

## ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ФИБРОНЕКТИНА НА КАРИОТИПИЧЕСКУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В КЛЕТОЧНОЙ СУБЛИНИИ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ИНДИЙСКОГО МУНТЖАКА

© Г. Г. Полянская, Т. С. Горячая, Г. П. Пинаев

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru*

Исследована количественная и структурная кариотипическая изменчивость в «безмаркерной» клеточной сублинии МТ фибробластов кожи индийского мунтжака при культивировании клеток на поверхности пластиковых чашек, покрытой фибронектином. Показано, что при культивировании клеточной сублинии МТ на поверхности, покрытой фибронектином, в течение 1 и 2 сут характер распределения клеток по числу хромосом не изменяется по сравнению с контрольными вариантами. При культивировании МТ на поверхности, покрытой фибронектином, в течение 3, 4 и 8 сут существенно изменяется характер распределения клеток по числу хромосом по сравнению с контролями. Изменение распределения клеток по числу хромосом происходит за счет значительного снижения частоты клеток с модальным числом хромосом и увеличения с меньшими числами хромосом; появляется значительное количество новых дополнительных структурных вариантов кариотипа (СВК). Наблюдаемые изменения, по-видимому, связаны как с нарушениями в митотическом аппарате, так и с селекцией СВК, более приспособленных к измененным условиям культивирования клеточной популяции. Снятие клеток с поверхности, покрытой фибронектином, и дальнейшее культивирование их на гидрофильной поверхности в течение 1 сут не изменяют характер распределения клеток по числу хромосом, а культивирование в течение 5 сут приводит к восстановлению контрольного распределения. Частота хромосомных aberrаций при культивировании клеток на фибронектине в течение 3 и 4 сут достоверно увеличивается по сравнению с контрольными вариантами за счет значительного увеличения частоты дигетероцентриков (теломерных ассоциаций). При продолжении культивирования клеток на фибронектине до 8 сут уровень хромосомных aberrаций приближается к контролю. Наблюдаемая структурная нестабильность хромосом при культивировании на фибронектине демонстрирует неспецифическую реакцию «безмаркерных» клеточных линий на неблагоприятные условия. Обсуждаются возможные причины различий по характеру кариотипической изменчивости в фибробластах кожи индийского мунтжака при культивировании на ламинине и фибронектине.

Ключевые слова: кариотипическая изменчивость, клеточная линия, белки внеклеточного матрикса, фибронектин, структурный вариант кариотипа, хромосомные aberrации.

В клеточных популяциях *in vitro*, лишившихся контроля со стороны интегральных систем организма, основными типами клеточного взаимодействия остаются физический контакт между клетками и клеток с субстратом, а также химическая связь через метаболиты в культуральной среде. Эти взаимодействия объединяют клетки, составляющие клеточную популяцию, в единую автономную систему. Клетки растут на субстрате, покрытом внеклеточным матриксом, который состоит из разнообразных белков (протеогликанов, коллагенов, эластина, фибронектина, ламинина и др.), секретируемых самими клетками. Большинство клеток связано друг с другом и с внеклеточным матриксом в специализированных местах контакта.

Кариотипическая структура клеточных популяций *in vitro* имеет свои особенности по сравнению с таковой *in vivo*, где преобладает постоянный, преимущественно диплоидный, кариотип. В процессе стабилизации постоянной клеточной линии *in vitro* устанавливается сбалан-

сированная кариотипическая структура, характеризующаяся определенными структурными и количественными изменениями хромосом; при этом для каждой клеточной линии существуют определенные ограничения по кариотипической изменчивости (Zacharov, 1964; Захаров, 1966; Полянская и др., 1981; Мамаева и др., 1986; Мамаева, 1996; Филатов и др., 1988; Poljanskaya, Vakh-tin, 2003). Образование сбалансированной кариотипической структуры необходимо для создания оптимального генного баланса, способствующего длительному существованию клеточных популяций *in vitro*. На этапе стабилизации каждая клеточная линия характеризуется выраженной в большей или меньшей степени частотой клеток с модальным числом хромосом, частотами клеток с другими числами хромосом, определенными пределами изменчивости по числу хромосом, определенным спектром перестроенных (маркерных) хромосом или структурным соответствием кариотипу донора. Клетки с любым выраженным числом хромосом имеют преобладающий струк-

турный вариант кариотипа (СВК — число гомологичных хромосом каждого морфологического типа), который в клетках с модальным числом хромосом называется основным, а также дополнительные СВК. Установлено, что для выживания клеточной популяции *in vitro* необходимо существование в ней в определенном соотношении клеток с разными СВК, обусловленное определенными закономерностями. Эти закономерности свидетельствуют о том, что отбор в клеточных популяциях идет не по отдельным хромосомам, а по сбалансированному кариотипу (Полянская, 2000).

Клеточные популяции *in vitro*, лишившись организменного контроля, являются автономными динамичными системами и в значительной степени подвержены влиянию внешних факторов, которые способствуют усилению кариотипической изменчивости. Показано, что эти факторы, как правило присутствующие при длительном культивировании постоянных клеточных линий, а также влияющие на жизнедеятельность клеток в культуре, существенно влияют на структурную и количественную кариотипическую изменчивость разных клеточных линий. В результате могут образовываться новые устойчивые популяции (сублинии), адаптированные к измененным условиям существования клеточной популяции. Первопричиной всех наблюдаемых кариотипических изменений, несомненно, являются различные изменения в клеточном метаболизме, обусловленные нарушениями в проведении сигналов с поверхности клеток на ядро под влиянием измененных внешних условий. Поэтому представляется существенным связать свойства клеточной поверхности с кариотипическими характеристиками клеток.

Есть немногочисленные данные, указывающие на то, что смена способа культивирования клеток (статистический, роллерный, суспензионный и монослойный) приводит к структурным и количественным изменениям кариотипа клеточной популяции (Nielsen, 1972; Семенова и др., 1984; Литвинчук и др., 1986; Царева и др., 1990). Возможно, что изменение характера клеточных взаимодействий при смене способа культивирования культуры влияет, в частности, на процессы, связанные с поддержанием кариотипической структуры. Перспективным подходом к выяснению возможных конкретных связей между рецепторами клеточной поверхности и кариотипическими изменениями является исследование влияния разных субстратов, на которых культивируются клетки, на кариотипическую изменчивость клеточных линий. Известно, что белки внеклеточного матрикса взаимодействуют с рецепторами, локализованными на поверхности клеточной мембраны, и оказывают существенное влияние на поведение клеток в культуре: на их движение, форму, полярность, пролиферацию и дифференцировку (Graf et al., 1987; Ocalan et al., 1988; Basson et al., 1996; Blake et al., 1997; Арэ и др., 1999; Sottile et al., 2000; Xu et al., 2001; Mostafavi-Pour, 2003; Петухова и др., 2004; Amit et al., 2004).

Существенная роль белков внеклеточного матрикса в различных клеточных процессах *in vivo* и *in vitro*, а также изменения в кариотипической структуре при смене способа культивирования позволили нам предположить, что характер взаимодействия клеток с тем субстратом, на котором они культивируются, может отражаться и на кариотипической структуре клеточной популяции. В предыдущих исследованиях нами было выявлено существенное влияние иммобилизованного ламинина 2/4 на количественную и структурную кариотипическую из-

менчивость в постоянных клеточных линиях фибробластов кожи индийского мунтжака и почки кенгуровой крысы (Полянская и др., 2002, 2003а, 2003б).

Белки внеклеточного матрикса различаются по своим свойствам и по тому действию, которое они оказывают на клетки. Например, взаимодействие ламинина и фибронектина с клеткой происходит через поверхностные рецепторы, среди которых помимо общих имеются и свои собственные, специфические. Так, ламинин связывается через рецепторы  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  и  $\alpha 6\beta 4$ , а фибронектин — через рецепторы  $\alpha 4\beta 1$  и  $\alpha 5\beta 1$ . Показано, что характер организации цитоскелета клеток, распластанных на разных субстратах, различен (Are et al., 2001; Петухова и др., 2004). В частности, основная часть клеточной популяции эпидермоидной карциномы A431, распластанной на фибронектине, характеризуется наличием стресс-фибрилл, а распластанной на ламинине 2/4 имеет полярную морфологию. Ламинин и фибронектин могут оказывать разное влияние на дифференцировку клеток. Так, эмбриональные стволовые клетки человека, культивирующиеся на ламининовом субстрате, сохраняют статус недифференцированных клеток в значительно большей степени, чем при культивировании на фибронектиновом субстрате (Xu et al., 2001). Учитывая также тот факт, что клетки разного происхождения (эпителиоподобные или фибробластоподобные) могут секретировать преимущественно разные белки внеклеточного матрикса (Домнина, Любимов, 1988), представляется существенным провести сравнительный анализ влияния разных субстратов на кариотипическую изменчивость. Ранее мы показали, что культивирование на ламинине фибробластов кожи индийского мунтжака — клеток, преимущественно секретирующих фибронектин, — изменяет количественные кариотипические характеристики, но не приводит к структурным изменениям в кариотипе. Напротив, культивирование на этом же субстрате клеток почки кенгуровой крысы — клеток эпителиального происхождения — приводит как к количественным, так и структурным кариотипическим изменениям (Полянская и др., 2002, 2003а, 2003б).

В настоящей работе исследована количественная и структурная кариотипическая изменчивость в клеточной сублинии фибробластов кожи индийского мунтжака при культивировании в течение 8 сут на поверхности, покрытой фибронектином.

## Материал и методика

Клеточная сублиния фибробластов кожи индийского мунтжака получена из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Собственная аббревиатура этой линии — МТ. Клетки культивировали в среде F10 с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. Модальное число хромосом равно 9. Кариотип сублинии МТ отличается от кариотипа донора числом гомологичных хромосом и не имеет маркерных хромосом.

Для анализа влияния белка внеклеточного матрикса — фибронектина (Sigma, США) — на кариотипическую изменчивость в течение 2, 4 и 8 сут клетки снимали с гидрофильной поверхности пластиковых чашек Петри смесью трипсина и версена (1 : 3), центрифугировали и рассеивали на покрытую фибронектином гидрофобную поверхность чашек Петри в бессывороточную среду на

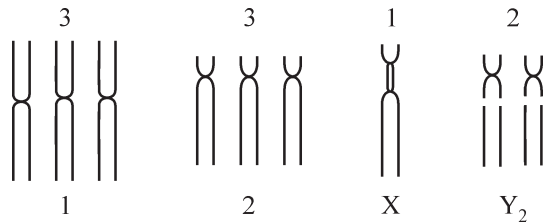


Рис. 1. Основной структурный вариант кариотипа (СВК) клеток сублинии МТ: 3 + 3 + 1 + 2.

Арабские цифры (нижние) — номера хромосом; латинские буквы — номенклатура половых хромосом; арабские цифры (верхние) — число гомологичных хромосом одного морфологического типа, составляющих СВК.

2.5 ч для специфического связывания рецепторов клеточной поверхности с фибронектином. Фибронектин использовали в концентрации 20 мкг/мл. Затем удаляли не прикрепившиеся к поверхности клетки вместе с бессывороточной средой и добавляли среду с сывороткой, в которой продолжали культивировать клетки (вариант — ФН). Параллельно с опытным вариантом анализировали следующие контрольные варианты: клетки, культивировавшиеся на гидрофильной поверхности (используемой для рутинного культивирования клеток), проинкубированные в бессывороточной среде в течение 2.5 ч с последующим культивированием в среде с сывороткой ( $K_2$ ); клетки, постоянно культивировавшиеся на гидрофильной поверхности ( $K_{общ.}$ ); клетки, культивировавшиеся на гидрофобной поверхности (отличающейся от гидрофильной поверхности отсутствием заряда), проинкубированные в бессывороточной среде в течение 2.5 ч с последующим культивированием в среде с сывороткой ( $K_1$ ). Были также проанализированы клетки, культивировавшиеся на фибронектиновом субстрате в течение 3 сут с последующим культивированием в течение 5 сут на гидрофильной поверхности (ФНК); клетки, культивировавшиеся на фибронектиновом субстрате в течение 7 сут с последующим культивированием в течение 1 сут на гидрофильной поверхности (ФНК1).

Для получения препаратов метафазных хромосом за 4 ч до фиксации клеток в культуру вводили колцемид (0.1 мкг/мл), снимали клетки с субстрата смесью трипси-на и версена (1 : 3), проводили их гипотоническую обработку смесью 0.075 М раствора KCl и 1%-ного раствора цитрата натрия (1 : 1) и фиксировали метанолом с ледяной уксусной кислотой (3 : 1). Хромосомы окрашивали водным раствором красителя Гимза (1 : 50). В каждом варианте было проанализировано не менее 100 метафазных пластинок.

Анализировали распределение клеток по числу хромосом. При изложении результатов приводятся формулы структурных вариантов кариотипа — СВК (рис. 1), в которых указано число гомологичных хромосом каждого морфологического типа (Полянская, 1988).

Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием *t*-критерия Стьюдента и критерия  $\chi^2$ . Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы  $P < 0.01$ .

## Результаты и обсуждение

Культивирование клеток сублинии МТ на фибронектиновом субстрате в течение 1 и 2 сут не приводит к изменению распределения клеток по числу хромосом по

сравнению с контрольным вариантом ( $K_{общ.}$ ). Оценка по критерию  $\chi^2$  показала, что вероятность нулевой гипотезы  $P > 0.05$ . Частота встречаемости клеток с модальным числом хромосом, равным 9, в опытных и контрольных вариантах одинакова ( $70.0 \pm 4.6$ ,  $69.0 \pm 4.2$ ,  $71.7 \pm 4.5$  и  $67.0 \pm 4.1$  % соответственно). Анализ распределения индивидуальных хромосом показал, что большинство клеток с модальным числом хромосом в опытных и контрольных вариантах имеет основной СВК 3 + 3 + 1 + 2, встречающийся с одинаковой частотой около 97 %.

Результаты по исследованию влияния фибронектинового субстрата на распределение клеток по числу хромосом в клеточной сублинии МТ при культивировании в течение 3, 4 и 8 сут представлены на рис. 2. Показано, что в контрольных вариантах (рис. 2, б1, в1, в2, б3, в3) распределения клеток по числу хромосом совпадают и не отличаются от наблюдаемых при культивировании в течение первых 2 сут. Оценка по критерию  $\chi^2$  показала, что вероятность нулевой гипотезы  $P > 0.05$ . Анализ распределения индивидуальных хромосом показал, что большинство клеток с модальным числом хромосом также сохраняет основной СВК 3 + 3 + 1 + 2, встречающийся с высокой частотой. При культивировании клеток в течение 3, 4 и 8 сут на субстрате, покрытом фибронектином, характер распределения клеток по числу хромосом существенно меняется. Так, при культивировании клеток на фибронектине в течение 3 сут имеет место достоверное изменение распределения клеток по числу хромосом по сравнению с соответствующими вариантами контроля —  $K_2$  и  $K_{общ.}$  ( $\chi^2 = 41.4$  и  $19.3$  соответственно;  $P < 0.01$ ) (рис. 2, а1, б1, в1). Изменение распределения клеток по числу хромосом произошло за счет достоверного снижения частоты клеток с модальным числом хромосом. Так, при сравнении вариантов ФН и  $K_2$  видно, что в опытном варианте достоверно снижается частота клеток с 9 хромосомами ( $51.0 \pm 2.9$  и  $68.0 \pm 3.0$  % соответственно;  $P < 0.01$ ). При сравнении вариантов ФН и  $K_{общ.}$  также достоверно уменьшается частота клеток с 9 хромосомами ( $51.0 \pm 2.9$  и  $75.6 \pm 3.2$  % соответственно;  $P < 0.01$ ). Анализ распределения индивидуальных хромосом показал, что частота встречаемости клеток модального класса с основным СВК 3 + 3 + 1 + 2 одинакова в опытном (ФН) и контрольных ( $K_2$  и  $K_{общ.}$ ) вариантах и составляет  $99.2 \pm 0.5$ ,  $98.0 \pm 0.9$  и  $99.3 \pm 0.6$  % соответственно. Достоверное уменьшение частоты клеток с 9 хромосомами при сохранении высокой частоты встречаемости клеток с основным СВК 3 + 3 + 1 + 2 (около 98 %) наблюдается при культивировании клеток на фибронектине в течение 4 и 8 сут (рис. 2, а2, а3, в2, б3, в3). Так, частоты клеток с модальным числом хромосом в опытном и контрольных вариантах следующие. 4 сут: ФН и  $K_{общ.}$  —  $49.5 \pm 3.6$  и  $72.0 \pm 2.6$  % соответственно ( $P < 0.01$ ); 8 сут: ФН,  $K_2$  и  $K_{общ.}$  —  $56.0 \pm 3.0$ ,  $75.8 \pm 3.9$  и  $73.8 \pm 2.6$  % соответственно ( $P < 0.01$ ). Уменьшение частоты клеток с модальным числом хромосом при культивировании культуры на фибронектине в течение 3—8 сут всегда сопровождается достоверным увеличением частоты клеток с меньшими числами хромосом (3—7 по сравнению с контролями). Так, частоты клеток с 3—7 хромосомами следующие. 3 сут: ФН,  $K_2$  и  $K_{общ.}$  —  $37.2 \pm 2.8$ ,  $20.8 \pm 2.6$  и  $16.7 \pm 2.8$  % соответственно ( $P < 0.01$ ); 4 сут: ФН и  $K_{общ.}$  —  $30.5 \pm 3.3$  и  $20.0 \pm 2.3$  % соответственно ( $P < 0.01$ ); 8 сут: ФН,  $K_2$  и  $K_{общ.}$  —  $27.0 \pm 2.7$ ,  $10.8 \pm 2.8$  и  $16.2 \pm 2.2$  % соответственно ( $P < 0.01$ ). Причем увеличение частоты клеток с малыми числами хромосом происходит не за счет

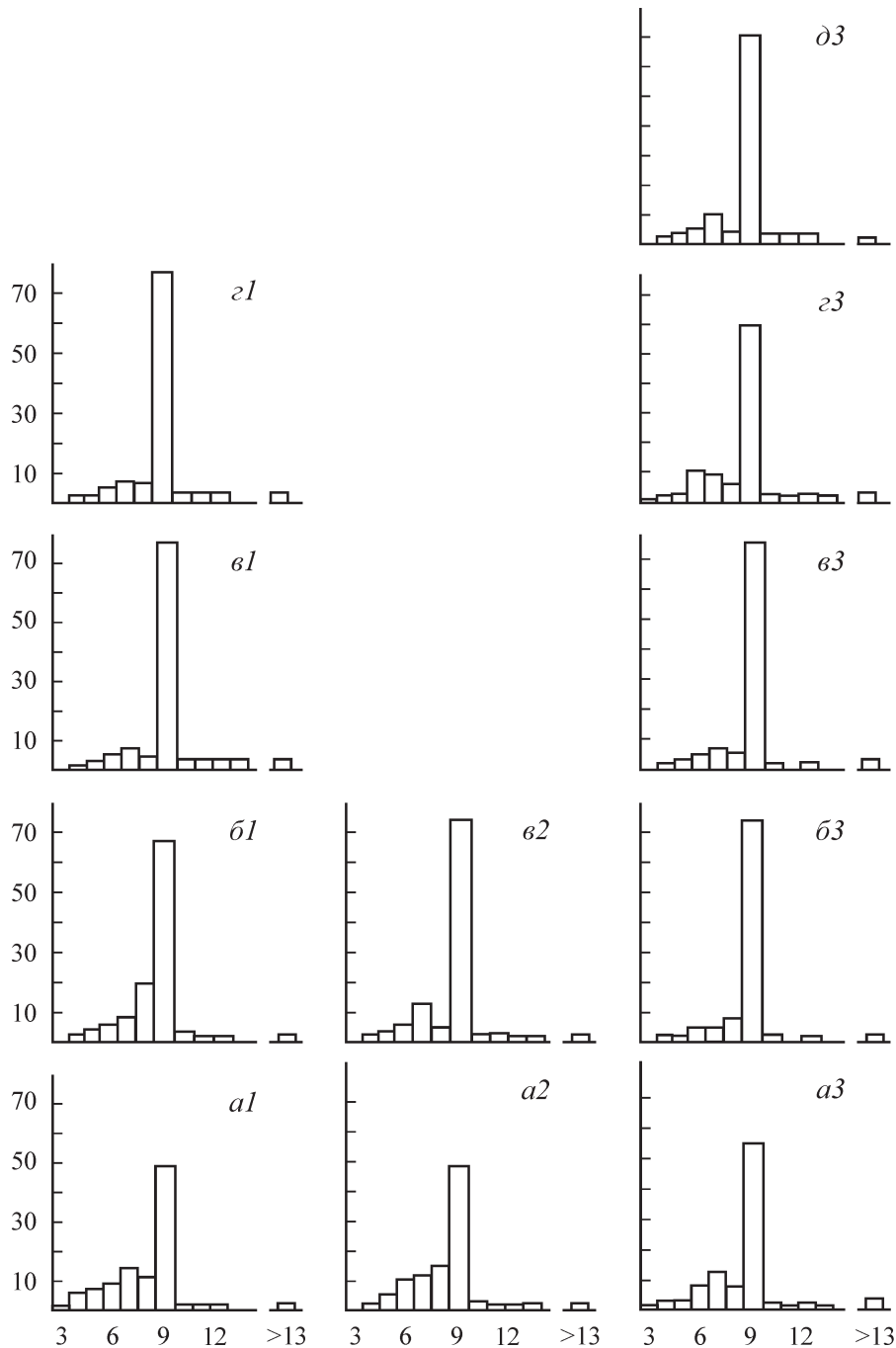


Рис. 2. Распределение клеток сублинии МТ по числу хромосом при культивировании на фибронектиновом субстрате.

По горизонтали — число хромосом в клетке; по вертикали — частота встречаемости клеток, %. 1 — культивирование клеток в течение 3 сут, 2 — культивирование клеток в течение 4 сут, 3 — культивирование клеток в течение 8 сут. а — клетки, культивировавшиеся на гидрофобной поверхности, покрытой фибронектином (ФН); б — клетки, культивировавшиеся на гидрофильной поверхности, проинкубированные в бессывороточной среде в течение 2.5 ч с последующим культивированием в среде с сывороткой ( $K_2$ ); в — клетки, постоянно культивировавшиеся на гидрофильной поверхности ( $K_{\text{общ}}$ ); z — клетки, культивировавшиеся на фибронектине 3 сут с последующим культивированием 5 сут на гидрофильной поверхности (ФНК); z' — клетки, культивировавшиеся на фибронектине 7 сут с последующим культивированием 1 сут на гидрофильной поверхности (ФНК1); d — клетки, культивировавшиеся на гидрофобной поверхности, проинкубированные в бессывороточной среде в течение 2.5 ч с последующим культивированием в среде с сывороткой ( $K_1$ ).

увеличения количества уже имеющихся СВК, а за счет появления новых дополнительных СВК. Так, в объединенном по всем срокам контроле ( $K_2 + K_{\text{общ}}$ ) при анализе 965 клеток обнаружено 35 разных СВК в клетках с 3—7 хромосомами, а в объединенном опытном варианте (ФН) при анализе 755 клеток — 63 СВК. Следовательно, имеет место увеличение кариотипической гетерогенности

при культивировании клеток на фибронектине. Частоты клеток с большими числами хромосом, включая полиплоиды, при культивировании культуры на фибронектине не изменяются по сравнению с соответствующими контролями. Культивирование клеток на гидрофобной поверхности ( $K_1$ ) в течение 8 сут не приводит к изменению распределения клеток по числу хромосом по срав-



нению с контролями  $K_2$  и  $K_{общ.}$  ( $\chi^2 = 7.6$  и  $3.9$  соответственно;  $P > 0.05$ ; рис. 2, д3). Частота клеток с модалным числом хромосом также соответствует контрольным вариантам и составляет  $70.0 \pm 3.9\%$ .

Существенно отметить, что снятие клеток с фибронектинового субстрата через 3 сут культивирования и дальнейшее культивирование на гидрофильной поверхности в течение 5 сут (вариант ФНК) приводят к восстановлению контрольного ( $K_2$  и  $K_{общ.}$ ) распределения клеток по числу хромосом ( $\chi^2 = 8.5$  и  $1.4$  соответственно;  $P > 0.05$ ). Частота клеток с модалным числом хромосом также соответствует контрольным вариантам и составляет  $76.0 \pm 3.7\%$  (рис. 2, з1). Частота клеток с числами хромосом 3—7 достоверно уменьшается ( $14.0 \pm 3.0\%$ ) до уровня контролей ( $K_2$  —  $20.8 \pm 2.6$  и  $K_{общ.}$  —  $16.7 \pm 2.8\%$ ). Напротив, снятие клеток с фибронектинового субстрата через 7 сут, т. е. через более длительный срок, и дальнейшее культивирование на гидрофильной поверхности в течение 1 сут (вариант ФНК1) не приводят к восстановлению контрольного распределения клеток по числу хромосом, а сохраняется распределение, свойственное варианту ФН ( $\chi^2 = 3.6$ ;  $P > 0.05$ ; рис. 2, а3, з'3). Частота клеток с числами хромосом 3—7 составляет  $26.8 \pm 2.4\%$ , что соответствует варианту ФН и существенно выше контролей, т. е. в этих условиях не наблюдается восстановления данного параметра. Полученные результаты, по-видимому, свидетельствуют о том, что при переводе клеток в стандартные условия культивирования (гидрофильная поверхность) должно пройти определенное время для восстановления количественных кариотипических характеристик, причем предшествующая длительность культивирования на фибронектине не играет решающей роли для скорости восстановления. Это подтверждают ранее полученные данные, свидетельствующие о том, что снятие клеток, культивирующихся на ламинине в течение 2 сут, не приводит к восстановлению этих характеристик при дальнейшем культивировании клеток на гидрофильной поверхности в течение последующих 2 сут (Полянская и др., 2002). По-видимому, необходимость длительного временного интервала для восстановления количественных характеристик при нарушениях метаболических процессов, способствующих анеуплоидии, — явление универсальное, не связанное с характером индуцирующего агента. Это предположение можно аргументировать тем, что ламинин и фибронектин имеют разные механизмы действия на клетку, связываясь с разными поверхностными рецепторами. Подобное явление имеет место при совершенно других условиях культивирования. Так, показано, что в деконтаминированных от микоплазм культурах при последующем культивировании на чистой среде также не происходит быстрого восстановления эуплоидии (Кузьмина, 1983; Полянская и др., 1994а).

Сравнительный анализ влияния фибронектинового и ламининового субстратов на количественные кариотипические характеристики клеточных линий фибробластов кожи индийского мунтжака указывает как на сходство, так и на различия между ними. Основное различие состоит в том, что первоначальная адгезия клеток сильнее при посеве их на фибронектин, практически все клетки прикрепляются и распластаются. При посеве клеток на ламинин имеется много клеток, которые не прикрепляются к поверхности, их удавалось собрать, посеять на гидрофильную поверхность и в дальнейшем проанализировать. Оказалось, что кариотипическая

структура неприкрепившихся клеток соответствует контрольным вариантам и существенно отличается от той, которую имеют клетки, культивирующиеся на ламинине. Это позволило нам предположить изначальную гетерогенность клеточной популяции по способности прикрепления и распластывания на субстратах (Полянская, 2002). Причина различий может состоять в том, что для фибробластов именно фибронектин является основным белком внеклеточного матрикса, который они секретируют. По-видимому, в связи с разным первоначальным поведением клеток при посеве на разные субстраты изменения количественной кариотипической структуры при культивировании на фибронектине наступают только через 3 сут после посева в отличие от ламинина, где различия имеют место уже через 1 сут, т. е. в 1-м митотическом цикле. Отсроченный анеуплоидный эффект, возможно, связан с возникновением избытка фибронектина из-за первоначального связывания рецепторов с искусственным фибронектиновым субстратом и невозможностью в дальнейшем им связаться с фибронектином, секретлируемым самими клетками. Фибронектин, по-видимому, может обладать не только специфическим, но и неспецифическим действием на клетки. Очевидно, основной причиной усиления анеуплоидии являются изменения клеточного метаболизма, обуславливающие нарушения сегрегации хромосом, способствующие образованию новых кариотипических вариантов, которые при длительном культивировании могут закрепиться как селективно выгодные. Полученные нами данные об отсутствии изменений распределения клеток по числу хромосом при культивировании эпителиоподобных клеток линии почки кенгуровой крысы NBL-3-17 на ламинине в течение 2 сут и появлении их через 4 сут косвенно свидетельствует в пользу наших предположений относительно причин кариотипических изменений (Полянская и др., 2003а). Эпителиоподобные клетки в основном секретрируют ламинин (Домнина, Любимов, 1988), поэтому клетки с нормальным кариотипом преимущественно прикрепляются к субстрату, а существенные различия происходят позже и связаны с нарушением метаболических процессов, связанных с сегрегацией хромосом. Есть ряд косвенных данных, в основном по исследованию функционального состояния микротрубочек, свидетельствующих о возможной связи между взаимодействием белков внеклеточного матрикса с рецепторами и стабильностью кариотипической структуры (Rosette, Karin, 1995; Crepieux et al., 1997; Waterman-Storer et al., 2000; Sablina et al., 2001). Тем не менее при длительном культивировании (несколько митотических циклов) имеет место сходство в характере количественных кариотипических изменений между клетками, культивируемыми на фибронектине и ламинине, выражающееся в изменении распределения клеток по числу хромосом за счет уменьшения частоты клеток с модалным числом хромосом и увеличения частоты клеток с меньшими числами хромосом при сопутствующем увеличении количества новых дополнительных СВК. По-видимому, такая перестройка кариотипа нужна для создания сбалансированной кариотипической структуры, обеспечивающей необходимый для существования клеточной популяции генный баланс.

Количественная и структурная кариотипические изменения взаимосвязаны, являясь составляющими одного процесса — адаптации клеточных популяций к условиям *in vitro*. Структурная изменчивость может спо-

**Влияние фибронектина на частоту хромосомных aberrаций в клеточной сублинии фибробластов кожи индийского мунтжака**

Вариант опыта	Длительность культивирования, сут	Число проанализированных клеток	Частота хромосомных aberrаций разного типа, %, $\bar{x} \pm s_x$				
			всех aberrаций	хромосомных разрывов	хроматидных разрывов	дицентриков без двойных фрагментов	aberrаций обменного типа
ФН	1	100	6.0 ± 2.4	2.0 ± 1.4	1.0 ± 1.0	3.0 ± 1.7	0.0 ± 1.0
К <sub>общ.</sub>		120	4.2 ± 1.8	1.7 ± 1.2	1.7 ± 1.2	0.0 ± 0.8	0.8 ± 0.8
ФН	2	120	2.5 ± 1.4	1.7 ± 1.2	0.0 ± 0.8	0.8 ± 0.8	0.0 ± 0.8
К <sub>общ.</sub>		130	1.5 ± 1.1	0.0 ± 0.8	0.0 ± 0.8	1.5 ± 1.1	0.0 ± 0.0
ФН	3	290	10.0 ± 1.8 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.8	1.4 ± 0.7	5.5 ± 1.3 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.7
К <sub>2</sub>		245	3.3 ± 1.1	1.6 ± 0.8	0.0 ± 0.4	0.8 ± 0.6	0.8 ± 0.6
К <sub>общ.</sub>		180	3.9 ± 1.4	2.2 ± 1.1	0.0 ± 0.5	1.1 ± 0.8	0.6 ± 0.6
ФНК		130	3.1 ± 1.5	0.8 ± 0.8	0.0 ± 0.8	2.5 ± 1.4	0.0 ± 0.8
ФН	4	190	15.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	5.3 ± 1.6	3.2 ± 1.3	6.3 ± 1.8 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.8
К <sub>общ.</sub>		310	2.8 ± 1.0	1.1 ± 0.6	0.0 ± 0.3	1.3 ± 0.6	0.3 ± 0.3
ФН	8	275	9.1 ± 1.7	4.0 ± 1.9	1.4 ± 0.7	3.6 ± 1.1	0.0 ± 0.4
К <sub>2</sub>		120	5.8 ± 2.1	3.8 ± 1.7	0.0 ± 0.8	2.1 ± 1.3	0.0 ± 0.8
К <sub>1</sub>		135	3.7 ± 1.6	2.2 ± 1.3	0.0 ± 0.7	0.7 ± 0.7	0.7 ± 0.7
К <sub>общ.</sub>		290	4.0 ± 1.2	1.7 ± 0.8	0.7 ± 0.5	1.0 ± 0.6	0.7 ± 0.5
ФНК1		345	5.6 ± 1.2	3.8 ± 1.0	0.3 ± 0.3	1.2 ± 0.6	0.3 ± 0.3

Примечание. <sup>a</sup> Достоверно отличается от значений в контролях ( $P < 0.01$ ). ФН — клетки, культивировавшиеся на гидрофобной поверхности, покрытой фибронектином; К<sub>2</sub> — клетки, культивировавшиеся на гидрофильной поверхности, проинкубированные в бессывороточной среде в течение 2.5 ч с последующим культивированием в среде с сывороткой; К<sub>общ.</sub> — клетки постоянно культивировавшиеся на гидрофильной поверхности; К<sub>1</sub> — клетки, культивировавшиеся на гидрофобной поверхности, проинкубированные в бессывороточной среде в течение 2.5 ч с последующим культивированием в среде с сывороткой; ФНК — клетки, культивировавшиеся на фибронектине 3 сут с последующим культивированием в течение 5 сут на гидрофильной поверхности; ФНК1 — клетки, культивировавшиеся на фибронектине 7 сут с последующим культивированием в течение 1 сут на гидрофильной поверхности.

способствовать усилению количественной кариотипической гетерогенности клеточной популяции. Наряду с изучением количественной изменчивости был проведен анализ структурной кариотипической изменчивости при культивировании клеток сублинии МТ на фибронектиновом субстрате в течение 8 сут.

Результаты по исследованию влияния фибронектинового субстрата на структурную кариотипическую изменчивость в клеточной сублинии МТ представлены в таблице. Из этих результатов следует, что культивирование клеток на фибронектине в течение 1 и 2 сут не приводит к изменению частоты хромосомных aberrаций по сравнению с контролем. При удлинении срока культивирования до 3 и 4 сут наблюдается достоверное увеличение частоты хромосомных aberrаций по сравнению с соответствующими контролями. Увеличение количества хромосомных aberrаций происходит в основном за счет достоверного увеличения частоты дицентриков (теломерных ассоциаций). Продолжение культивирования клеток до 8 сут приводит к снижению уровня хромосомных aberrаций. Существенно отметить, что частота дицентриков также достоверно не отличается от соответствующих контролей. Культивирование клеток в течение 8 сут на гидрофобном субстрате не изменило контрольного уровня хромосомных aberrаций. Снятие клеток с фибронектинового субстрата через 7 сут и дальнейшее культивирование на гидрофильной поверхности в течение 1 сут и снятие клеток с фибронектина через 3 сут

культивирования и дальнейшее культивирование на гидрофильной поверхности в течение 5 сут восстанавливают частоту хромосомных aberrаций, характерную для контрольных вариантов. Показано, что разные хромосомы с разной вероятностью участвуют в образовании дицентриков. Из 25 проанализированных дицентриков в клетках сублинии МТ, культивировавшихся на фибронектине в течение 3 и 4 сут, хромосома 1 обнаружена в 80 % случаев, хромосома 2 — в 48, хромосомы X и Y<sub>2</sub> — в 24 и 20 % соответственно, хромосома Y<sub>1</sub> — в 0 % случаев. Наблюдаемое преимущественное участие хромосом 1 и 2 в образовании дицентриков при культивировании клеток на фибронектине совпадает с отмеченным при других воздействиях (Полянская, 2000).

Ранее было показано, что дицентрики, образованные на основе теломерных ассоциаций, являются характерной чертой кариотипической изменчивости «безмаркерных» клеточных линий при культивировании в разных условиях. Было выдвинуто предположение о том, что они обеспечивают систему адаптации клеточной популяции как автономного образования к условиям существования *in vitro* (Poljanskaya, Vakhtin, 2003). Полученные в настоящей работе данные подтверждают это положение. Одна из характерных черт дицентриков — отсутствие постоянной взаимосвязи с другими типами хромосомных нарушений и наличие определенной количественной динамики. Наши результаты явились еще одним примером, дополняющим и полностью подтверждающим

щим наличие этого свойства у дицентриков, а именно частота других типов хромосомных aberrаций достоверно не увеличена, достоверно увеличена только частота дицентриков, которая к 8 сут культивирования клеток на фибронектине снижается до контрольного уровня.

Совершенно очевидно, что культивирование клеток на фибронектине является нарушением привычных для клеток условий, и клеточная популяция реагирует на это неспецифическим образом, как и на многие другие непривычные факторы. Таким образом, культивирование на фибронектиновом субстрате клеток, в норме адаптированных к культивированию на гидрофильной поверхности, вызывает необходимость приспособляться клеткам к новому субстрату разными способами — изменением количественных кариотипических характеристик и образованием дицентриков. Подобное явление мы наблюдали при культивировании эпителиоподобных клеток почки кенгуровой крысы. Но в этом случае не наблюдали восстановления частоты хромосомных aberrаций до нормы даже через 12 сут. Мы объяснили это следующим образом. Эпителиоподобные клетки в основном секретируют ламинин (Домнина, Любимов, 1988). В связи с этим при посеве клеток на искусственный ламининовый субстрат специфические клеточные рецепторы связываются с ламинином, а секретируемый самими клетками ламинин не имеет возможности связаться со своими рецепторами, и, таким образом, могут возникнуть изменения в клеточном метаболизме, индуцирующие в конечном счете структурную нестабильность хромосом. В настоящем исследовании применительно к фибробластам, секретирующим фибронектин, это объяснение может быть правдоподобным. Восстановление же контрольного уровня хромосомных aberrаций за счет нормализации частоты дицентриков, возможно, связано с тем, что в эмбриональной сыворотке, которая входит в состав ростовой среды, ламинин отсутствует, но присутствует фибронектин. Поэтому клетки почки кенгуровой крысы чувствительнее к избытку ламинина, чем фибробласты, которые, исходя из условий культивирования, более привычны к колебаниям количества фибронектина. Еще одним косвенным свидетельством в пользу предположения о том, что избыток белка внеклеточного матрикса, преимущественно секретируемого клетками, может вызвать на определенном этапе увеличение частоты хромосомных aberrаций, являются данные, полученные при культивировании фибробластов кожи индийского мунтжака на ламинине (Полянская и др., 2002). Было показано, что ламинин, используемый в качестве субстрата, не вызывает изменения частоты хромосомных aberrаций по сравнению с контролями независимо от структуры кариотипа (линия М с модальным числом 7 или кариотипический вариант М' с модальным числом хромосом 9, подобно сублинии МТ).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-48251) и частичной финансовой поддержке Комплексной программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### Список литературы

Арз А. Ф., Поспелова Т. В., Пинаев Г. П. 1999. Особенности структурной организации актинового цитоскелета нормальных, иммортализованных и трансформированных фибро-

бластов крысы и ее изменения под влиянием белков внеклеточного матрикса. Цитология. 41 (8) : 707—715.

Домнина Л. В., Любимов А. В. 1988. Выделение и характеристика внеклеточного матрикса культивируемых клеток. Цитология. 30 (3) : 299—303.

Захаров А. Ф., Какпакова Е. С., Егорова Н. А. 1966. Взаимоотношение числовой и структурной изменчивости кариотипа в культивируемых клетках китайского хомячка. Цитология. 8 (2) : 193—201.

Кузьмина С. В. 1983. Малигнизация нормальных клеток в условиях длительного культивирования *in vitro*. М.: Наука. 228 с.

Литвинчук Л. Ф., Мамаева С. Е., Ковтунович И. Г., Пинаев Г. П. 1986. Кариотип постоянных клеточных линий. Изменчивость кариотипа М-Нела при статическом и роллерном способах культивирования. Цитология. 28 (1) : 56—61.

Мамаева С. Е. 1996. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология. 38 (8) : 787—814.

Мамаева С. Е., Литвинчук Л. Ф., Пинаев Г. П. 1986. Характеристика кариотипа постоянных клеточных линий. II. Изменчивость и сбалансированность хромосомного набора клеток М-Нела. Цитология. 28 (2) : 193—203.

Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачева И. В., Пинаев Г. П. 2004. Анализ морфологических особенностей популяции клеток эпидермоидной карциномы А431, распластанных на иммобилизованных лигандах. Цитология. 46 (1) : 5—15.

Полянская Г. Г. 1988. Кариотипическая характеристика клеточных сублиний почки кенгуровой крысы и фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 30 (6) : 732—738.

Полянская Г. Г. 2000. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях. Успехи соврем. биол. 120 (6) : 529—539.

Полянская Г. Г., Абрамян Д. С., Глебов О. К. 1981. Кариотипическая структура клоновых популяций клеток китайского хомячка при длительном культивировании. Цитология. 23 (7) : 818—830.

Полянская Г. Г., Горячая Т. С., Михайлова Н. А., Пинаев Г. П. 2003а. Влияние ламинина на количественную кариотипическую изменчивость в клеточных линиях почки кенгуровой крысы. Цитология. 45 (10) : 1038—1047.

Полянская Г. Г., Горячая Т. С., Пинаев Г. П. 2002. Влияние ламинина на кариотипическую изменчивость в клеточной линии фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 44 (5) : 491—498.

Полянская Г. Г., Горячая Т. С., Пинаев Г. П. 2003б. Влияние ламинина на структурную кариотипическую изменчивость в клеточных линиях почки кенгуровой крысы. Цитология. 45 (10) : 1048—1053.

Полянская Г. Г., Ефремова Т. Н. 1994. Влияние контаминации микоплазмой культуры фибробластов кожи индийского мунтжака и последующей деконтаминации культур с помощью ципрофлоксацина на кариотипическую структуру клеточной линии. Цитология. 36 (4) : 393—400.

Полянская Г. Г., Сизова Л. С., Ефремова Т. Н., Фридлянская И. И. 1994. Цитогенетическое исследование линии клеток легкого китайского хомячка V79, инфицированной микоплазмой *Mycoplasma arginini* и деконтаминированной с помощью ципрофлоксацина. Цитология. 36 (8) : 880—887.

Семенова Е. Г., Хоменко А. В., Мамаева С. Е. 1984. Изменение продолжительности клеточного цикла и кариотипа клеток L мыши при смене способа культивирования. Цитология. 26 (10) : 1156—1160.

Филатов М. В., Котлованова С. И., Степанов С. И., Третьяков А. Н., Стрельцов П. Г., Дробченко Е. А. 1988. Воспроизводимая нестабильность хромосом постоянной линии клеточек китайского хомячка, выявляемая с помощью проточной цитометрии. Цитология. 30 (8) : 999—1007.

Царева А. А., Исаенко А. А., Урманова М. А., Юрченко М. Д., Балзовская Е. Г., Родионова М. О. 1990. Исследование кариотипа клеток линии Vero, длительно культивируемых в монослое статическим и роллерным способами. Цитология. 32 (7) : 741—747.



- Amit M., Shariki C., Margulets V., Itskovitz-Eldor J. 2004. Feeder and serum free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 70 : 837—845.
- Are A., Pinaev G., Burova E., Lindberg U. 2001. Attachment of A431 cells on immobilized antibodies to the EgF receptor promotes cell spreading and reorganization of the microfilament system. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 48 : 24—36.
- Basson M. D., Turowski G., Emenaker N. J. 1996. Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. *Exp. Cell Res.* 225 : 301—305.
- Blake D. A., Yu H., Young D. L., Cardwell D. R. 1997. Matrix stimulates the proliferation of human corneal endothelial cells in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38 : 1119—1129.
- Crepieux P., Kwon H., Leclerc N., Spencer W., Richard S., Lin R., Hiscott J. 1997. I $\kappa$ B $\alpha$  physically interacts with a cytoskeleton-associated protein through its signal response domain. *Mol. Cell. Biol.* 17 : 7375—7385.
- Graf J., Ogle R. C., Robey F. A., Sasaki M., Martin G. R., Yamada Y., Kleinman H. K. 1987. A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67,000 laminin receptor. *Biochemistry.* 26 : 6896—6900.
- Mostafavi-Pour Z., Askari J. A., Parkinson S. J., Parker P. J., Ng T. T. C., Humphries M. J. 2003. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J. Cell Biol.* 161 : 155—167.
- Nielsen K. 1972. The chromosomes of an *in vitro* derivative of an Ehrlich ascites tumor of the mouse during its adaptation from monolayer to suspension culture. *Hereditas.* 70 : 217—224.
- Ocalan M., Goodman S. L., Kuhl U., Hauschka S. D., von der Mark K. 1988. Laminin alters cell shape and stimulates motility and proliferation of murine skeletal myoblasts. *Develop. Biol. Jap.* 125 : 158—167.
- Poljanskaya G. G., Vakhtin Y. B. 2003. The karyotypic structure of cell populations *in vitro* as integral system. *Цитология.* 45 (2) : 115—131.
- Rosette C., Karin M. 1995. Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF- $\kappa$ B. *J. Cell Biol.* 128 : 1111—1119.
- Sablina A. A., Chumakov P. M., Levine A. J., Kopnin B. P. 2001. p53 activation in response to microtubule disruption is mediated by integrin-Erk signaling. *Oncogene.* 20 : 899—909.
- Sottile J., Hocking D. C., Langenbach K. J. 2000. Fibronectin polymerization stimulates cell growth by RGD-dependent and -independent mechanisms. *J. Cell Sci.* 113 : 4287—4299.
- Waterman-Storer C. M., Salmon W. C., Salmon E. D. 2000. Feedback interactions between cell-cell adherens junctions and cytoskeletal dynamics in newt lung epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 2471—2483.
- Xu C., Inokuma M. S., Denham J., Golds K., Kundu P., Gold J. D., Carpenter M. K. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology.* 19 : 971—974.
- Zakharov A. F., Kakpakova E. S., Egolina N. A., Pogosi-anz H. E. 1964. Chromosomal variability in clonal populations of a Chinese hamster cell strain. *J. Nat. Cancer Inst.* 33 : 935—956.

Поступила 1 II 2005

#### THE INFLUENCE OF IMMOBILIZED FIBRONECTIN ON KARYOTYPIC VARIABILITY OF THE INDIAN MUNTJAC SKIN FIBROBLAST CELL SUBLINE

G. G. Poljanskaya, T. S. Goryachaya, G. P. Pinaev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru

The numerical and structural karyotypic variability has been investigated in the Indian muntjac skin fibroblast cell subline MT on cultivating cells on the fibronectin-coated surface. In cell subline MT, cultivated on the fibronectin-coated surface for 1 and 2 days, the character of cell distribution for the chromosome number did not change. In 3, 4 and 8 days, the character of cell distribution for the chromosome number changed. These changes involve a significant decrease in frequency of cells with modal numbers of chromosomes, and an increase in frequency of cells with lower chromosome numbers. Many new additional structural variants of the karyotype (SVK) appear. The observed alterations seem to be due to both disturbances of mitotic apparatus and selection of SVK, which are more advantageous to changed culture conditions of the cell population. Detachment of cells from the fibronectin-coated surface, followed by a 1 day cultivation on a hydrophilic surface, commonly used for routine cell cultivation, does not restore the control cell distribution for the chromosome number, but cultivation in these conditions for 5 days restore control distribution. The frequency of chromosomal aberrations on cultivation on the fibronectin-coated surface for 3 and 4 days significantly increases, mainly at the expense of dicentrics (telomeric association). On prolongating the time of cultivation up to 8 days on the fibronectin-coated surface the frequency of chromosomal aberrations approaches the control value. Structural instability of chromosomes at cultivation on the fibronectin-coated surface demonstrates nonspecific reaction of «markerless» cell lines to unfavourable factors of the environment. We discuss possible reasons of differences in the character of karyotypic variability in cell lines of the Indian muntjac skin fibroblasts on cultivating on laminin and fibronectin.