

УДК 575.112

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ЯДРЫШЕК НА ОСНОВЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ И ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЬЮТЕРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ**Б.С. Иолчиев¹, П.М. Кленовицкий¹, И.П. Новгородова¹, Ю.А. Прытков¹, Н.Ф. Хуснетдинова²**¹ ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская область, г.о. Подольск, пос. Дубровицы, Россия² Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, г. Москва, Россия

Введение. Ядрышко является самым крупным субкомпарментом ядра высших эукариотов. Это безмембранная структурная единица, функция которой заключается в синтезе рибосомальной РНК (рРНК) и биогенезе рибосом [1]. Уровень РНК в ядрышке является одним из основных факторов, влияющих на структуру ядра, так как каркас белков образует РНК ядрышки [2]. Ядрышко является динамической структурой, его активность зависит от биотических и абиотических факторов [3,4]. Оно играет определяющую роль в регуляции генома. В результате ингибирования транскрипции рРНК ее уровень в ядрышке снижается, что приводит к изменению строения и состава ядрышка. Ингибирование транскрипции рРНК приводит к перемещению одних белков к периферии, а других в нуклеоплазму. Белки, которые перемещаются в периферию образуют ядрышковый колпачок. Перемещение белков приводит к изменению состава ядрышка и его архитектуры [5,6]. [7]. Ядрышко является одним из основных факторов, регулирующих жизненный цикл клеток [8,9]. Оно играет большую роль в биогенезе рибонуклеопротеидов, регуляции, активности теломеразы [10,11]. Размеры ядрышка зависят от вида и могут быть меньше 1 мкм и больше 10 мкм, например, размер ядрышка у дрожжей меньше 1 мкм, тогда как у гороха оно больше 10 мкм [12]. Одним из факторов, влияющих на размер ядрышка является интенсивность синтеза рРНК, между этими показателями существует положительная корреляционная взаимосвязь [13]. В клетках в фазе деления увеличивается количество рРНК и ядрышко соответственно в таких клетках увеличивается [14]. Количество ЯОР в интерфазных клетках коррелирует с пролиферативной активностью клеток. Исследования показывают, что в ходе онтогенетического развития организма происходит снижение индекса ЯОР в интерфазных ядрах лимфоцитов в результате уменьшения пролиферативных и метаболических процессов в клетках.

Состояние ядрышкового аппарата является одним из критериев, позволяющих оценить активность клетки при различных физиологических и патологических процессах. Рибосомные гены играют важную роль в процессе адаптации организма к неблагоприятным экологическим условиям. Они предотвращают накопление активного кислорода, выполняя антиоксидантную защиту и препятствуют повреждению ДНК. Кластеры рибосомных генов локализованы в коротких плечах акроцентрических хромосом [15]. Количество формирующих ядрышкообразующие районы (ЯОР) и активные кластеры рибосомных генов (АкРГ) имеют большую вариабельность в зависимости от межклеточных и индивидуальных особенностей. Ядрышко содержит кислые негистоновые белки (C23, B23, UBF и РНК-полимераза), для которых характерно специфичное окрашивание азотнокислым серебром. Эти белки отвечают за активизацию и контроль транскрипции рибосомных генов, локализованных в ЯОР. Связь этих белков с количественными параметрами аргирофильных структур может быть использована для оценки активности рибосомных генов. Интенсивность Ag-окраски, используемой для выявления кислых негистоновых белков ЯОР можно использовать для оценки их активности. Активность ядрышка позволяет проводить оценку доли АкРГ на метафазных хромосомах и служит достаточно стабильным признаком (Grob A, Roussel P, Wright JE, et al. 2009). Было показано, что введение двунитевых разрывов в рДНК (с помощью технологий редактирования генома или лазерного микроизлучения) способно приводить к кардинальной перестройке структуры ядра, АТМ-зависимому подавлению транскрипции и активации различных механизмов репарации, что указывает на важную роль рДНК в поддержании структурной целостности генома (McStay B., 2016).

Целью исследования является разработка методов количественной и качественной оценки активности ядрышка с использованием интенсивности окраски аргирофильных областей.

Материалы и методы. Протоколы экспериментов были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Федерального исследовательского центра животноводства им. Л.К. Эрнста в соответствии с руководством Совета по контролю над экспериментами на животных.

Животные. Исследование выполнено на стадах овец и коз. В эксперименте участвовали 2 породы овец: романовская (n=25) и катадин (n=12), и общая численность исследуемых коз составила 32 животных. В группы выходили животные разного возраста и физиологического состояния. Все животные были исследованы ветеринарной службой.

Сбор крови и приготовление слайдов. Кровь у животных брали из вены. Лимфоцитов из крови выделяли с помощью метода седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина. В центрифужную пробирку на 1 мл раствора фиколла ($\rho = 1,077$ г./мл) наслоили 1 мл разведенной крови и центрифугировали в течение 45 мин при 3000 об / мин. Слой лимфоцитов осторожно собрали по всей площади сечения пробирки, перенесли в чистую, сухую центрифужную пробирку и разбавили ФСБ в соотношении 1:1. Содержимое пробирки центрифугировали 5 мин при 3000 об /мин. Затем надосадочную жидкость удаляли, а полученный осадок ресуспендировали в ФСБ. Приготавливали мазок, который высушивали при комнатной температуре. Препараты фиксировали метиловым спиртом. Окрашивали.

Микроскопия. Полученные слайды исследовали с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ni оборудованного цифровой видеокамерой DS-Qi2. Измерения и обработку полученных изображений проводили с помощью программного обеспечения NIS-Elements BR4.30.

Статистика. Для обработки полученной первичных цифровых материалов было использовано программное обеспечение Microsoft Excel-2010, для статистической обработки использовали пакет программ SPSS v. 23.0.

Результаты. Для идентификации объектов устанавливали следующие параметры учета: площадь и яркость ядер и ядрышек.

Определяли среднюю интенсивность окраски ядрышек и их общую площадь. Для оценки активности клеток использовали следующие показатели: n – количества ядрышек в клетке; $\sum N$ сумма количества ядрышек; S-площадь включений (ядрышка); $\sum S$ -общая площадь всех ядрышек; I_N -интенсивность окраски; I_{aver} . – средняя яркость объекта; A_{NOR} – активность ядрышка.

С помощью программ проводили измерение объектов, полученные первичные данные экспортировали в программу Microsoft Excel-2010 с помощью данной программы общее количество ядрышек и I_{color} – интенсивность окраски которой определяли расчетным методом по формуле: $I_N = 254 - I_{aver}$, показатель 254 соответствует степени плотности окрашивания прозрачного объекта, она равно нулю.

Активность ядрышек определяли по формуле: $A_N = I_N \sum S$.

В исследуемой популяции овец коэффициент вариации число ядрышек составило 43,8 % у коз 40,4 %. Максимальное число ядрышек в клетках составило 5 минимальное 1 (рис 2).

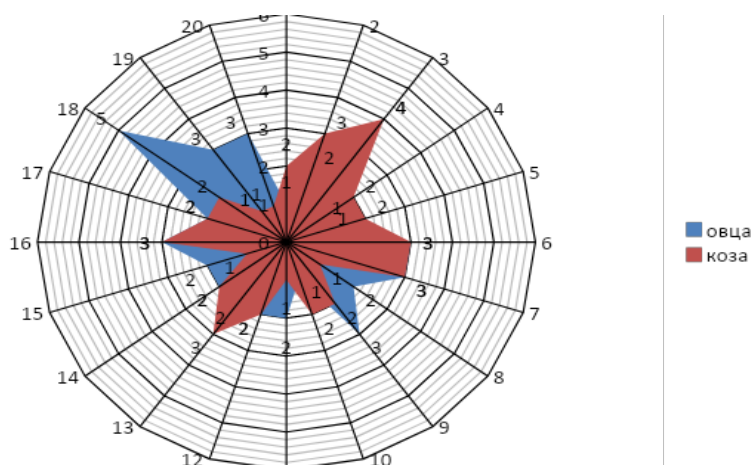


Рис. 2. Распределение частоты ядрышек у разных видов

В исследуемых популяциях, независимо от вида и породы, наиболее часто встречаются клетки с 2 ядрышками. В лимфоцитах исследуемых овец в среднем встречается 2,35 ядрышка у коз данный показатель составил 2,10. Площадь аргирофильных зон имеет высокую вариабельность в одной клетки могут быть ядрышки, размеры которых отличаются в несколько раз. Средняя общая площадь аргирофильных зон в исследуемых клетках в среднем у овец составила $275,66 \pm 27,23$ у коз $228,18 \pm 16,30$. Разница между

видами не имеет статистически значимой разницы. Интенсивность окрашивания, как и другие показатели имеют высокую вариабельность в пределах клетки в зависимости от ядрышек. Разница между видами не является статистически значимой.

Таблица 1. Показатели, характеризующие ядрышки инерфазных клеток у разных видов

Параметры	Виды	
	Овцы	Козы
Количества ядрышек в клетке	2,35 ±0,23	2,10±0,19
Общая площадь всех ядрышек	275,66±27,23	228,18±16,30
Интенсивность окраски ядрышек	155,74±3,11	110,00±2,19
Активность ядрышек организатора	42931±2146	25080±1723

Обсуждение. Результаты данного исследования показывают, что количество ядрышек имеет высокую вариабельность, оно варьирует в одной клетке от одного до пяти. В результате исследования установлено, что размер ядрышка зависит от вида и имеет высокий коэффициент вариации между клетками [12]. Данная гипотеза также была подтверждена в наших исследованиях. Размер ядрышка зависит от интенсивности синтеза рРНК, исследованиями установлено, что между данными показателями имеется положительная взаимосвязь [13, 14]. Результаты исследования, полученные в данном проекте, показывают, что площади и интенсивность окрашивания также имеет высокую вариабельность.

Закключение. Результаты исследования показывает, что площадь ядрышек и интенсивность окрашивание аргирофильных зон между клетками существенно отличается и эти показатели можно использовать для оценки активности ядрышек.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФИ: проект № 20–016–00116А.

Литература

- M. Boisvert, S. van Koningsbruggen and J. Navascués, A.I. Lamond 2007 The multifunctional nucleolus. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 574–585.
- B. McStay. 2016. Nucleolar organizer regions: Genomic “dark matter” requiring illumination. Genes Dev. **30**, 1598–1610.
- Yuki Hayashi, Akiko Fujimura and Kazashi Kato, Rina Udagawa, Toru Hirota, Keiji Kimura 2018 Nucleolar integrity during interphase supports faithful Cdk1 activation and mitotic entry Science Advances 4 (6).
- Németh Attila, Längst Gernot 2011 Genome organization in and around the nucleolus. Trends in genetics : TIG. **27**. 149–56. Doi:10.1016/j.tig.2011.01.002.
- X. Yuan, Y. Zhou and E. Casanova, M. Chai, E. Kiss, H. – J. Gröne, G. Schütz, I. Grummt 2005 Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. Mol. Cell 19 77–87.
- T. Kuroda et al.2011 RNA content in the nucleolus alters p53 acetylation via MYBBP1A. EMBO J. 30 1054–1066.
- Stepiński D 2014 Functional ultrastructure of the plant nucleolus Protoplasma 251, 1285–1306.
- Miroslav Dundr, Mark O.J. Olson 2017 Partially Processed pre-rRNA Is Preserved in Association with Processing Components in Nucleolus-derived Foci during Mitosis. Molecular Biology of the Cell Vol. 9, No. 9 2337–2698
- Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P. et al. 2008 Nucleolus: the fascinating nuclear body Histochem Cell Biol 129, 13–31.
- Hiscox, J. 2007 RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. Nat Rev Microbiol 5, 119–127
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI.2007 The multifunctional nucleolus. Nat Rev Mol Cell Biol. 8(7):574–85.
- Peter J Shaw, John WS Brown 2004 Plant nuclear bodies Current Opinion in Plant Biology Volume 7, Issue 6 614–620.
- Tiku, V.; Antebi, A. Nucleolar Function in Lifespan Regulation. Trends Cell Biol. 2018, 28, 662–672.
- Derenzini, M.; Trere, D.; Pession, A.; Montanaro, L.; Sirri, V.; Ochs, R.L. Nucleolar function and size in cancer cells. Am. J. Pathol. 1998, 152, 1291–1297.
- Bilban M, Vaupoti J 2001 Chromosome aberrations study of pupils in high radon level elementary school Health Phys. 80(2):157–163.
- Grob A, Roussel P, Wright JE, et al. 2009 Involvement of SIRT7 in resumption of rDNA transcription at the exit from mitosis. J Cell Sci. 122:489–498.