

DOI: 10.7868/S0041377118100090

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОТОМКОВ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ ПОСЛЕ ТЕПЛОВОГО ШОКА И РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ

© M. A. Шилина,* [3. В. Ковалева, T. M. Гринчук

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

* электронный адрес: shili-mariya@yandex.ru

В настоящей работе была изучена кариотипическая стабильность потомков эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека (эМСК) после воздействия на клетки рентгеновского облучения и теплового шока (ТШ) в сублетальных дозах. Кариотипирование G-бандированных метафазных хромосом показало, что оба типа экзогенного стресса вызывали однотипные изменения. В обоих случаях около 80 % клеточной популяции характеризовались анеуплоидией и (или) хромосомными поломками. Хромосомы 1 и 4 вовлекались в поломки неоднократно. Диапазон разнотипных хромосом кариотипического набора, характеризующихся структурной нестабильностью, в результате стрессового воздействия температуры по сравнению с воздействием рентгеновскими лучами был выше. Несмотря на вспышку кариотипической нестабильности после воздействия стресса обоих типов, в процессе дальнейшего культивирования анализируемые эМСК входили в фазу репликативного старения и погибали, не подвергаясь иммортализации (онкогенной трансформации).

Ключевые слова: стволовые клетки человека, рентгеновское излучение, тепловой шок, хромосомные перестройки, поломки, анеупloidия

Принятые сокращения: эМСК — эндометриальные мезенхимные стволовые клетки, ТШ — тепловой шок, SA- β -Gal — ассоциированная со старением бета — галактозидаза.

Изучение реакции эМСК на стресс расширяет наши знания по биологии стволовых клеток. Количество, размер и структура хромосом в клетке являются видоспецифическими признаками. Частота изменений генетического материала зависит от условий окружающей среды. Адаптация организма к изменениям окружающей среды сопровождается возникновением кариотипической нестабильности. Изменения в генетическом аппарате на уровне хромосом могут быть как случайными, так и закономерными, вызванными экзогенными или эндогенными факторами. Ионизирующее излучение, химические вещества и изменения температурного режима влияют на структуру ДНК, поэтому изучению влияния этих факторов на геном уделяется повышенное внимание. Обнаружено, что реакция клеток на тепловой шок зависит от интенсивности и продолжительности его воздействия, а также от типа клеток. Показано, что в результате как гипертермии, так и ионизирующего излучения может возникать нестабильность генома, которая на хромосомнном уровне проявляется в виде поломок (Kodama et al., 2001; Ohtaki et al., 2004; Gupta, Srinivas, 2008; Stoilov et al., 2013).

Есть данные о том, что увеличение дозы облучения сопряжено с увеличением числа хромосомных aberrаций (Bhatti et al., 2008; Plamadeala et al., 2015), а селекция клеток фибробластов китайского хомячка на устойчи-

вость к повышенной температуре приводила к появлению новых хромосомных амплификаций и аберраций (Гринчук и др., 2014).

Настоящая работа посвящена сравнению кариотипических изменений в эМСК-индуцированных сублетальными дозами рентгеновского облучения и теплового шока (ТШ).

Материал и методика

Объектом исследования служила линия эМСК человека (рабочее название 2304), полученная и охарактеризованная сотрудниками в Институте цитологии РАН (Земелько и др., 2011).

Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10 % бычьей эмбриональной сыворотки (HuClone, США), 1 % антибиотика-антимикотика и 1 % GlutaMAX (Gibco, США); пересевали 2 раза в неделю в соотношении 1 : 3—1 : 4, используя 0.05%-ный раствор трипсина / ЭДТА (Invitrogen, США).

Стресс. На 6-м пассаже культивируемые эМСК подвергали воздействию сублетального ТШ (45 °C, 30 мин). Прогретые клетки возвращали в стандартные условия и культивировали еще 6 пассажей. На 12-м пассаже клетки кариотипировали. На 9-м пассаже эМСК об-

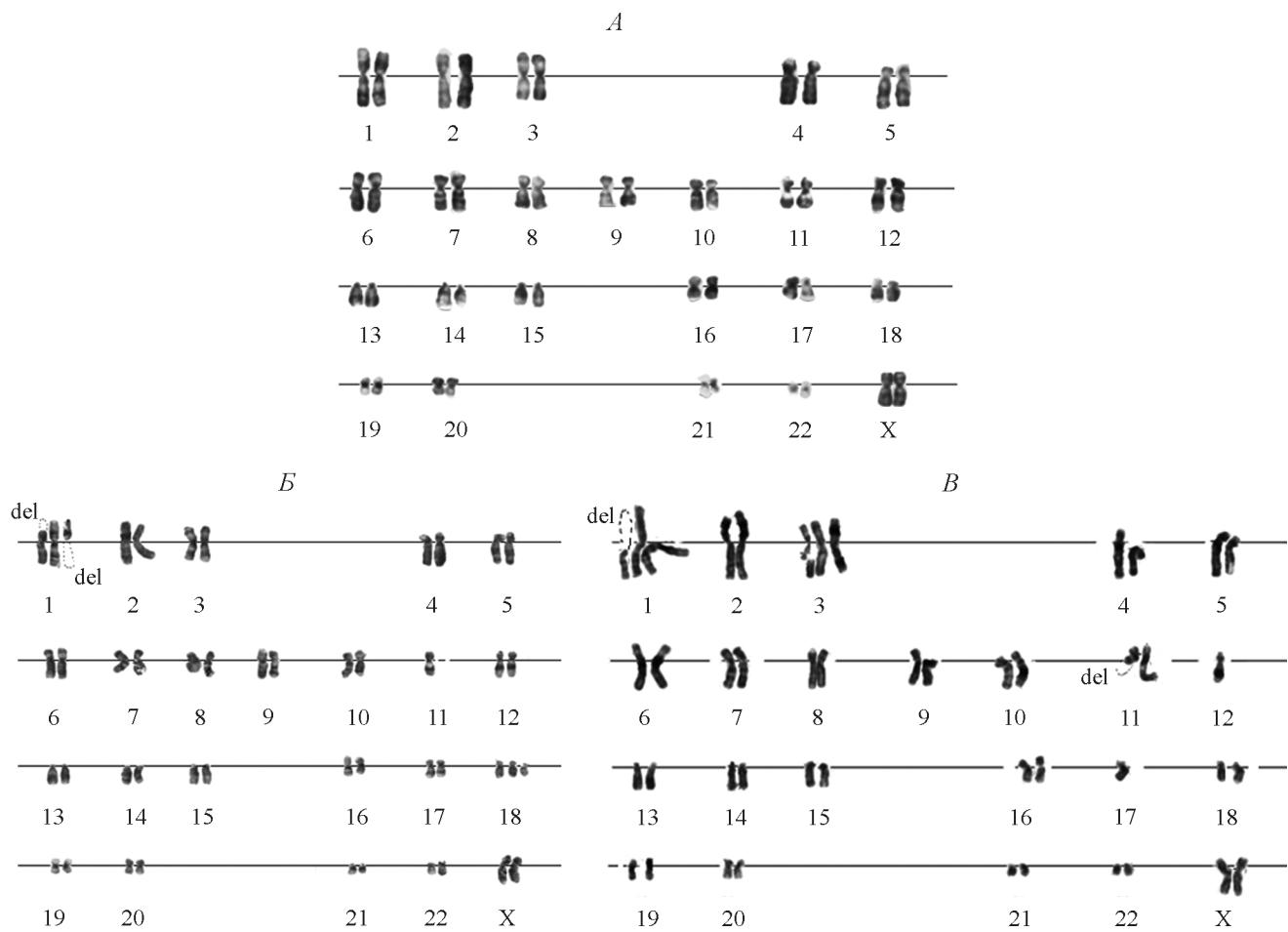


Рис. 1. Кариотип эМСК в контроле (A), на 4-м пассаже после облучения рентгеновскими лучами в дозе 5 Гр (B) и на 6-м пассаже после теплового шока 45 °С, 30 мин (B).

B — трисомия, прицентромерная и дистальная поломки хромосомы 1, моносомия хромосомы 11, трисомия хромосомы 18; B — трисомия и прицентромерная поломка хромосом 1 и 3; прицентромерная поломка хромосомы 11; моносомия хромосом 12 и 17. эМСК в общей сложности прошли 13 (B) и 12 (B) пассажей.

лучали сублетальной дозой рентгеновских лучей (5 Гр) и культивировали далее в стандартных условиях в течение 4 пассажей, после чего кариотипировали.

Кариотипический анализ проводили в соответствии со стандартным протоколом. Клетки высевали с плотностью $(14-15) \cdot 10^3$ кл./см². Через 24–25 ч добавляли 0.02 мг/мл колцемида (Sigma, США) на 1 ч. Затем среду удаляли, клетки открепляли от пластика 0.05%-ным раствором трипсина, клеточную суспензию центрифугировали (1500 об/мин), супернатант удаляли, осадок ресусPENDИРОВАЛИ и подвергали гипотонической обработке 0.56%-ным раствором KCl (1 ч). Затем суспензию центрифугировали (1300 об/мин), ресусPENDИРОВАЛИ и фиксировали в течение 1.5 ч на льду смесью метанола с уксусной кислотой (3 : 1), трижды меняя за это время фиксатор. Фиксированный материал раскалывали на холодные влажные предметные стекла. Препараторы высушивали при комнатной температуре. Метафазные пластинки окрашивали дифференциально на G-диски. Цитогенетический анализ проводили с использованием светового микроскопа Axio Scop (Carl Zeiss, Германия), используя объективы 100% и 20×. Хромосомы идентифицировали в соответствии с международной номенклатурой (Mitelman, 1995) и атласом хромосом человека (Мамаева, 2000).

Активность SA- β -Gal (маркера клеточного старения). Клетки ($\sim 10^5$) высевали в 3-сантиметровые чашки Петри и культивировали в течение 3 сут. Затем среду удаляли, клетки промывали PBS, фиксировали 4%-ным формальдегидом и окрашивали с помощью набора для выявления SA- β -Gal (Cell Signaling, США) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Активность SA- β -Gal визуализировали под микроскопом по появлению синей окраски.

Результаты и обсуждение

Кариотипирование эМСК, культивируемых в нормальных условиях, с применением дифференциальной окраски хромосом на G-диски на 15-м пассаже показало, что большинство проанализированных клеток имело структуру кариотипа, типичную для клеток человека в норме (рис. 1, A). На этом фоне с низкой частотой встречались клетки с отклонениями как по числу хромосом (появлялись анеуплоидные клеточные варианты), так и по структуре кариотипа. Цитогенетические изменения были нескольких типов — эктопическая конъюгация между хромосомами, изохромосомы и лишние хромосомные копии. Выявленные в пределах каждой проанализи-

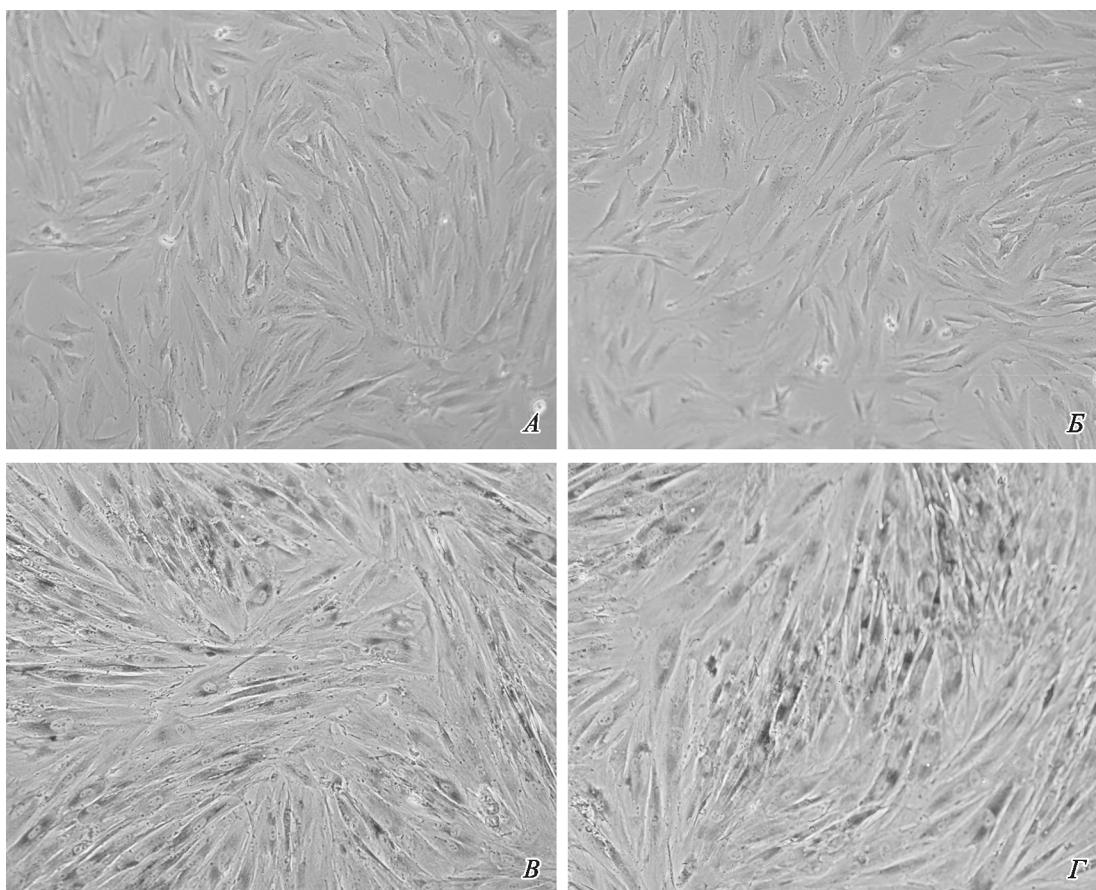


Рис. 2. Окраска на маркер клеточного старения SA- β -Gal эМСК, переживших рентгеновское облучение (A, B) и тепловой шок (B, Г).

A, Б—3-й пассаж после стресса; B, Г—эМСК на 15-м пассаже после рентгеновского облучения и 20-м пассаже после теплового шока соответственно.

рованной клеточной популяции кариотипические изменения не были закономерными и не получали пролиферативного преимущества в процессе культивирования клеток.

Эксперименты показали, что как сублетальный тепловой шок, так и рентгеновское облучение вызывают однотипные изменения в структуре кариотипа эМСК. В каждом случае около 80 % клеточной популяции имели нарушения кариотипа. Основными типами отклонений от нормы были анеуплоидия и хромосомные поломки (рис. 1, Б, В). Количество копий в анеупloidных клетках варьировало от 1 до 3, что является показателем неправильного расхождения клеток в митозе в результате нарушения механизма клеточного деления (Romanov et al., 2001; Miura et al., 2006). Поломки затрагивали разные участки хромосом, включая прицентромерные районы. Вовлекаемость разнотипных хромосом кариотипического набора в перестройки также была разной: после ТШ поломкам подвергалось в 2 раза больше хромосом (11 пар), чем после рентгеновского облучения (5 пар). При ТШ неоднократно вовлекались в поломки хромосомы 1—5 (рис. 1, В), при рентгеновском облучении — хромосомы 1, 4 и X (рис. 1, Б). Важно отметить, что хромосомы 1 и 4 подвергались перестройкам под влиянием и температуры, и рентгеновского облучения. Есть данные о том, что хромосома 1 проявляет нестабильность после ТШ и в других клеточных линиях человека (Enukashvily et al., 2007;

Eymery et al., 2009), а хромосома 4 вовлекалась в поломки после рентгеновского и радиационного воздействия (Boei et al., 1997; Stephan, Pressl, 1997; Богомазова, 2000). Окраска анализируемых клеток на маркер клеточного старения SA- β -Gal показала, что, несмотря на выявленную хромосомную нестабильность после воздействия обоих типов стресса, эМСК входили в фазу репликативного старения (рис. 2) и погибали, и это говорит в пользу того, что они не подверглись иммортализации или онкогенной трансформации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-50-00068).

Список литературы

Богомазова А. Н. 2000. Изучение стабильных и нестабильных хромосомных aberrаций у лиц, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС, в отдаленный пострадиационный период: Автореф. докт. дис. СПб. 40 с. (Богомазова А. Н. 2000. The study of stable and unstable chromosomal aberrations in persons affected by the Chernobyl accident in the remote post-radiation period: Doct. Thesis. St. Petersburg. 40 p.)

Гринчук Т. М., Шилина М. А., Алексеенко Л. Л. 2014. Нарушение стабильности структуры кариотипа фибробластов китайского хомячка линии CHL V-79 RJK в процессе длительного культивирования при повышенной температуре. Цитология. 56 (11): 841—849. (Grinchuk T. M., Shilina M. A.,

- Alekseenko L. L. 2014. Long-term cultivation of Chinese hamster fibroblasts of line V-79 RJK under elevated temperature leads to karyotype destabilization. *Tsitologiya*. 56 (11) : 841—849.)
- Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнина А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Кирсанов А. А., Бичевая Н. К., Корсак В. С., Никольский Н. Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. *Цитология*. 53 (12) : 919—929. (Zemelko V. I., Grinchuk T. M., Domnina A. P., Artzibasheva I. V., Zenin V. V., Kirsanov A. A., Bichevaia N. K., Korsak V. S., Nikolsky N. N. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization and use as feeder layer for maintenance of human embryonic stem cell lines. *Cell Tissue Biol.* 53 : 919—929.)
- Мамаева С. Е. 2002. Атлас хромосом — постоянные клеточные линии человека и животных. М.: Науч. мир. 231 с. (Mamaeva S. E. 2002. Atlas chromosomes permanent cell lines of human and animals. Moscow: Sci. World. 231 p.)
- Bhatti P., Doody M. M., Preston D. L., Kampa D., Ron E., Weinstock R. W., Simon S., Edwards A. A., Sigurdson A. J. 2008. Increased frequency of chromosome translocations associated with diagnostic X-ray examinations. *Radiat. Res.* 170 : 149—155.
- Boei J. J. W. A., Vermeulen S., Natarajan A. T. 1997. Different involvement of chromosomes 1 and 4 in the formation of chromosomal aberrations in human lymphocytes after X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 72 : 139—145.
- Enukashvily N. I., Donev R., Waisertreiger I. S.-R., Podgornaya O. I. 2007. Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cell. *Cytogenet. Gen. Res.* 118 : 42—54.
- Eymery A., Callanan M., Vourc'h C. 2009. The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. *Int. J. Develop. Biol.* 53 : 259—268.
- Gupta R. K., Srinivas U. K. 2008. Heat shock induces chromosomal instability in near-tetraploid embryonal carcinoma cells. *Cancer Biol. Ther.* 79 : 1471—1480.
- Harmon B. V., Corder A. M., Collins R. J., Gobe G. C., Allen J., Allan D. J., Kerr J. F. 1990. Cell death induced in a murine mastocytoma by 42—47 degrees °C heating *in vitro*: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int. J. Radiat. Biol.* 58 : 845—858.
- Kodama Y., Pawel D., Nakamura N., Preston D., Honda T., Itoh M., Nakano M., Ohtaki K., Funamoto S., Awa A.A. 2001. Stable chromosome aberrations in atomic bomb survivors: results from 25 years of investigation. *Radiat. Res.* 156 : 337—346.
- Mitelman F. (ed.). 1995. ISCN: International system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 114 p.
- Miura F., Kawaguchi N., Sese J., Toyoda A., Hattori M., Morishita S., Ito T. 2006. A large-scale full-length cDNA analysis to explore the budding yeast transcriptome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 103 : 17 846—17 851.
- Ohtaki K., Kodama Y., Nakano M., Itoh M., Awa A.A., Cologne J., Nakamura N. 2004. Human fetuses do not register chromosome damage inflicted by radiation exposure in lymphoid precursor cells except for a small but significant effect at low doses. *Radiat. Res.* 161 : 373—379.
- Plamadeala C., Wojcik A., Dorina C. 2015. Micronuclei versus chromosomal aberrations induced by X-ray in radiosensitive mammalian cells. *Iran. J. Public Health.* 44 : 325—331.
- Romanov S. R., Kozakiewicz B. K., Holst C. R., Stampfer M. R., Haupt L. M., Tlsty T. D. 2001. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature*. 409 : 633.
- Stephan G., Pressl S. 1997. Chromosome aberrations in human lymphocytes analysed by fluorescence *in situ* hybridisation after *in vivo* irradiation, and in radiation workers, 11 years after an accidental radiation exposure. *Int. J. Radiat. Biol.* 71 : 293—299.
- Stoilov L., Georgieva M., Manova V., Liu L., Gecheff K. 2013. Karyotype reconstruction modulates the sensitivity of barley genome to radiation-induced DNA and chromosomal damage. *Mutagenesis*. 28 : 153—160.

Поступила 17 VII 2018

COMPARATIVE CYTOGENETIC ANALYSIS OF THE PROGENY HUMAN ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STEM CELLS IN CULTURE AFTER HEAT SHOCK AND X-RAY IRRADIATION

M. A. Shilina, [Z. V. Kovaleva, T. M. Grinchuk*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
* e-mail: shili-mariya@yandex.ru

The aim of this study was to investigate the cytogenetic assay of endometrial mesenchymal stem cells (eMSC) *in vitro* after the exposure to a sublethal dose of X-rays and the sublethal heat shock (HS). For the analysis of chromosomes, we used the G-banding technique. We showed that both types of stress caused similar changes in eMSC karyotype structure. In both cases, 80 % of the cell population had karyotype abnormalities. Chromosomes 1 and 4 were involved in breakdowns repeatedly. The range of heterogeneous chromosomes of the karyotypic set, characterized by structural instability, as a result of the stress effect of temperature in comparison with the exposure to X-rays was higher. Despite the outbreak of karyotypic instability after exposure to both types of stress, during the further cultivation, the analyzed eMSC were entering the phase of replicative aging and then perished without undergoing immortalization / oncogenic transformation.

Key words: human stem cells, X-ray radiation, heat shock, chromosomal rearrangements, breaks, aneuploidy