

СОЛОКАЛИЗАЦИЯ ЯДРЫШЕК В ЯДРАХ КЛЕТОК ЛИНИИ HeLa

© Ю. П. Петров,^{1,*} Ю. А. Негуляев,^{1,2} Н. В. Цупкина¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и

²С.-Петербургский государственный политехнический университет;

* электронный адрес: yure3ov@mail.ru

На клетках линии M-HeLa изучали особенности взаиморасположения ядрышек по отношению друг к другу и к ядру клетки. Для этого были использованы предложенные нами следующие морфометрические параметры: для двуядрышковых клеток — отношение величины длинной оси ядра к величине отрезка между центрами ядрышек и величина угла между отрезком, соединяющим центры ядрышек, и продольной осью ядра клетки; для трехядрышковых клеток — соотношение периметров ядра и треугольника, вершины которого находятся в центре ядрышек. Показано, что для каждой клетки значения этих параметров индивидуальны, но их величины для данной клетки во времени остаются постоянными, несмотря на то что форма клеток при этом изменяется. На основании полученных данных сделан вывод о том, что, с одной стороны, солокализация ядрышек в клетках HeLa индивидуальна для каждой данной клетки, а с другой — расположение ядрышек по отношению к ядру не изменяется во время интерфазы. При этом с увеличением ядра пропорционально увеличиваются расстояния между ядрышками.

Ключевые слова: ядрышко, ось ядра, интерфаза, морфометрия клетки.

Для тестирования клеточных популяций при изучении биологии клеток в культуре очень важно иметь параметры, наиболее точно отражающие обычное (нормальное) состояние живых интактных клеток. Классическим параметром, характеризующим индивидуальность различных типов клеток, может быть, например, ядерно-цитоплазматическое отношение. Его используют как тест, отражающий специфику различных тканей многоклеточного организма, клетки которых, как правило, морфологически однородны. Однако для клеток постоянных линий из-за их гетерогенности лучше использовать другие параметры, сохраняя тот же принцип (соотношения) и учитывая особенности биологии клеточных линий.

Клетки в культуре обычно разобщены, за исключением поздних фаз роста, связанных с формированием монослоя. У таких клеток (особенно фибробластоподобных) очень сильно варьирует форма, что приводит к нестабильности ядерно-цитоплазматического отношения во времени даже для отдельно взятой клетки. Для характеристики культивируемых клеток желательнее отбирать более стабильные морфологические признаки, которые к тому же хорошо поддаются формализации. К таким структурам клетки, характеризующим ее морфофункциональные особенности, можно отнести ядрышки (Штейн и др., 1999; Болгова и др., 2012). Они существуют во всех клетках и, как правило, легко идентифицируются в клетках большинства постоянных линий. Их количество детерминировано ядрышковыми организаторами соответствующих хромосом (Sullivan et al., 2001; Ченцов, 2004). Поскольку кариотип клеток постоянных линий индивидуален, ядрышки также должны отражать индивидуальные особенности клеток. Ядрышки легко тестировать по

их количеству и площади (Kodiha et al., 2011). Однако нельзя исключать, что для морфометрии ядрышек можно использовать и другие их особенности, в частности ориентацию внутри ядра.

Цель настоящей работы заключалась в определении степени постоянства взаиморасположения ядрышек по отношению к ядру клетки. Объектом исследования была выбрана линия HeLa, в клетках которой число ядрышек относительно невелико, и они хорошо идентифицируются в живых клетках при обычной световой микроскопии без использования каких-либо красителей.

Материал и методика

В работе использовали клетки постоянной линии M-HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, сублиния HeLa), полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Культивировали клетки в пластиковых чашках Петри (35 мм; Nunk, Дания) на среде DMEM (Gibco, США), в атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °С. В питательную среду добавляли 10 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США) и 40 мкг/мл гентамицина. Клетки рассевали с плотностью (3—4) · 10³ кл./см².

Через 2 сут после посева чашку с клетками помещали на столик микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), оборудованного устройствами для долговременного прижизненного наблюдения за клетками (поддержание температуры, влажности и CO₂). Цейтраферную съемку проводили в течение 1 сут. Съемку проводили в проходящем свете (без использования дифференциального интерференционного конт-

раста), используя объектив Plan-Neofluar $\times 20/0.4$ и цифровую камеру AxioCam HRm с разрешением 1388×1040 пикселей. Съемку вели с 5-минутным интервалом между кадрами. Заданные условия эксперимента поддерживали автоматически программой AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Для количественного анализа использовали отдельные изображения, записанные в формате «JPEG».

Полученные цифровые изображения клеток анализировали с помощью программы ImageJ 1.47j (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Поскольку все электронные изображения клеток были выполнены при одних и тех же увеличении и разрешении, результаты измерения были оставлены в пикселях. В настоящей работе нами впервые предложено для формализации морфологических особенностей клеток использовать такие параметры, как расстояние между центрами ядрышек (для клеток с 2 ядрышками), периметр треугольника, вершины которого расположены в центре ядрышек (для клеток с 3 ядрышками), и периметр ядра и длина его продольной оси. Математическую и статистическую обработку данных проводили, используя Excel 2010 (MS Corporation, США).

Результаты

Наблюдая за миграцией клеток линии M-HeLa во время цейтраферной съемки, мы обратили внимание на то, что расположение ядрышек относительно ядра практически не меняется, несмотря на то что само ядро изменяет свою ориентацию при варьировании формы клеток. Для формализации этого феномена использовали две модели. В первой анализировали только те клетки, в ядрах которых было по 2 ядрышка, а во второй — по 3. Эти модели можно считать адекватными для популяции всех клеток HeLa, поскольку большинство из них имеет по 2—3 ядрышка на клетку.

Анализ двоядрышковых клеток проводили следующим образом. На цифровых изображениях вручную проводили отрезок между центрами ядрышек данной клетки. Измеряли его величину и угол наклона по отношению к

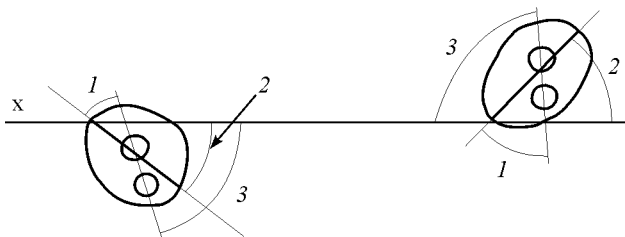
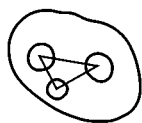


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая определение углов α (1), β (2) и γ (3).

Объяснение см. в тексте.

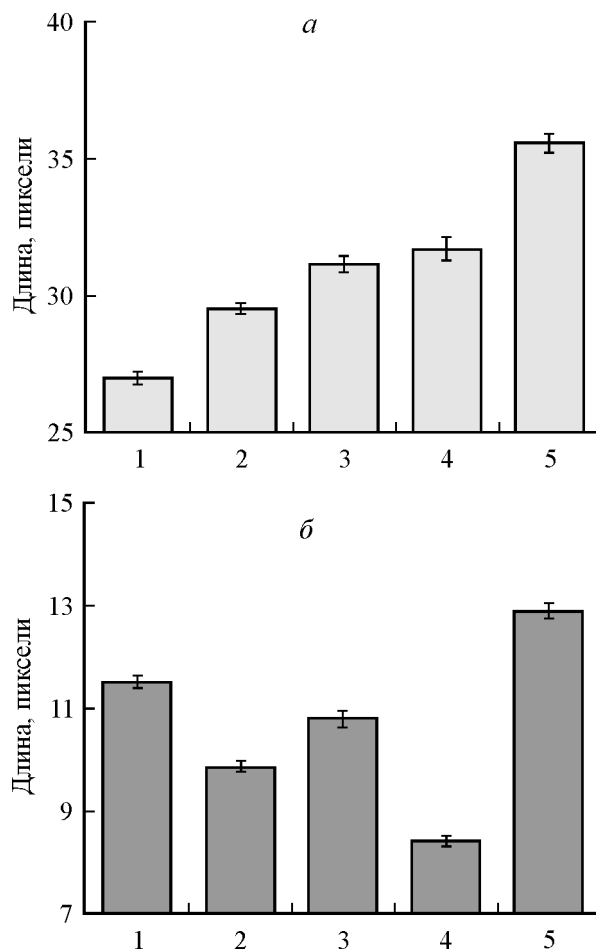


Рис. 2. Длина продольной оси ядра (а) и расстояния между центрами ядрышек (б).

Цифры под горизонтальной осью — номера двоядрышковых клеток. Представлены средние значения и их ошибки (вертикальные отрезки). Объяснение см. в тексте.

оси X поля зрения (угол γ). Одновременно для этой же клетки (также вручную) проводили отрезок по длинной оси ядра (если представлять форму ядра в виде эллипса) и также фиксировали угол ее наклона по отношению к оси X поля зрения (угол β). Измерение угла β программа ImageJ делает автоматически. Далее нетрудно вычислить угол между осью ядра и отрезком, соединяющим центры ядрышек (угол α). Сказанное демонстрирует схема, представленная на рис. 1. В ее верхнем левом углу представлен фрагмент изображения клеток HeLa, ядра и ядрышки которых представлены на схеме.

Для анализа в случайном порядке были отобраны 5 клеток с хорошо идентифицируемыми 2 ядрышками. Эти клетки не делились в течение 0.5 сут, что позволило удлинить время наблюдения. На рис. 2 представлены результаты измерения длинной оси ядра и расстояния между центрами ядрышек этих клеток. Для измерения использовали по 160 изображений каждой клетки. Представлены средние величины с соответствующими ошибками. Следует обратить внимание, что для укрупнения масштаба изменены нулевые точки осей ординат, чтобы нагляднее продемонстрировать достоверность различия ($P < 0.01$) между клетками по данным параметрам. Клетки на рис. 2, а ранжированы по возрастанию длинной оси их ядер. При сравнении этих данных с данными на рис. 2,

б можно видеть, что в этом ряду нет соответствующего (синхронного) увеличения расстояния между ядрышками. Это означает, что эти параметры не зависят друг от друга и индивидуальны для каждой клетки.

Далее был проведен анализ этих же клеток с изменением формы презентации. На рис. 3 представлена динамика изменения тех же параметров в течение 0.5 сут. Каждая временная точка — это среднее значение данного параметра 5 клеток при использовании 10 последовательных изображений с интервалом в 5 мин (т. е. среднее значение по 50 изображениям). Видно, что и расстояния между центрами ядрышек, и длины оси соответствующих ядер во времени увеличиваются линейно. Коэффициенты корреляции в обоих случаях очень высоки — 0.97 для каждого случая, что свидетельствует о хорошем соответствии расчетных значений опытным.

Представленные на рис. 3 абсолютные величины затрудняют оценку связи между обоими параметрами, констатируя лишь их независимый рост во времени. Для выявления корреляции между ними были использованы относительные величины. Их вычисляли следующим образом. Сначала рассчитывали средние значения по каждому параметру для всей выборки. Затем для каждой временной точки вычисляли отклонение от среднего (взятого за 100 %) соответствующей выборки и выражали его в процентах. Сравнение этих отклонений демонстрирует рис. 4. Теоретически связь между обоими параметрами в данном случае описывается линейным уравнением $y = 0.91x$ с коэффициентом корреляции 0.99. То, что прямая проходит через точку пересечения осей, очевидно, поскольку при вычислениях средние значения обоих параметров были взяты за 100 %. Важно, что в уравнении коэффициент 0.91 при x очень близок к 1. Это означает, что расстояние между центрами ядрышек увеличивается во времени фактически на одну и ту же относительную величину, что и размер длинной оси ядра. Это означает, что оба параметра во времени проявляются как связанная пара.

Анализируя связь между продольной осью ядра и отрезком, соединяющим центры ядрышек, можно сделать простое вычисление. Для каждой временной точки получили частное от деления величины первого параметра на величину второго. Полученные значения усредняли. В результате получили соотношение этих величин, равное 2.90 ± 0.01 . При этом значение стандартного отклонения равно 0.06 ± 0.01 , т. е. оно составляет всего 2 % от среднего значения. Поскольку разброс значений оказывается незначительным, величину 2.90 для данной группы клеток можно считать константой, независимой от увеличения во времени каждого из параметров. Эта константа указывает на то, что оба параметра изменяются синхронно.

Рис. 5 демонстрирует связь во времени между углом, образуемым отрезком, соединяющим центры ядрышек, и осью X поля зрения (угол β) и углом, образуемым длинной осью ядра и также осью X поля зрения (угол γ). Очень хорошо проявляется линейная корреляция между этими углами, в данном случае описываемая уравнением $y = 0.93x - 16.0$ с коэффициентом корреляции, равным 0.996. В этом линейном уравнении y — это угол β , а x — угол γ . Коэффициент a при x равен 0.93, т. е. близок к 1, что указывает на постоянство во времени разности между этими углами для данной группы клеток. Он численно равен коэффициенту b , т. е. 16 град. Фактически это угол между отрезком, соединяющим центры ядрышек, и про-

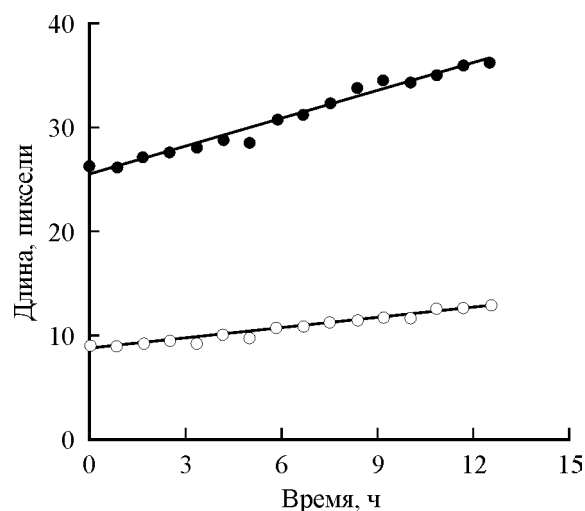


Рис. 3. Динамика изменения длинной оси ядра (темные кружки) и величины отрезка между центрами ядрышек (светлые кружки).

Объяснение см. в тексте.

дольной осью ядра (угол α). Расчет по экспериментальным данным дает то же значение этого угла — 15.6 ± 0.7 град (это значение получается, если угол α рассчитывать в пределах от -90 до $+90$ град). Несмотря на то что он имеет постоянную величину, среднее значение в 16 град справедливо только для данной небольшой группы в 5 клеток. Хотя данная выборка клеток очень мала, их очевидная индивидуальность по величине угла α дает основание полагать, что в генеральной совокупности среднее значение этого угла должно быть равно 0 (при шкале от -90 до $+90$ град).

Угол α лучше представлять в виде положительных значений, т. е. в пределах от 0 до 90, как это сделано на рис. 6. Из этих данных следует, что для каждой клетки угол α величина не только постоянная, но и индивидуальная. Это наглядно демонстрируют два примера для клеток «3» и «4» на рис. 7, а, б соответственно. Номера кле-

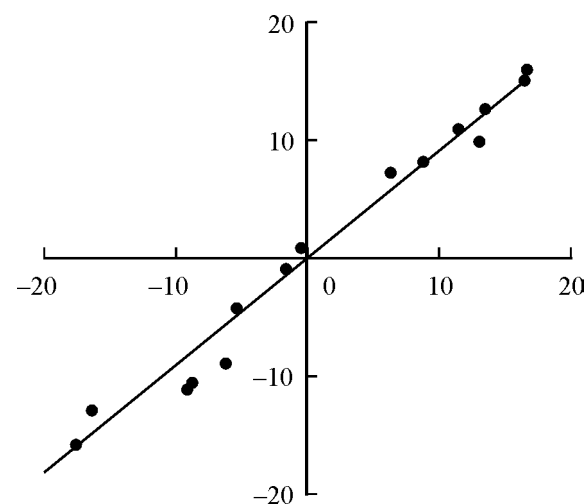


Рис. 4. Корреляция между относительным увеличением во времени продольной оси ядра (вертикаль) и расстояния между центрами ядрышек (горизонталь).

Размерность осей — %. Объяснение см. в тексте.

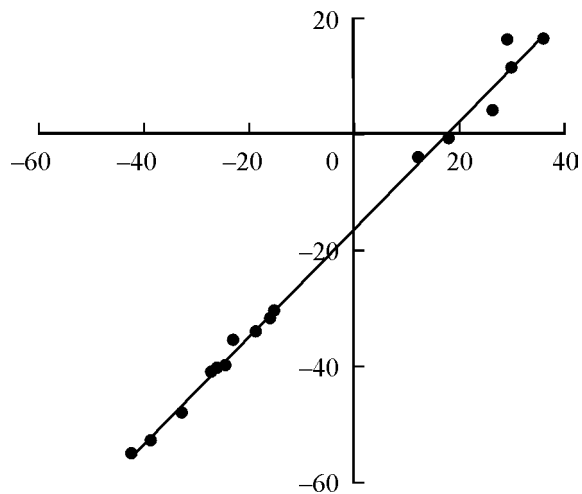


Рис. 5. Корреляция между углом β и углом γ .

Угол β образуется отрезком, соединяющим центры ядрышек (*горизонталь*), и осью X поля зрения; угол γ образуется длинной осью ядра и осью X поля зрения (*вертикаль*). Размерность осей — град. Объяснение см. в тексте.

ток соответствуют тем же клеткам, что и на рис. 2. Каждая временная точка — среднее из 10 значений данного угла, измеряемого каждые 5 мин. Несмотря на очевидную индивидуальность графиков для каждой из клеток, очевидна и синхронность изменения во времени углов β и γ , что свидетельствует о постоянстве угла α .

Наблюдения показывают, что клетки с тремя ядрышками также проявляют отчетливую индивидуальность локализации в плоскости ядра. Для формализации клеток с тремя ядрышками можно было бы использовать тот же способ, что и для клеток с двумя ядрышками. Но тогда возросло бы не только число вычислений, но и число параметров с 2 до 6 соответственно увеличению числа отрезков между центрами ядрышек и углов α . Поэтому для данного случая использовали другую модель.

Основываясь на данных, полученных на клетках с двумя ядрышками, можно полагать, что принцип постоянства расстояния между центрами ядрышек должен быть универсален. Тогда вместо отрезка, соединяющего

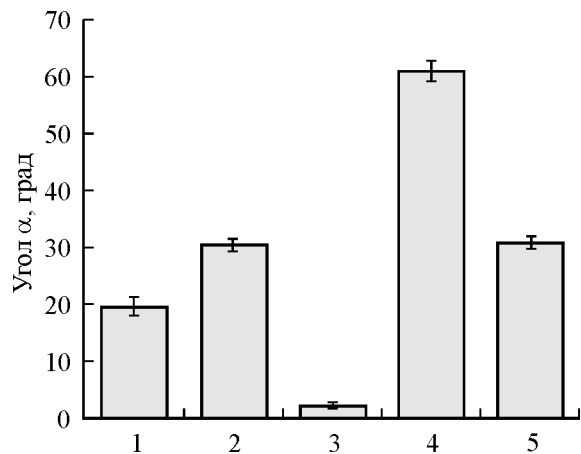


Рис. 6. Средние значения угла α , образуемого отрезком, соединяющим центры ядрышек, и продольной осью ядра.

Измерения проводили в течение 0.5 сут с интервалом в 5 мин; *вертикальные отрезки* — ошибки среднего; *цифры под горизонтальной осью* — номера тех же клеток, как представлено на рис. 1.

центры ядрышек, можно использовать периметр треугольника, вершины которого находятся в центре ядрышек (рис. 7). Как известно, треугольник в отличие от четырехугольника — фигура «жесткая», поэтому любое изменение взаиморасположения ядрышек обязательно отразится на величине периметра такого «ядрышкового» треугольника. В качестве пары для этого параметра использовали периметр ядра соответствующей клетки.

Для анализа случайным образом было отобрано 7 клеток с тремя хорошо идентифицируемыми ядрышками. Морфологию клеток регистрировали в течение 2.5 ч с интервалом в 5 мин. Средние величины периметров ядер клеток за этот период представлены на рис. 8, *a* (данные ранжированы от меньшего к большему). Как и для данных на рис. 2, *a*, здесь тоже заметна индивидуальность клеток, несмотря на всего 10%-ное различие этого параметра даже между 1-й и 7-й клетками. Центры ядрышек фиксировали вручную, что с неизбежностью приводит к вариабельности результатов измерения. Тем не менее отмечаются очень высокое постоянство и индивидуальность величины периметра треугольника, соединяющего центры ядрышек в течение данного периода времени (рис. 8, *b*). И так же, как в случае двух ядрышек, отсутст-

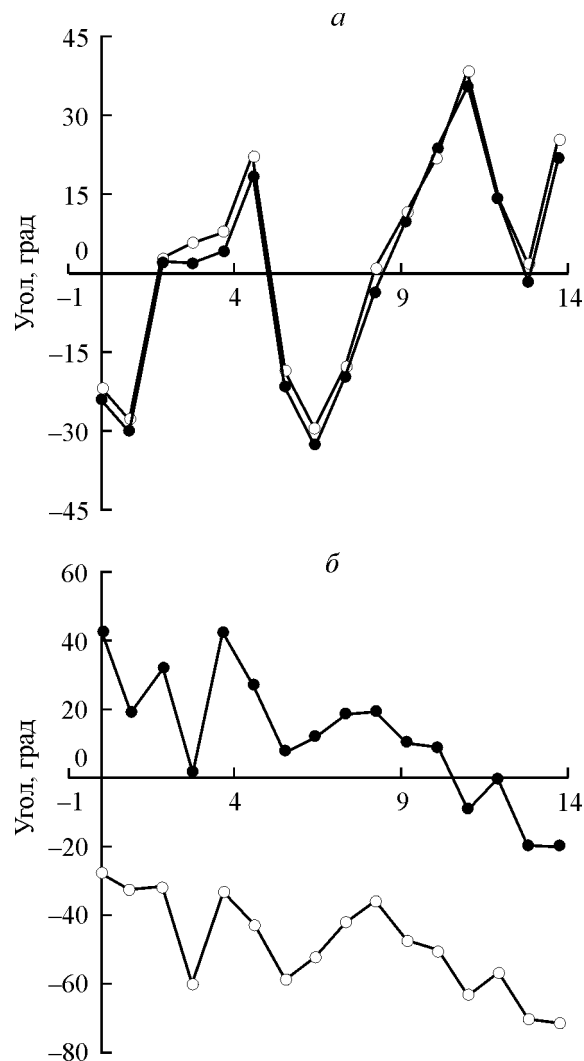


Рис. 7. Синхронность изменения углов β (*светлые кружки*) и γ (*темные кружки*) для клеток «3» (*a*) и «4» (*b*).

По горизонтали — время, ч. Объяснение см. в тексте.

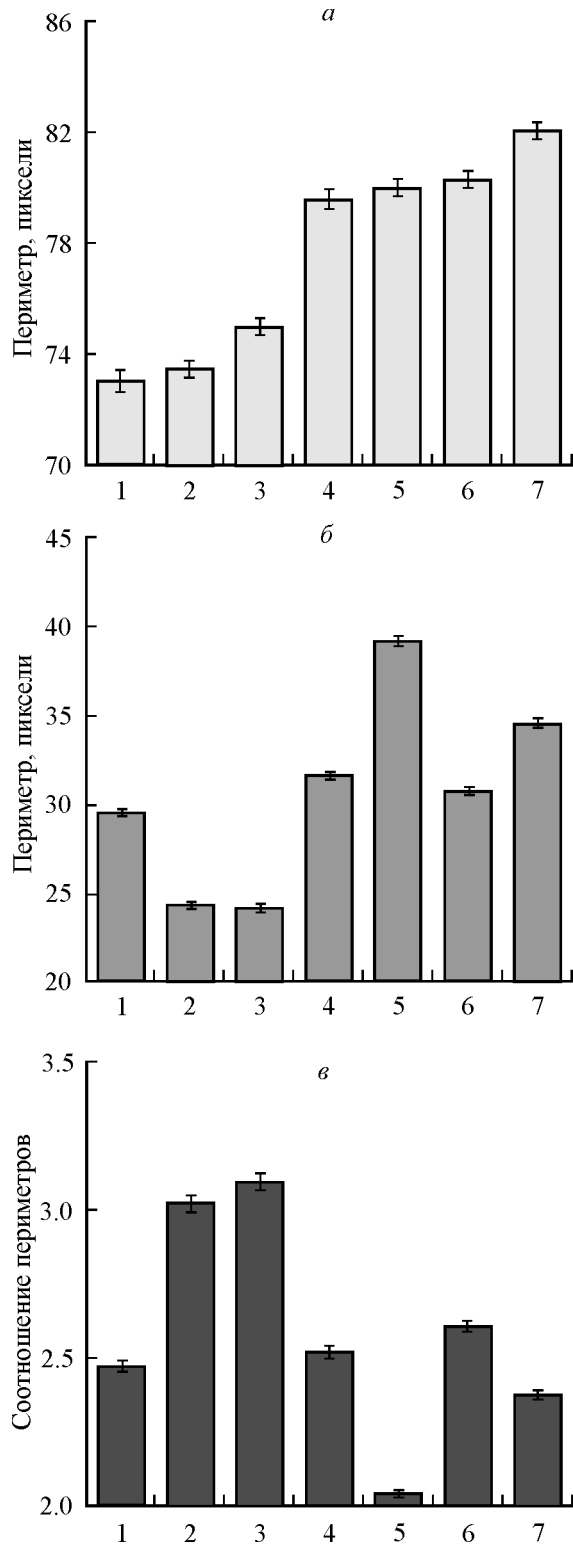


Рис. 8. Средние значения периметра ядра (а), периметра треугольника, вершины которого находятся в центрах ядрышек (б), и соотношение этих периметров (в) для 7 трехядрышковых клеток.

По горизонтали — номера клеток. Вертикальные отрезки — ошибки среднего.

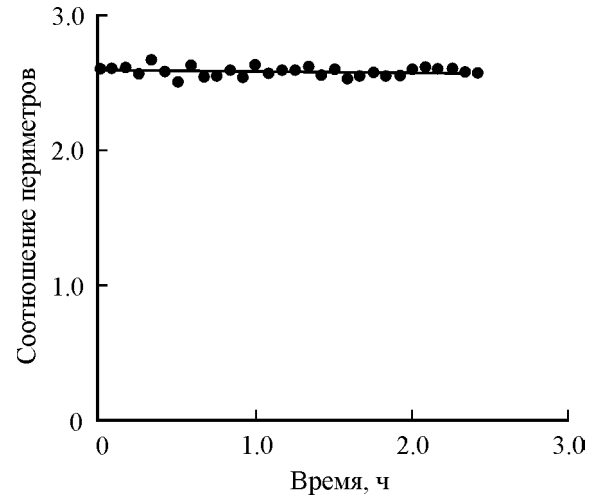


Рис. 9. Динамика вариабельности соотношения периметров ядра и ядрышкового треугольника для 7 трехядрышковых клеток.

Представлены средние значения и их ошибки с интервалом в 5 мин. Величины ошибок среднего в данном масштабе меньше, чем диаметры значков, поэтому не видны. Объяснение см. в тексте. Значки — экспериментальные значения. Сплошная линия — линия регрессии уравнения $y = ax + b$.

увет корреляция обеих величин в данном ряду клеток. Соотношение периметров (ядра и ядрышкового треугольника) говорит о высокой степени индивидуальности клеток по данному параметру, на что указывают чрезвычайно малые величины ошибок среднего во всех 7 случаях (рис. 8, в).

На рис. 9 показана динамика вариабельности среднего значения соотношения периметров ядра и ядрышкового треугольника. После расчета среднего значения этого соотношения для каждой временной точки с интервалом в 5 мин было получено линейное уравнение для данной группы клеток $y = -0.0005x + 2.60$. Поскольку коэффициент a при x фактически равен нулю, это означает, что коэффициент b является величиной постоянной (независимой от времени), что хорошо видно на графике — линия регрессии практически параллельна оси X . То же значение получается при расчете среднего соотношения периметров для всего массива экспериментальных данных по этим 7 клеткам: 2.59 ± 0.01 . При этом стандартное отклонение равно 0.034 ± 0.003 , что составляет 1.3 % от среднего значения. Таким образом, полученные данные для клеток с 3 ядрышками, так же как и для клеток с 2 ядрышками, указывают на независимое от времени строго фиксированное положение ядрышек по отношению к ядру данной клетки. При этом каждая клетка индивидуальна по данному параметру (см. рис. 8, в).

Обсуждение

В литературе большое внимание уделяется морфологии, физиологии и биохимии ядрышек как автономных структур клеточного ядра (Leung et al., 2003; Shaw, Doonan, 2005; Жарская, Зацепина, 2007; Bartova et al., 2010; Shaw, Brown, 2012). Такой подход, безусловно, имеет важное значение для цитологии и гистологии, на которых базируются прикладные дисциплины, например медицина. Однако он не всегда удобен для формализации клеточных свойств в рамках биологии клеток в культуре.

В литературе мы не нашли работ, использующих для характеристики культивируемых клеток подход, аналогичный нашему (определение местоположения ядрышек в ядре клетки).

Ядрышки не принято рассматривать как клеточные органеллы. Однако в качестве постоянных структур ядра они в определенной степени должны отражать его внутреннее строение. До недавнего времени термин «кариоплазма» означал, что все содержимое интерфазного ядра (кроме ядрышек) не имеет четкой упорядоченности, а следовательно, и жесткой структурной организации. Обычная световая микроскопия живых неокрашенных клеток, кроме ядрышек, не обнаруживает иной неоднородности кариоплазмы. Однако к настоящему времени накоплен большой фактический материал, указывающий на относительно упорядоченное расположение интерфазных хромосом (Boyle et al., 2001; Bolzer et al., 2005; Levi, Gratton, 2008; Hübner, Spector, 2010). Поскольку ядрышки как внутриядерные образования детерминированы хромосомами, представленные в настоящей работе количественные данные об их пространственном расположении в клетках HeLa можно рассматривать как подтверждение структурной упорядоченности ядра.

Внутриядерное расположение 2 или 3 ядрышек клеток HeLa имеет строго позиционирование во времени как по отношению друг к другу, так и по отношению к ядру в целом. Основанное на опытных данных, это утверждение требует некоторого логического пояснения, касающегося способа наблюдения за клетками. Используемая нами микроскопия позволяет регистрировать состояние ядрышек в плоскости клеток, а не в объеме. При таком наблюдении в случае варьирования во времени расстояния между центрами ядрышек однозначно можно было бы утверждать только то, что они не фиксированы относительно ядра, но не по отношению друг к другу. Очевидно, что свободно «плавающие» в кариоплазме, но фиксированные по отношению друг к другу ядрышки при обычной световой микроскопии не могли бы наблюдаться как связанная пара (то же справедливо и в случае 3 ядрышек). Поведение такой пары в динамике ничем бы не отличалось от несвязанных физически ядрышек.

Наблюдать ядрышки как пару в двумерной проекции можно только при следующих 3 условиях: если они фиксированы между собой; если они фиксированы по отношению к ядру; если ядро относительно жестко фиксировано по отношению к плоскости клетки. Теоретически возможен вариант, когда ядрышки фиксированы по отношению к плоскости клетки при свободно плавающем (вращающемся) ядре. Однако это маловероятно, поскольку ядро достаточно жестко позиционировано внутри клетки. Его положение детерминировано тем, что ядерная оболочка является частью эндоплазматического ретикула (Webster et al., 2009; Walters et al. 2012). Таким образом, высказанное выше утверждение о том, что ядрышки строго позиционированы как по отношению друг к другу, так и к ядру в целом, не вызывает сомнений. Однако это не означает, что измеренное расстояние между двумя ядрышками максимально или плоскость «ядрышкового» треугольника лежит в плоскости изображения.

Полученные результаты о варьировании величины угла α в разных клетках при его постоянстве во времени для данной клетки можно интерпретировать следующим образом. По-видимому, не существует строгой и одной и той же для всех клеток данной популяции пространственно-структурной внутренней организации ядра. В против-

ном случае расстояние между ядрышками и угол α были бы одни и те же для всех клеток (точнее, имели бы одно и то же среднее значение и стандартное отклонение). Экспериментальные данные этому не соответствуют. Однако они указывают на то, что эти параметры для каждой данной клетки во времени проявляют себя как константы. Такая ситуация, по-видимому, возможна только в случае, если при переходе от митоза к интерфазе образовавшаяся (относительно произвольно!) после митоза структурная организация данного ядра сохраняется до следующего деления данной клетки, причем эта структура, не изменяясь принципиально при росте интерфазной клетки, способна изменять свои пропорции, о чем свидетельствуют данные о синхронности варьирования во времени длинной оси ядра и расстояния между ядрышками.

На основании результатов настоящей работы о строго фиксированном положении ядрышек в ядре и известных данных литературы о том, что ядрышки образованы участками хромосом, называемыми ядрышковыми организаторами, можно полагать, что и остальные участки интерфазных хромосом (хроматина) имеют строгую внутриядерную упорядоченность для каждой данной интерфазной клетки в период от митоза до митоза. Таким образом, наши данные не противоречат современным представлениям об упорядоченной структуре клеточного ядра.

Несмотря на то что представленные результаты получены на небольшом числе клеток, нет оснований полагать, что они не могут быть экстраполированы на все клетки, по крайней мере линии HeLa. Для культивируемых клеток постоянных линий важно не только постоянство рассматриваемых параметров во времени, но и то, что величины этих констант индивидуальны для отдельных клеток. Таким образом, предложенные параметры могут быть полезны для анализа гетерогенности клеточных популяций.

Список литературы

- Болгова Л. С., Туганова Т. Н., Алексеенко О. И. 2012. Морфофункциональные типы ядрышек при дисплазиях цилиндрического эпителия и железистом раке шейки матки. *Клин. онкология*. 5 (1) : 158—162. (Bolgova L. S., Tuganova T. N., Alexeenko O. I. 2012. Morphofunctional types of nucleoli in dysplasia of columnar epithelium and cervical adenocarcinoma. *Klin. Oncologia*. 5 (1) : 158—162.)
- Жарская О. О., Зацепина О. В. 2007. Динамика и механизмы реорганизации ядрышка в митозе. *Цитология*. 49 (5) : 355—369. (Zharskaya O. O., Zatssepina O. V. 2007. The dynamics and mechanisms of nucleolar reorganization during mitosis. *Cell Tissue Biol*. 1 (4) : 277—290.)
- Ченцов Ю. С. 2004. Введение в клеточную биологию. М.: Академкнига. 495 с. (Chentsov Yu. S. 2004. Introduction in cell biology. М.: Academkniga. 495 p.)
- Штейн Г. И., Кудрявцева М. В., Кудрявцев Б. Н. 1999. Изменение морфометрических параметров окрашенных серебром ядрышек гепатоцитов крыс при циррозе печени и в процессе ее реабилитации. *Цитология*. 41 (7) : 574—579. (Stein G. I., Kudryavtseva M. V., Kudryavtsev B. N. 1999. Change of morphometric parameters of the rat hepatocyte nucleoluses dyed by silver during hepatocirrhosis and rehabilitation. *Tsitologiya*. 41 (7) : 574—579.)
- Bártová E., Horáková A. N., Uhlířová R., Raška I., Galiová G., Orlova D., Kozubek S. 2010. Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments. *J. Histochem. Cytochem.* 58 : 391—403.
- Bolzer A., Kreth G., Solovei I., Koehler D., Saracoglu K., Faith C., Muller S., Eils R., Cremer C., Speicher M. R., Cremer T.

2005. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol.* 3 : e157.

Boyle S., Gilchrist S., Bridger J. M., Mahy N. L., Ellis J. A., Bickmore W. A. 2001. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerlin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* 10 : 211—219.

Hübner M. R., Spector D. L. 2010. Chromatin dynamics. *Annu. Rev. Biophys.* 9 : 471—489.

Kodiha M., Bański P., Stochaj U. 2011. Computer-based fluorescence quantification: a novel approach to study nucleolar biology. *BMC Cell Biol.* 3 : 12—25.

Leung A. K., Andersen J. S., Mann M., Lamond A. I. 2003. Bioinformatic analysis of the nucleolus. *Biochem. J.* 376 : 553—569.

Levi V., Gratton E. 2008. Chromatin dynamics during interphase explored by single-particle tracking. *Chromosome Res.* 16 : 439—449.

Shaw P., Brown J. 2012. Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant Physiol.* 158 : 44—51.

Shaw P., Doonan J. 2005. The nucleolus. Playing by different rules? *Cell Cycle.* 4 : 102—105.

Sullivan G. J., Bridger J. M., Cuthbert A. P., Newbold R. F., Bickmore W. A., McStay B. 2001. Human acrocentric chromosomes with transcriptionally silent nucleolar organizer regions associate with nucleoli. *EMBO J.* 20 : 2867—2874.

Walters A. D., Bommakanti A., Cohen-Fix O. 2012. Shaping the nucleus: factors and forces. *J. Cell. Biochem.* 113 : 2813—2821.

Webster M., Witkin K. L., Cohen-Fix O. 2009. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J. Cell Sci.* 122 : 1477—1486.

Поступила 2 IX 2013

COLOCALIZATION OF NUCLEOLI IN CELL NUCLEI OF HeLa LINE

Yu. P. Petrov,¹ * Yu. A. Negulyaev,^{1,2} N. V. Tsupkina¹

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

and ² Chair of Physical and Chemical Biology of the Cell the St. Petersburg State Polytechnical University

* e-mail: yupe3ov@mail.ru

The pattern of localization of nucleoli relative to each other and to cell nucleus was studied in M-HeLa cell line. For this purpose, the following morphometric parameters were introduced. For the two-nucleolar cells: 1) the ratio of the nucleus long axis to the length of a segment between the centers of the nucleoli, and 2) the angle between the segment connecting the centers of the nucleoli and a longitudinal axis of cell nucleus. For the three-nucleolar cells: the ratio perimeter of the nucleus to perimeter of a triangle with vertexes in the centre of nucleoli. We have shown that the values of these parameters are individual for each cell but their values remain constant for the cell in spite of the changes in cell shape. These results allow us to conclude that, on the one hand, the nucleoli colocalization is individual for each cell, and, on the other hand, location of nucleoli in relation to nucleus is not changed during interphase. Thereby, the distance between nucleoli increases proportionally with nucleus growth.

Key words: nucleolus, nucleus axis, interphase, cell morphometry.