

УДК 612.014.24-055.2

ИЗМЕНЕНИЯ ФАКУЛЬТАТИВНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА У ЖЕНЩИН В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

Зенкина В.Г., Шевчук Д.В.

*ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Владивосток, e-mail: zena-74@mail.ru*

Возрастные функциональные особенности репродуктивной системы женщин находятся в тесной зависимости от изменений нейроэндокринного гомеостаза, которые, несомненно, регулируются определенными генами. Активность этих генов, в свою очередь, зависит от степени компактизации хромосом и связана с участками гетеро- и эухроматина. Инактивацию X-хромосомы относят к одному из эпигенетических феноменов, которые рассматривает современная наука о наследуемых свойствах организма, не связанных с изменением собственно нуклеотидной последовательности, – эпигенетика. Число ядер, в которых присутствует гетерохроматин, зависит от степени пролиферации клеток в различных тканях, а также от гормонального статуса организма, влияния стресса, антибиотиков и глюкокортикоидов, физической активности женщины. Учитывая совершенно противоположные литературные данные по содержанию и изменчивости полового хроматина в ядрах клеток буккального эпителия, мы предприняли попытку определения телец Барра у женщин в возрастном аспекте. Доказано постепенное снижение количества полового хроматина в клетках буккального эпителия у женщин старших возрастных групп.

Ключевые слова: половой хроматин, буккальный эпителий, женщины в онтогенезе

CHANGES FACULTATIVE HETEROCHROMATIN WOMEN IN THE AGE ASPECT

Zenkina V.G., Shevchuk D.V.

Pacific State Medical University, Vladivostok, e-mail: zena-74@mail.ru

Age-related functional characteristics of the reproductive system in women are closely based on changes in neuro-endocrine homeostasis, which, undoubtedly, are regulated by certain genes. The activity of these genes, in turn, depends on the degree of compaction of chromosomes and is associated with areas of hetero- and euchromatin. Inactivation of the X chromosome are assigned to one of epigenetic phenomena, which considers the modern science of inherited properties of the body, not associated with changes in the actual nucleotide sequence is epigenetics. The number of nuclei, which contain heterochromatin depends on the degree of cell proliferation in various tissues, and hormonal status of the organism, the influence of stress, antibiotics and glucocorticoids, physical activity women. Given the completely opposite of the literary data on the content and variability of sex chromatin in the nuclei of buccal epithelium cells, we attempted to determine the Barr body in women in the age aspect. Proven gradual reduction in the number of sex chromatin in cells of buccal epithelium in women at older age groups.

Keywords: sex chromatin, buccal epithelium, women in ontogenesis

Определение половой принадлежности, а также своевременное выявление аномалий полового развития, наследование болезней, сцепленных с полом, представляет огромный интерес не только для врачей разных специальностей, но востребовано и в спорте, судебной медицине [2].

С самого раннего периода развития гистологии и цитологии в ядре были замечены интенсивно окрашивающиеся структуры. Их назвали прохромосомами, хромоцентрами, и считалось, что в этих местах хроматин проявляет положительный гетеропикноз. В настоящее время данные структуры определяются как гетерохроматин, в отличие от слабо окрашивающегося эухроматина. Впервые эти названия были предложены в 1933 году Гейтцем [11]. В 1937 году Гейтлер сообщал о половом ядерном диморфизме у насекомых, наблюдая двойное тело гетерохроматина у женских особей и одинарное тело у мужских особей, предполагая, что открытый им механизм может

найти применение при определении пола [11]. Впоследствии, в 1949 году, в журнале «Nature» была опубликована работа Бара и Бертрама, в которой ученые описали морфологические различия в нейронах самок и самцов [4]. Открытие особых образований – глыбок гетерохроматина в интерфазных ядрах соматических клеток (телец Барра) позволило в дальнейшем использовать половой хроматин для решения некоторых диагностических вопросов медицинской генетики. Тельце Барра соответствует одной из двух X-хромосом в клетках особей женского пола. В клетках у мужчин половой хроматин практически отсутствует, хотя некоторые авторы указывают на обнаружение 2–3% подобных глыбок [5].

Первоначально для определения полового хроматина применяли биопсию кожи, но вскоре был описан метод исследования мазка слизистой оболочки ротовой полости. Исследование эпителия полости рта – это попытка избежать хирургической биопсии,

заменить ее простым методом взятия материала и тем самым расширить возможность клинического применения метода. Так, у женщин-спортсменок проводят половой контроль перед олимпийскими играми [1]. Спортсменки, чей генетический пол не соответствует габитусу, имеющие морфологические признаки мужского соматотипа, имеют преимущество перед женщинами-спортсменками с женским кариотипом [1]. Безусловно, данный метод нашел применение и в медицине. Скрининговый тест, не требующий глобальных материальных затрат, применяется для быстрой диагностики количественных нарушений в половых хромосомах, таких как синдром Шерешевского – Тернера, Клайнфельтера, полисомии X [7].

В настоящее время все больше и больше авторов придерживаются мнения о том, что половой хроматин все-таки изменяется. Интересны и труднообъяснимы наблюдения Sohval и Casselman, которые установили, что величина и окраска полового хроматина может изменяться под влиянием антибиотиков [9]. Другие исследователи показывают, что в ротовой полости происходит снижение полового хроматина при некоторых видах аллергии, а также при стрессе [12, 15]. У индивидуумов женского пола половой хроматин в ротовой полости снижается при приеме глюкокортикоидов [9, 15]. В опухолях различных локализаций обнаружена четкая обратно пропорциональная зависимость между уменьшением числа ядер с половым хроматином и увеличением митотического индекса [10]. Так, при раке молочной железы значительная часть клеток показала потерю полового хроматина в значительной части клеток опухолей. Положительная корреляция между количеством полового хроматина в клетках и частотой метастазирования опухоли была описана в некоторых работах [6].

Учитывая совершенно противоположные литературные данные по содержанию и изменчивости полового хроматина в ядрах клеток буккального эпителия от 90% [8] до 28% [1], мы предприняли попытку определения телец Барра у женщин в онтогенезе, используя различные методы окраски клеток.

Цель исследования – изучить динамику полового гетерохроматина в различные периоды онтогенеза женщины.

Материал и методы исследования

Материалом для настоящего исследования послужили клетки буккального эпителия, полученные при обследовании 100 женщин трех возрастных категорий: I – 18–20 лет, II – 38–55 лет, III – 56–75 лет.

Соскоб эпителия производился с внутренней поверхности щеки. Ротовая полость предварительно прополаскивалась 2% содовым раствором, что несколько уменьшало примесь слизи и микробов к исследуемому материалу. Эпителий слизистой полости рта снимался закругленным стеклом с намеченного места слизистой, выпяченной при надавливании пальцем снаружи. Соскоб слизистой после равномерного распределения по стеклу немедленно фиксировался в смеси равных частей спирта и эфира в течение 24 часов. Препараты окрашивались несколькими способами:

- 1) крезил-виолетом или по методу Папаниколау;
- 2) ацетоорсеином;
- 3) окраской по Фельгену, при фиксации материала в смеси Дэвидсона.

Микроскопирование осуществлялось с использованием светового микроскопа с иммерсионной системой, увеличение $\times 1000$ (Микроскоп Carl Zeiss Axioscope A1, камера для документирования AxioCam ICc5). Для более достоверной картины подсчет количества телец Барра проводился в 100 ядрах клеток буккального эпителия.

Результаты исследования и их обсуждение

Тельце Барра имеет вид маленькой темной массы овальной формы, примыкающей к внутренней поверхности ядерной оболочки (рисунок). Диаметр такого тельца равен примерно 1 мкм, поэтому его легко увидеть с помощью иммерсионного объектива. Надо заметить, что обнаружить во всех исследуемых ядрах данные структуры нам не удалось.

Иногда ядра клеток здоровых мужчин содержат дискретные массы конденсированного хроматина, которые примыкают к ядерной оболочке и выглядят как тельца Барра. Итак, тельце Барра нельзя увидеть в каждом ядре, в котором оно имеется, и поскольку в ядрах, в которых этих телец нет, иногда можно видеть похожие на них дискретные массы хроматина, заключение о наличии или отсутствии телец Барра нельзя делать на основании беглого осмотра отдельных клеток.

Содержание полового гетерохроматина в I группе (молодые женщины) составило $35,7 \pm 3,1\%$ клеток, во II (женщины среднего возраста) – $33,2 \pm 2,5\%$ клеток, в III (женщины старшей возрастной категории) – $25,75 \pm 1,7\%$ клеток. Следовательно, с возрастом количество X-полового хроматина у женщин в интерфазных ядрах буккального эпителия уменьшается.

Все процессы, протекающие в организме человека, контролируются генетическим аппаратом клеток. Но механизм специфической активации определенных генов в отдельной взятой клетке или клеточной популяции остается не изученным до конца. Исследование структур интерфазного ядра и специфических изменений в нем дает возможность в какой-то мере судить о супрес-

сии или репрессии генов в зависимости от состояния организма. Возрастные функциональные особенности репродуктивной системы женщин находятся в тесной зависимости от изменений нейроэндокринного гомеостаза, которые регулируются определенными генами. Активность этих генов, в свою очередь, зависит от степени компактизации хромосом и связана с участками гетеро- и эухроматина [5, 9].

Хромосома переходит в состояние гетерохроматина [2, 3].

Возможный механизм инактивации X-хромосомы связан с локусом Xic, где содержится ген, названный Xist. Ген Xist служит матрицей для синтеза Xist РНК (X inactive specific transcript), в которой нет открытых рамок считывания (она не является кодирующей). РНК Xist «обволакивает» данную X-хромосому, тем самым



Тельце Барра в ядре клетки буккального эпителия женщины. Окраска ацетоорсеином, 1000x

Существование полов, а особенно то обстоятельство, что пол животного задается различиями по половым хромосомам, ставит перед системами регуляции экспрессии генов проблему: если гены, сцепленные с X-хромосомой, будут экспрессироваться с разными интенсивностями у особей обоих полов, то количество продуктов экспрессии в клетках самки будет в 2 раза больше, чем в клетках самца. Чтобы избежать такой ситуации, существует явление компенсации доз генов [5, 9]. Суть явления состоит в выравнивании интенсивности экспрессии генов, расположенных на X-хромосоме, между полами. У млекопитающих этот механизм представлен полной инактивацией одной из двух X-хромосом в женском организме, в результате чего у самок активна только одна X-хромосома, что эквивалентно ситуации с самцами. Мишенью для регуляции служит вся хромосома в целом, т.е. затрагиваются все промоторы на хромо-

ее инактивируя. Xist РНК синтезируется на обеих X-хромосомах, но после инактивации такую РНК дает только неактивная X-хромосома (где ее и можно встретить). Интенсивность же транскрипции Xist остается прежней, следовательно, перемена состояния хромосомы зависит не от нее, а от каких-то посттранскрипционных событий [11, 14].

Содержимое локуса Xic оказывает свое действие в цис-манере и несет в себе информацию, достаточную для того, чтобы «подсчитать» X-хромосомы и инактивировать их все, кроме одной (правило $n - 1$). Правило $n - 1$ предполагает, что стабилизация РНК Xist происходит по умолчанию и что некий блокирующий механизм предотвращает такую стабилизацию лишь на одной из X-хромосом, которой предстоит остаться активной. Это означает, что хотя наличие Xic необходимо (и достаточно), чтобы хромосома оказалась инактивированной, для установления активного состояния

X-хромосомы могут быть необходимы продукты других локусов [14].

Инактивация распространяется от Xic по всей X-хромосоме. Если Xic присутствует в хромосоме-химере, возникшей в результате транслокации между X-хромосомой и аутосомой, инактивация распространяется и на аутосомные участки (хотя этот эффект не всегда отличается полностью). У нормальных самок X-хромосом, конечно же, две, но в тех редких случаях, когда неправильное расхождение хромосом приводит к генотипу с тремя или более X-хромосомами, активной останется лишь одна из них [13]. Это обстоятельство наводит на общую модель, в соответствии с которой с одной и только одной из X-хромосом происходит некое особенное событие, охраняющее ее от воздействия инактивирующего механизма, который тем временем применяется по отношению ко всем остальным X-хромосомам клетки. Для активности же X-хромосомы необходимо «погасить» на ней экспрессию Xist. Сайленсинг Xist можно предотвратить делецией гена ДНК-метилтрансферазы; скорее всего, эффект обусловлен тем, что метилирование промотора Xist необходимо для прекращения его транскрипции [13]. Таким образом, метилирование ДНК в геноме является специфической формой клеточной памяти (эпигенетическая память), которая играет ключевую роль в развитии благодаря специфическому кодированию генной экспрессии в разных клетках. Несмотря на единый геном клетки организма имеют разные эпигеномы, что обеспечивает дифференциальную экспрессию, разные клеточные фенотипы и функции [2].

Заключение

В самом начале изучения полового хроматина считалось, что процент клеток, содержащих тельца Барра, является постоянным и не изменяется ни под влиянием возраста, ни под воздействием других внутренних или внешних факторов. Тем самым диагностика пола на основании оценки полового хроматина должна быть надежной. Эта точка зрения была основана на многочисленных наблюдениях [1, 7, 15]. Возможно, неизменность полового хроматина можно было бы связать с постоянной пропорцией клеток в организме, содержащих и не содержащих половой хроматин. Это означает, что каждая ткань имеет свой процент содержания полового хроматина, чему пока нет доказательств.

Удивительно низкие результаты получают с эпителием ротовой полости, несмотря на то, что исследуемым материалом служат мазки, т.е. целые клетки. Число ядер, в которых присутствует гетерохроматин, зависит от степени пролиферации клеток в различных тканях, в частности в клетках буккального эпителия, а также от гормонального статуса организма. Можно предположить, что угасание функции половых желез посредством определенных факторов приводит к частичной деконденсации факультативного хроматина в некоторых клетках с целью усиления экспрессии генов X-хромосомы для поддержания уровня гормонов в женском организме.

Список литературы

1. Олейник Е.А., Дюсенова А.А. Использование метода буккальных мазков в определении полового хроматина у женщин-спортсменок // Морфология. – 2006. – Т. 130, № 5. – С. 66.
2. Шуматова Т.А., Приходченко Н.Г., Оденбах Л.А., Ефремова И.В. Роль метилирования ДНК и состояния фоллатного обмена в развитии патологических процессов в организме человека // Тихоокеанский мед. журн. – 2013. – № 4. – С. 39–43.
3. Anderson C.L., Brown C.J. Variability of X chromosome inactivation: effect on levels of TIMP1 RNA and role of DNA methylation // Hum Genet. – 2002. – Vol. 110. – P. 271–278.
4. Barr M.L., Bertram E.G. A morphological distinction between neurons of the male and female and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis // Nature. – 1949. – Vol. 163. – P. 676.
5. Berletch J.B., Yang F., Xu J. et al. Genes that escape from X inactivation // Hum Genet. – 2011. – Vol. 130. – P. 237–245.
6. Bodal Vijay Kumar, Kalra Ravneet, Bal Manjit Singh et al. Correlation between sex chromatin and female breast tumour in paraffin sections, buccal smears and peripheral blood films // J Clin Diagn Res. – 2014. – Vol. 8(3). – P. 92–95.
7. Bondy C.A. Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group // J Clin Endocrinol Metab. – 2007. – Vol. 92. – P. 10–25.
8. Carrel L., Willard H.F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females // Nature. – 2005. – Vol. 434. – P. 400–404.
9. Deng X., Berletch J.B., Nguyen D.K., Distèche C.M. X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease // Nat Rev Genet. – 2014. – Vol. 15. – P. 367–378.
10. Golovin D.I., Zus' B.A. Sex chromatin in oncomorphology // Arkh Patol. – 1981. – Vol. 43(12). – P. 3–8.
11. Lessing D., Anguera M.C., Lee J.T. X chromosome inactivation and epigenetic responses to cellular reprogramming // Annu Rev Genomics Hum Genet. – 2013. – Vol. 14. – P. 85–110.
12. Peeters S.B., Cotton A.M., Brown C.J. Variable escape from X-chromosome inactivation: identifying factors that tip the scales towards expression // BioEssays. – 2014. – Vol. 36. – P. 746–756.
13. Simon M.D., Pinter S.F., Fang R. et al. High-resolution Xist binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation // Nature. – 2013. – Vol. 504. – P. 465–469.

14. Splinter E., Wit E., Nora E.P. et al. The inactive X chromosome adopts a unique three-dimensional conformation that is dependent on Xist RNA // *Genes Dev.* – 2011. – Vol. 25. – P. 1371–1383.

15. Wu H., Luo J., Yu H. et al. Cellular resolution maps of X chromosome inactivation: implications for neural development, function, and disease // *Neuron.* – 2014. Vol. 81. – P. 103–119.

References

1. Olejnik E.A., Djusenova A.A. *Morfologija*, 2006, Vol. 130, no 5, pp. 66.

2. Shumatova T.A., Prihodchenko N.G., Odenbah L.A., Efremova I.V. *Tihookeanskij med. zhurn*, 2013, no. 4, pp. 39–43.

3. Anderson C.L., Brown C.J. *Hum Genet*, 2002, no. 110, pp. 271–278.

4. Barr M.L., Bertram E.G. *Nature*, 1949, no.163, p. 676.

5. Berletch J.B., Yang F., Xu J. et al. *Hum Genet*, 2011, no. 130, pp. 237–245.

6. Bodal Vijay Kumar, Kalra Ravneet, Bal Manjit Singh et al. *J Clin Diagn Res*, 2014, no. 8(3), pp. 92–95.

7. Bondy C.A. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, no. 92, pp. 10–25.

8. Carrel L., Willard H.F. *Nature*, 2005, no. 434, pp. 400–404.

9. Deng X., Berletch J.B., Nguyen D.K., Disteche C.M. *Nat Rev Genet*, 2014, no. 15, pp. 367–378.

10. Golovin DI, Zus' BA. *Arkh Patol*, 1981, no. 43(12), pp. 3–8.

11. Lessing D., Anguera M.C., Lee J.T. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2013, no. 14, pp.85–110.

12. Peeters S.B., Cotton A.M., Brown C.J. *BioEssays*, 2014, no. 36, pp.746–756.

13. Simon M.D., Pinter S.F., Fang R. et al. *Nature*, 2013, no. 504, pp. 465–469.

14. Splinter E., Wit E., Nora E.P. et al. *Genes Dev*, 2011, no. 25, pp. 1371–1383.

15. Wu H., Luo J., Yu H. et al. *Neuron*, 2014, no. 81, pp. 103–119.

Рецензенты:

Матвеева Н.Ю., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток;

Калиниченко С.Г., д.м.н., ст. научный сотрудник, ЦНИЛ ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток.