ЯДРАХ КЛЕТОК БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ИНКУБАЦИИ

Л.А. ЖУРАВЛЕВА, Ю.Г. ШКОРБАТОВ, В.Г. ШАХБАЗОВ

*Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина,
Свободы, 4, Харьков, 61077, пл., Украина*

Исследовали состояние хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека в связи с изучением проявления неспецифической реакции клетки на действие высокой и низкой положительной температуры инкубации. Показано, что субоптимальная и супероптимальная температура инкубации вызывают увеличение степени компактизации хроматина, что свидетельствует о снижении общей функциональной активности генома. Показана зависимость степени конденсации хроматина от силы действующего фактора. Полученные результаты свидетельствуют о том, что конденсация хроматина - неспецифическая реакция клетки на действие гипо- и гипертермии.

Ключевые слова: буккальный эпителий, хроматин, гетерохроматин, показатель содержания гранул гетерохроматина (СГГ), температурное воздействие.

Температура играет в жизнедеятельности клетки важную роль. Все физико-химические процессы, обеспечивающие функциональную активность клеток, зависят в большей или меньшей степени от температуры. Повышение температуры свыше оптимальной является стимулом к запуску адаптивных реакций клетки, дальнейшее повышение - сигналом к запуску реакций, вызывающих апоптоз. Меняя температуру инкубации клеток в условиях эксперимента, можно ис-

следовать феномен регуляции активности генов в разных фазах реакции клетки на стресс.

Среди различных уровней регуляции функциональной активности ядерного генома, исключительно важную роль играет надмолекулярный уровень регуляции, затрагивающий структурные изменения хроматина.

Хроматин - основной материал клеточного ядра - может быть представлен либо в виде эухроматина - деконденсированной, функционально активной формы, либо в виде гетерохроматина - конденсированного, функционально неактивного хроматина. Молекулярная организация, поведение в клеточном цикле, природа конденсации эу- и гетерохроматина различны [16].

Соотношение эу- и гетерохроматина в ядре меняется по различным причинам. Повышение степени гетерохроматинизации, за счет суперспирализации эухроматиновых районов, свидетельствует о снижении активности процессов биосинтеза в ядре [7].

Конденсация эухроматина наблюдается в митозе, когда хромосомы переходят в метаболически неактивное состояние. Кроме того, конденсация хроматина имеет место при апоптозе [19]. Известно также, что определенный набор стрессовых факторов, включая инкубацию клеток при сублетальной температуре, ультрафиолетовое облучение, недостаток питательных веществ и др., может индуцировать конденсацию хромосом в нативной клетке без митоза и провокации апоптоза [8, 11, 12, 13, 17]. Явление конденсации хроматина под действием теплового шока отмечено в клетках растений, гриба *Asbya*, дрозофилы и млекопитающих [20], однако процесс изменения состояния хроматина в условиях стресса все еще остается относительно мало изученным.

Целью настоящей работы было исследование состояние хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека при действии субоптимальной и сверхоптимальной температуры инкубации.

Материалы и методы

Объектом исследования служили клетки буккального эпителия четырех доноров женского пола в возрасте 21 -22 лет.

Клетки буккального эпителия соскабливали с внутренней поверхности щеки донора с помощью тупого стерильного шпателя и помещали в раствор следующего состава: 3,03 мМ фосфатный буфер,

pH=7,0 с добавлением 2,89 мМ хлорида кальция.

Пробу суспензии клеток (25 мкл) помещали в центрифугу пробирку, которую затем помещали в водный ультратермостат. Необходимая температура поддерживалась в термостате с точностью до 0,2 °С. В пробирках поддерживалась та же температура, что и в термостате.

Клетки инкубировали при температуре 15, 32, 40, 44 и 48 °С в течение 20 минут, затем подвергали окрашиванию. Контролем служили клетки, инкубируемые при 36 °С.

Состояние хроматина в ядрах клеток исследовали, оценивая содержание гранул гетерохроматина (СГГ) после окрашивания клеток 2% раствором орсеина в 45% уксусной кислоте в течение 1 часа [22]. Величину СГГ в каждом варианте эксперимента определяли в 30 ядрах. О различиях между контролем и опытом судили по средним величинам СГГ. Поскольку измерение СГГ проводилось параллельно в контрольных и опытных пробах, контроль принимался равным 100%, а опыт оценивался в процентах к контролю.

Результаты и обсуждение

В норме соотношение ϵ - и гетерохроматина в ядре для каждого донора индивидуально и может варьировать в связи с физиологическим состоянием и возрастом [9]. Известно, что повышение степени гетерохроматинизации свидетельствует о снижении активности процессов биосинтеза в ядре [10].

В нашем эксперименте наименьший уровень СГГ отмечен у доноров А и С - $16,1 \pm 0,24$ и $16,4 \pm 0,46$, соответственно. Для доноров В и В СГГ равно $17,2 \pm 0,34$ и $18,8 \pm 0,43$.

В *таблице 1* представлены результаты, отражающие изменение состояния хроматина под действием высокой и низкой положительной температуры.

Таблица 1
Влияние температуры инкубации на степень компактизации
хроматина (СГГ, %)

Донор	СГГ, % к контролю					
	Температура, °С					
	15	32	36	40	44	48
А	110,2 ± 3,4*	107,6 ± 2,9*	100,0 ± 4,0	109,8 ± 4,2*	117,0 ± 3,4*	123,8 ± 4,0 *
В	112,3 ± 3,6*	101,3 ± 3,1	100,0 ± 2,8	96,5 ± 2,6	110,4 ± 3,2*	107,8 ± 2,7 *
С	117,0 ± 3,7 *	113,2 ± 3,4 *	100,0 ± 2,1	113,2 ± 3,2*	116,9 ± 3,9*	123,4 ± 3,9*
И	108,0 ± 3,7*	110,3 ± 4,1 *	100,0 ± 3,2	106,4 ± 3,8	108,3 ± 4,4	116,6 ± 3,6*

Примечание: Указаны средние данные СГГ (количество ядер $n = 30$):
± - стандартная ошибка среднего; * - уровень отличий от
контроля $P < 0,05$

Из представленных данных видно, что под влиянием инкубации клеток при высокой температуре наблюдается значительное увеличение показателя СГГ, что свидетельствует о конденсации хроматина при действии температуры 40 - 48 °С. Выявлены индивидуальные различия в реакции клеток разных доноров на температурное воздействие. Так, в клетках доноров А и С достоверные изменения СГГ наблюдаются уже при температуре 40 °С, в клетках донора В - при 44 °С, в клетках донора О - при температуре 48 °С. Общие закономерности изменения показателя СГГ таковы:

Степень конденсированности хроматина возрастает с ростом температуры. Увеличение степени компактизации хроматина наблюдается уже при температуре 40 °С, максимальных значений показатель достигает при 44 °С. Возрастание показателя содержания гранул гетерохроматина в условиях 44-градусной инкубации клеток по сравнению с 40-градусной статистически достоверно ($p > 0,95$). В степени компактизации хроматина при воздействии температур 44 и 48 °С достоверной разницы не выявлено ($p < 0,95$).

Наблюдаемые изменения степени конденсированности хроматина хорошо согласуются с данными о снижении общего уровня функциональной активности генома при действии высокой температуры [15, 18, 23]. Подобные изменения степени конденсированности хроматина отмечены в работе [21]. Конденсация хроматина отмеча-

лась при тепловом шоке (42 °С, воздействие 30 минут) в культивируемых клетках карциномы эпидермиса человека Нер-2. При тепловом шоке наблюдается отделение хроматина от внутренней мембраны оболочки ядра. Однако, в отличие от процесса апоптоза, при тепловом шоке не наблюдается потери ламины в клеточном ядре и расщепления scaffold attachment factor (SAF-A). Авторы делают вывод о том, что в условиях стресса (41-42 °С, время воздействия 15-30 мин) происходит конденсация хромосом без последующего резкого снижения метаболической активности или отсроченной гибели клеток (апоптоза). В более жестких условиях теплового шока (43 - 44 °С, воздействие 30 минут) конденсация хроматина сопровождается более глубокими изменениями структуры ядра, в частности, миграцией белков из специфических ядерных доменов ND10, что отмечается при начальных стадиях процесса апоптоза [21].

В наших экспериментах конденсация хроматина наблюдалась не только при тепловом шоке, но и при холодовом шоке. При этом достоверное повышение СГГ наблюдалось в клетках всех доноров при температуре +15 °С. В клетках доноров А, С, D, в отличие от клеток донора В, конденсация хроматина наблюдалась также при температуре +32° С. Разница между показателями содержания гранул гетерохроматина при воздействии указанных температур статистически недостоверна ($p < 0,95$).

Конденсацию хроматина при кратковременном действии низкой температуры (холодовом шоке) наблюдали в ядрах клеток растений [1, 3]. Холодовой шок вызывал снижение синтеза РНК в клетках растений [2, 4, 5, 6, 14]. Эти данные хорошо согласуются с полученными нами результатами о повышении степени конденсированности хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека при холодовом шоке.

На основании результатов, приведенных в данной статье, а также анализа литературных данных [1, 3, 21], можно заключить, что по показателю СГГ клетка реагирует на тепловой и холодовой стресс сходным образом. Повышение или понижение температуры приводит к изменению состояния хроматина, что связано с изменением экспрессии генов. При гипотермии, так же как и при гипертермии происходит увеличение степени компактизации хроматина, свидетельствующее о снижении общей функциональной активности генома. Степень конденсированности хроматина зависит от силы действующего фактора, однако, существует определенный предел гетерохроматини-

зации.

Выводы

1. Обнаружено влияние субоптимальной и сверхоптимальной температуры инкубации на состояние хроматина ядер клеток буккального эпителия человека.
2. Установлено, что субоптимальная температура (15, 32 °С) вызывает возрастание показателя содержания гранул гетерохроматина в ядрах.
3. Сверхоптимальная температура (40, 44, 48 °С) вызывает конденсацию хроматина. Увеличение степени компактизации хроматина наблюдается уже при 40 °С, максимальных значений показатель достигает при 44 °С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аветисова Л.В. Влияние генотипических различий на реакцию ультраструктур клеток пшеницы, обусловленную низкими температурами // V Съезд Всесоюзного общества генетиков и селекционеров имени Н.И. Вавилова. - М. - 1987. - Т. 4. - Ч. 1. - С. 6.
2. Агафонов Н.С. Состояние хроматина клеточных ядер озимых культур в связи с адаптацией к холоду // Нуклеиновые кислоты и хроматин растений. - К.: Наукова думка. - 1981. - С. 3-6.
3. Балаурова Н.И., Тихова М.А., Маркова Т.М. Электронно-микроскопическое исследование влияния низкой положительной температуры на палисадные клетки // Физиология растений. - 1987. - Т. 34. - № 3. с. 612-617.
4. Войников В.К. Стрессовые белки растений при действии высокой и низкой температуры / Стрессовые белки растений. - Новосибирск: Наука. - 1989. - С. 5-20.
5. Джохадзе Д.И., Балашвили М.И. Особенности РНК-полимеразной активности клеточных ядер и хлоропластов листьев виноградной лозы // Физиология растений. - 1985. - Т. 32, № 5. - С. 860-865.
6. Клюева С.Т., Ченцов Ю.С. Структура интерфазных ядер и локализация в них РНП-продуктов при подавлении и стимуляции роста корешков *Allium fistulosum* // Цитология и генетика. - 1980. - Т. 14. - № 1. - С. 11-15.
7. Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. - М: Наука. - 1986. - 432 с.
8. Шкорбатов Ю.Г. Влияние видимого света на состояние хроматина и электрокинетические свойства клеточных ядер // Вестник Харьковского университета. - 1982. - № 226. - С. 41-43.
9. Шкорбатов Ю.Г. Состояние хроматина клеток буккального эпителия доноров разного возраста // Юбилейная научная конференция "Научное наследие академика И.Н. Буланкина и его развитие в со-

- временной биохимии". - Харьков. - 2001. - С. 170-171.
- Ю.Шкорбатов Ю.Г., Шахбазов В.Г., Горенская О.В., Дмитрук Т.В., Монтвид П.Ю. Изменение состояния ядра и хроматина клеток человека при действии гормональных факторов *in vitro* // Цитология и генетика. - 1999. - Т. 33. - № 5. - С. 64-71.
- 11.Шкорбатов Ю.Г., Шахбазов В.Г., Монтвид П.Ю. Вплив гормональних факторів на електрокінетичні властивості ядер та хроматину у клітинах людини *in vitro* // II з'їзд Українського біофізичного товариства. Тез. доп. Харків. - 1998. - С. 155.
- 12.Шкорбатов Ю.Г., Шахбазов В.Г., Руденко А.О., Болхассани М. О роли изменений состояния хроматина и биоэлектрических свойств ядер в реакции клеток на внешние воздействия // Труды по фундаментальной и прикладной генетике. - Харьков: "Штрих". - 2001. - С. 128-140.
- 13.Benjamin I.J. McMillan D.R. Stress (Heat Shock) Proteins // *Circulation Research*. - 1998. - V. 83. - P. 117-132.
- H.Criveceur M., Deltour R., Brouchart R. Effects of subminimal temperature on physiology and ultrastructure of *Zea mays* embryo during germination // *Can J Bot* -1983. - V. 61. - № 4. - P. 1117-1125.
- 15.EUgaard E.G., Clever U. RNA metabolism during puff induction in *Drosophila melanogaster* // *Chromosoma*. - 1971. - V. 36. - P. 60-78.
- 16.Henning W. Heterochromatin // *Chromosoma*. - 1999. - Vol. 108. - P. 1-9.
- 17.Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards // *Ann Med*. - 1999.-V. 31.-P. 261-271.
- 18.Lengyel J.A., Pardue M.L. Analysis of mRNA made during heat shock in *Drosophila melanogaster* cultured cells // *J. Cell Biol*. - 1975. - V. 67. - P. 240.
- 19.Li W.X. Franklin W.A. Radiation- and heat-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells // *Radiat Res*. - 1998. - V. 150. - P. 190-194.
- 20.Pekkala D.H., Silver J.C. Characterization and nucleosomal core localization of Achlya histones involved in stress-induced chromatin condensation // *Exp Cell Res*. - 1990. - V. 187. - P. 16-24.
- 21.Plehn-Dujowich D., Bell P., Ishov A.M., Baumann C, Maul G.G.. Non- apoptotic chromosom condensation induced by stress: delineation of interchromosomal spaces // *Chromosoma*. - 2000. - V. 109. - P. 266-279.
- 22.Shckorbatov Y.G. He-Ne laser light induced changes in the state of the chromatin in human cells // *Naturwissenschaften*. - 1999. - V. 86. - № 9. - P. 450-453.
- 23.Simard R. The nucleus: action of chemical and physical agents // *Int. Rev. Cytol*. -1970. -V. 28. - P. 169-211.

**MODIFICATION OF CHROMATIN COMPACTISATION
DEGREE IN HUMAN BUCCAL EPITHELIAL CELL NU-
CLEI UNDER THE INFLUENCE OF HIGH AND LOW
POSITIVE INCUBATION TEMPERATURE**

**ZHURAVLYOVA LYUBOV A., SHCKORBATOV YLRY G., SHAKHBAZOV
VALERY G.**

Kharkov National University, Ukraine, Kharkov, 61077, pi. Svobody, 4

State of chromatin in human buccal epithelium cell nuclei under the influence of high and low positive temperature was studied. Experiment was carried out for investigation cell reaction on action of high and low positive temperature. The data obtained show that suboptimal and overoptimal temperature of cell incubation causes increase of chromatin compactisation degree. These data indicate decrease of total functional genome activity. Dependence of chromatin compactisation degree from temperature level was shown. The given experimental data is an evidence of the fact, that chromatin condensation is non-specific cell reaction on action hypothermia and hyperthermia.

Key words: buccal epithelium, chromatin, heterochromatin, heterochromatin granule quantity index (HGQ), temperature influence.