

МИКРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ГЕНОМНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ФИБРОБЛАСТОВ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА CHL V-79 RJK С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

© Т. М. Гринчук,¹ И. Э. Ушал, И. В. Арцыбашева, М. А. Павленко, Б. Н. Кудрявцев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: gmdmk@mail.cytspb.rssi.ru

Сравнивали результаты кариотипирования и микрофлуориметрического определения содержания ДНК в хромосомах клеток CHL V-79 RJK, отобраных на устойчивость к бромистому этидию (БЭ), вызывающему множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) (линия Vebr-5). Анализ проводили на 11-м и 88-м пассажах. Изучение структуры кариотипа Vebr-5 выявило наличие дополнительного генетического материала (ДГМ) в виде гомогенно или дифференциально окрашенных областей (ГОО и ДОО) в двух хромосомах (Z1 и Z6, локусы 1p29-31 и 1q26 соответственно). ДОО (ГОО) в Z6 по месту локализации гена *mdr* дикого типа имели нестабильные длину и структуру, что характерно для морфологических маркеров амплификации генов семейства *mdr*. При продолжительном культивировании Vebr-5 в присутствии БЭ (88 пассажей) нестабильность ГОО (ДОО) в Z6 возрастала. Результаты микрофлуориметрического анализа Vebr-5 на 11-м пассаже показали достоверное увеличение содержания ДНК не только в хромосомах Z1 и Z6, маркированных ГОО (ДОО), но и еще в трех хромосомах (Z5, Z12 и Z13), не имеющих визуальных морфологических изменений. Соответствующий анализ на 88-м пассаже выявил неслучайные изменения содержания ДНК еще в четырех хромосомах: увеличение — в Z14, уменьшение — в хромосомах 8, Z7 и Z9. Уменьшение содержания ДНК в хромосомах рассматривается в связи с делетированием генетического материала, увеличение — как результат транслокации и (или) амплификации. Коэффициент вариации изменения содержания ДНК для крупных хромосом составил около 9, а для мелких — около 26%. Это свидетельствует о том, что мелкие хромосомы обладают большими потенциальными возможностями к нестабильности, чем крупные. Полученные данные не только подтверждают, но и расширяют представление о направленности и характере дестабилизации генетического аппарата клеток, вставших на путь неопластической трансформации в связи с приобретением ими МЛУ.

Ключевые слова: дестабилизация кариотипа, дополнительный генетический материал, микрофлуориметрия, множественная лекарственная устойчивость, содержание ДНК в хромосомах.

Принятые сокращения: БЭ — бромистый этидий, ГОО — гомогенно окрашенная область, ДГМ — дополнительный генетический материал, ДМ — двойные мини-хромосомы, ДОО — дифференциально окрашенная область, МЛУ — множественная лекарственная устойчивость.

Известно, что кариотипическая нестабильность трансформированных клеток обусловлена, с одной стороны, нарушениями процессов митотического контроля, с другой — изменениями в функционировании отдельных генов. Отклонения от стандартного кариотипа при этом могут быть связаны с изменением как числа хромосом, так и их структуры, что обусловлено, с одной стороны, внутри- и межхромосомными перестройками, а с другой — амплификацией генов. Одной из модельных систем, где подобного рода нарушения хорошо прослеживаются, являются клетки млекопитающих в системе *in vitro*, претерпевшие селекцию на устойчивость к агентам, вызывающим множественную лекарственную устойчивость (МЛУ). Показано, что приобретение клетками млекопитающих типичной МЛУ сопряжено с повышенной экспрессией трансмембранного гликопротеина, обусловленной амплификацией кодирующих их генов семейства *mdr*: у китайского хомячка это гены *pgp1* и *pgp2* (Devault, Gross, 1990). Амплификация этих генов нередко сопровождается появлением в кариотипе специфических новообразова-

ний (ДОО, ГОО и ДМ), трактуемых как морфологические маркеры амплификации генов *mdr* (Гринчук и др., 1984, 1986а, 1986б, 1998; Kornin et al., 1985; Teeter et al., 1986; Bradley et al., 1988, и др.).

Исследования, проведенные нами на фибробластах китайского хомячка (линия CHL V-79 RJK) с МЛУ, возникшей в результате их селекции на устойчивость к БЭ, также показали присутствие ГОО и ДОО (локусы 1p29-31, 1q26, хромосомы Z1 и Z6 соответственно) в кариотипе резистентных клеток (Гринчук и др., 1988). Увеличение концентрации селективного агента, равно как длительное культивирование клеток при низкой его концентрации, приводило к разнонаправленной дестабилизации структуры кариотипа — экстракопированию отдельных хромосом набора, появлению структурно перестроенных хромосом и хромосом с дополнительными ДОО и ГОО (Гринчук и др., 2006).

Использование количественного цитохимического метода, основанного на предварительной идентификации G-бандированных хромосом кариотипического набора с

последующим микрофлуориметрическим определением в них содержания ДНК, выявило достоверное увеличение содержания ДНК в хромосомах-носителях ГОО и ДОО (Гринчук и др., 1986в).

В настоящее время в Лаборатории клеточной патологии Института цитологии РАН разработан модифицированный микрофлуориметрический метод, позволяющий регистрировать небольшие (5 %) изменения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах кариотипического набора. В основу данной работы положено использование этого метода для изучения прогрессирующей дестабилизации генома клеток млекопитающих с МЛУ.

Конкретной задачей было получение и сопоставление данных кариологического и микрофлуориметрического методов при изучении динамики геномных изменений в клетках китайского хомячка линии CHL V-79 RJK в связи с их продолжительным культивированием в присутствии агента (БЭ), вызывающего МЛУ.

Материал и методика

Культуры клеток. Использовали фибробласты китайского хомячка линии CHL V-79 RJK (д-р Ф. Раддл, Йельский университет, США) и клетки ее сублинии Vebг-5, устойчивые к БЭ в концентрации 5 мкг/мл (2-я степень селекции), сохраняющие резистентность к БЭ при длительном культивировании в среде без селективного агента и характеризующиеся фенотипом МЛУ (Гринчук и др., 1988). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % фетальной сыворотки в присутствии гентамицина (100 мкг/мл) в атмосфере 5—7 % CO₂ при 37 °С.

Приготовление препаратов метафазных хромосом проводили по обычной схеме (Гринчук и др., 1988). Накопление клеток в стадии митоза достигали путем введения в активно растущую культуру колхицина в конечной концентрации 3.6 мкг/мл. При гипотонической обработке использовали 0.56%-ный KCl, фиксировали клетки смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Препараты метафазных хромосом высушивали на воздухе.

Окрашивание на G-диски проводили по модифицированному методу Сибрайт (Seabright, 1971). Для изучения детальной структуры препараты метафазных хромосом окрашивали 2%-ным раствором красителя Гимза (Sigma, США) в фосфатном буфере, pH 6.8, в течение 5—7 мин после предварительной обработки 0.25%-ным раствором трипсина. Метафазные пластинки с хорошим разбросом хромосом фотографировали с использованием иммерсионного объектива 100× (Carl Zeiss, Jena, Германия) и анализировали по микрофотографиям. Нормальные хромосомы китайского хомячка идентифицировали в соответствии со стандартной номенклатурой (Ray, Mohandas, 1975).

Q-окрашивание флуоресцентным красителем Hoechst 33258. Препараты метафазных хромосом инкубировали 10 мин в насыщенном солевом буфере Дальбекко, pH 7.2, затем окрашивали 25 мин в растворе красителя Hoechst 33258 (0.5 мкг/мл в том же буфере) и повторно инкубировали в свежей порции буферного раствора в течение 10 мин. На высушенные препараты и под покровные стекла наносили 2—3 капли раствора актиномицина D (0.2—0.3 мкг/мл в буфере, содержащем 1 мМ Na₂HPO₄ и 1 мМ ЭДТА) и выдерживали 15 мин в темноте при комнатной температуре. Затем препараты отмывали

водой, высушивали и заключали в смесь цитратно-фосфатного буферного раствора Мак-Ильвейна, pH 4.2, и глицерина (1 : 1) (Карпищенко, 1999). При анализе использовали люминесцентный микроскоп ЕС Люмам РПО-11 (ЛОМО, Санкт-Петербург), снабженный CCD-камерой и объективом 100×1.35. Спектральную область возбуждения люминесценции ($\lambda = 360\text{—}390$ нм) и испускания ($\lambda = 450\text{—}480$ нм) выделяли с помощью соответствующих фильтров. Идентификацию Q-окрашенных хромосом проводили с помощью анализатора изображений «Видеотест» (Штейн и др., 1998). Изображение метафазных пластинок с идентифицированными хромосомами сохраняли в памяти компьютера. После этого краситель Hoechst 33258 удаляли 96%-ным этиловым спиртом, препараты дополнительно фиксировали метанолом, высушивали и использовали для последующего окрашивания их по Фельгену.

Окрашивание хромосом по Фельгену реактивом типа Шиффа аурамино-SO₂. Препараты метафазных хромосом, отмытые от красителя Hoechst 33258, гидролизуют в 6 н. HCl в течение 8 мин при комнатной температуре. После гидролиза их трижды споласкивали в дистиллированной воде и помещали на 90 мин в свежеприготовленный, охлажденный до 4 °С раствор аурамина-SO₂ (3 мг/мл), насыщенный сернистым газом. После окрашивания препараты отмывали водой при 4 °С (три смены по 3 мин) и проводили через три смены сернистых вод (K₂S₂O₅; 5 мг/мл в 0.05 н. HCl) при 4 °С по 3 мин в каждой, 15 мин промывали в проточной воде и последовательно обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (70, 96 и 100 %) по 5 мин в двух сменах каждой концентрации, затем высушивали на воздухе и хранили в темноте. Непосредственно перед измерениями препараты заключали в нефлуоресцирующее вазелиновое масло.

Измерение содержания ДНК в индивидуальных хромосомах. Содержание ДНК в индивидуальных хромосомах, идентифицированных ранее по Q-окраске, измеряли с помощью люминесцентного анализатора изображений, используя программу «Видеотест Морфо 3.2» (Штейн, 1998; Агафонова и др., 2002). Флуоресценцию хромосом возбуждали светом с длиной волны 400—450 нм. Интенсивность флуоресценции индивидуальных хромосом регистрировали в спектральной области 510—560 нм.

Обработку полученных данных проводили с помощью программы Excel, вычисляя относительное содержание ДНК в индивидуальных хромосомах как отношение их интегральных яркостей при окрашивании аурамино-SO₂ к интегральной яркости хромосомы 2 в каждой анализируемой метафазной пластинке. Для каждой из исследованных клеточных линий было проанализировано не менее 20 метафаз. Рассчитывали среднее содержание ДНК в хромосоме (X), ошибку среднего (S_x) и коэффициент вариации (v, %). Достоверность различий в содержании ДНК между хромосомами оценивали по критерию Стьюдента. Используемый в данной работе метод позволяет регистрировать небольшие (5 %) изменения содержания ДНК в хромосоме.

Реактивы: среда для культивирования клеток DMEM (Flow Laboratories, США); раствор трипсина (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия); эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота, гентамицин, краситель Гимза, Hoechst 33258, ЭДТА и БЭ (Sigma, США); аурамин ОО (Reanal, Венгрия); NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, MgCl₂, метанол, этанол, ледяная

уксусная кислота, соляная кислота и глицерин («Реахим», Россия); нефлуоресцирующее иммерсионное масло (Carl Zeiss, Германия).

Результаты

Изменения в структуре кариотипа клеток CHL V-79 RJK и Vebr-5 при продолжительном культивировании в присутствии БЭ. На 11-м

пассаже клетки Vebr-5 по основным кариотипическим характеристикам не отличались от клеток исходной линии CHL V-79 RJK (рис. 1, а). Число хромосом в кариотипе от клетки к клетке варьировало незначительно, клетки модального класса содержали 18—19 хромосом. Хромосомный набор характеризовался 3 типами нормальных хромосом китайского хомячка (двумя копиями хромосомы 2 и уникальными копиями хромосом 3 и 8) и 15 типами перестроенных хромосом (Z1—Z15), являющихся маркерами данной линии. Доля клеток с атипичными, случайным

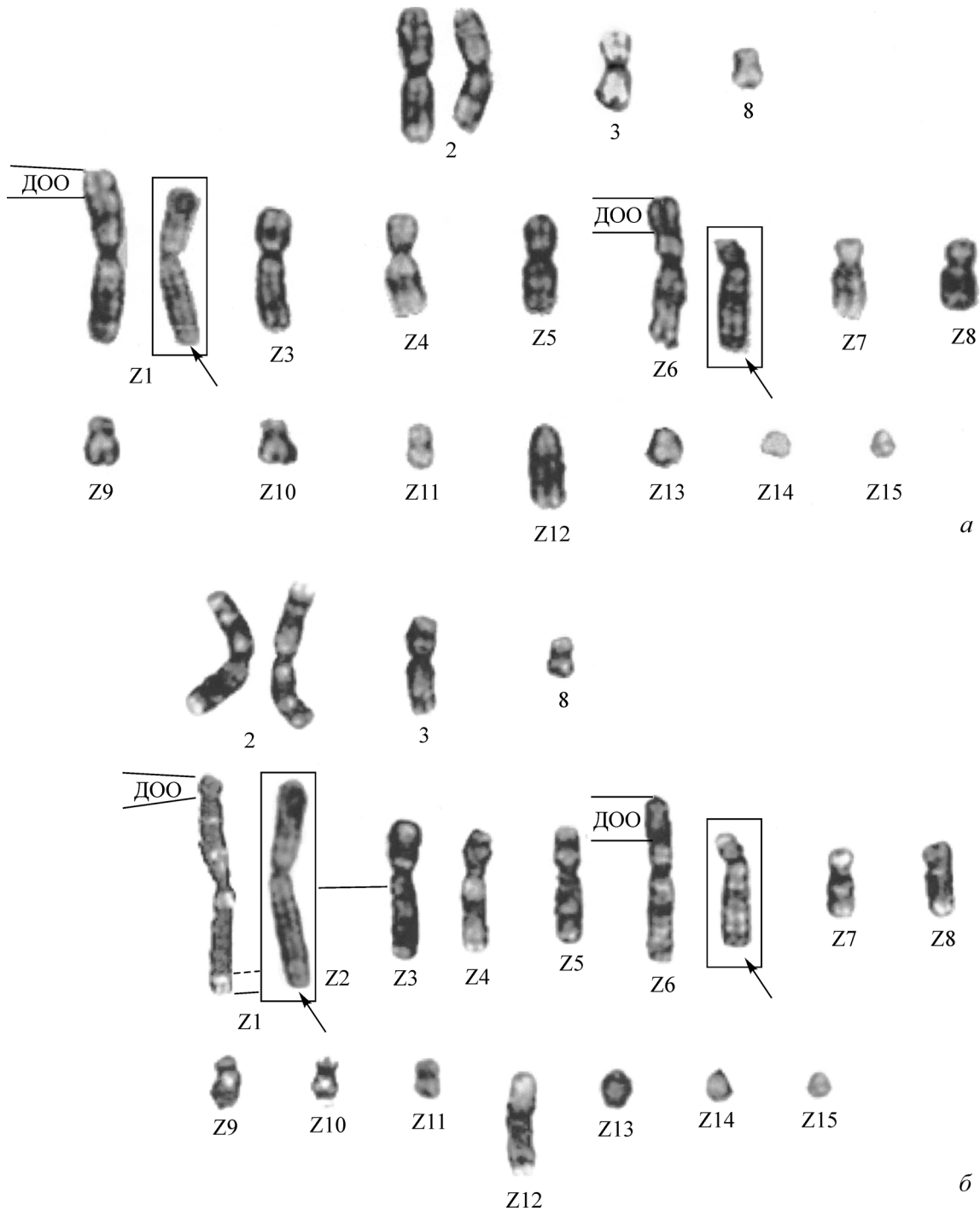


Рис. 1. Кариотип клеток Vebr-5 на 11-м (а) и 88-м (б) пассажах 18 хромосом.

2, 3, 8 — неперестроенные хромосомы, обозначенные в соответствии со стандартной номенклатурой (Ray, Mohandas, 1975); Z — маркерные хромосомы, ДОО — дифференциально окрашенная область. На *врезках* (стрелка) показаны соответствующие маркерные хромосомы исходной линии CHL V-79 RJK.

образом перестроенными хромосомами составляла не более 20 %, доля метафазных пластинок с нарушениями, вызванными элиминированием или экстракопированием тех или иных хромосом кариотипического набора, — около 2 %. Морфологической изменчивостью отличались только две хромосомы — Z1 и Z6, производные хромосомы 1. Характер выявленных в этих хромосомах морфологических изменений был связан с повышенной структурной нестабильностью дистальной части р-плеча (локусы 1p29-31 и 1q26 соответственно), выражающейся в делетировании той или иной части хромосомного материала (5 % клеток) или в появлении ДГМ в виде ГОО (ДОО) (95 % клеток), трактуемых как морфологические проявления амплификаций (рис. 2, *a—e*). В Z1 длина ДОО была постоянной (рис. 1), а в Z6 варьировала (рис. 2, *a—e*).

На 88-м пассаже в клетках Vebr-5 наблюдали усиление дестабилизации структуры кариотипа. Несмотря на то что модальный класс числа хромосом в клетках и морфология отдельных хромосом, за исключением хромосомы Z6, были такими же, как на 11-м пассаже (рис. 1, *b*), число клеточных вариантов с элиминированием или экстракопированием тех или иных (преимущественно мелких) хромосом кариотипического набора возросло. Доля клеток с атипичными хромосомами увеличилась до 30 %. В Z6 наряду с морфологическими вариантами ДОО (ГОО), типичными для клеток Vebr-5 на 11-м пассаже, появились варианты ДОО (ГОО) большей длины (рис. 2, *z, d*). Как следствие в некоторых клетках длина р-плеча Z6 стала равна или больше длины q-плеча.

Микрофлуориметрический анализ содержания ДНК в индивидуальных хромосомах кариотипического набора клеток линии Vebr-5 на 11-м пассаже подтвердил увеличение содержания ДНК в хромосомах Z1 и Z6 (на 8.5 и 42.0 % соответ-

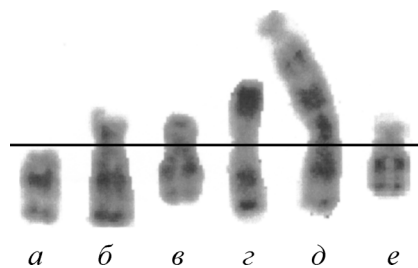


Рис. 2. Структурные варианты хромосомы Z6, выявленные в клетках Vebr-5 в процессе продолжительного культивирования в присутствии бромистого этидия.

a — р-плечо делетировано; *b* — в терминальной части одной из хроматид р-плеча (pter) присутствует гомогенно окрашенная область (ГОО); *в* — незначительная по длине ГОО маркирует обе хроматиды pter; *г* — длина ГОО в pter имеет длину, близкую длине р-плеча; *д* — длина ГОО в pter превышает длину р-плеча; *е* — стандартная хромосома Z6, типичная для клеток исходной линии.

венно; $P < 0.01$) по сравнению с исходным кариотипом (см. таблицу). Кроме того, было обнаружено увеличение содержания ДНК еще в трех хромосомах, в которых морфологических изменений не наблюдалось: в Z5 (на 9 %; $P < 0.01$), Z12 (на 7 %; $P < 0.01$) и Z13 (на 15 %; $P < 0.01$).

На 88-м пассаже количество хромосом с достоверными изменениями в содержании ДНК возросло. Помимо увеличения содержания ДНК в хромосомах Z1, Z5, Z6, Z12 и Z13, зарегистрированного на 11-м пассаже, на 88-м пассаже выявлены изменения содержания ДНК еще в четырех хромосомах кариотипического набора: увеличение в хромосоме Z14 (на 9.4 %; $P < 0.01$) и уменьшение в хромосомах 8, Z7 и Z9 (на 7.9, 7.6 и 8.6 % соответственно; $P < 0.01$) (см. таблицу). В обоих случаях изменений в морфологии данных хромосом не наблюдали. В таблице приведено

Содержание ДНК в индивидуальных хромосомах клеток CHL V-79 RJK и Vebr-5

Хромосома	Линия, пассаж					
	CHL V-79 RJK		Vebr-5, 11-й пассаж		Vebr-5, 88-й пассаж	
	$X \pm S_x$	v, %	$X \pm S_x$	v, %	$X \pm S_x$	v, %
3	0.641 ± 0.006	9.2	0.630 ± 0.010	13.0	0.629 ± 0.009	6.7
8	0.246 ± 0.004	14.4	0.244 ± 0.004	14.3	0.227 ± 0.007 ^b	14.4
Z1	1.182 ± 0.011	9.6	1.283 ± 0.022 ^a	15.4	1.289 ± 0.024 ^a	10.0
Z3	0.936 ± 0.010	10.7	0.921 ± 0.012	10.8	0.879 ± 0.013 ^a	7.2
Z4	0.786 ± 0.007	9.4	0.799 ± 0.009	9.9	0.797 ± 0.017	10.6
Z5	0.678 ± 0.008	11.9	0.739 ± 0.009 ^a	10.2	0.742 ± 0.020 ^a	14.5
Z6	0.733 ± 0.007	9.8	1.040 ± 0.015 ^a	11.1	1.059 ± 0.020 ^a	7.9
Z7	0.550 ± 0.007	13.5	0.533 ± 0.009	14.6	0.508 ± 0.014 ^b	13.0
Z8	0.469 ± 0.006	13.5	0.479 ± 0.006	11.0	0.464 ± 0.014	14.5
Z9	0.335 ± 0.005	13.8	0.322 ± 0.005	12.7	0.306 ± 0.005 ^b	8.8
Z10	0.318 ± 0.005	15.9	0.312 ± 0.005	11.8	0.330 ± 0.006	10.4
Z11	0.215 ± 0.006	25.3	0.214 ± 0.003	9.8	0.199 ± 0.005	12.5
Z12	0.610 ± 0.007	12.5	0.652 ± 0.007 ^a	9.4	0.647 ± 0.015 ^a	12.2
Z13	0.229 ± 0.005	23.0	0.264 ± 0.005 ^a	17.9	0.256 ± 0.006 ^a	14.2
Z14	0.146 ± 0.002	18.2	0.150 ± 0.002	13.7	0.160 ± 0.004 ^a	15.8
Z15	0.106 ± 0.003	25.6	0.109 ± 0.002	13.5	0.105 ± 0.004	21.3

Примечание. Содержание ДНК выражено в усл. ед. и представляет собой отношение содержания ДНК в индивидуальных хромосомах к среднему содержанию ДНК в хромосоме 2 той же пластинки. ^aУвеличение содержания ДНК. ^bУменьшение содержания ДНК.

значение содержания ДНК для доминирующего варианта хромосомы Z6 (см. также рис. 2, в). Анализ полученных результатов показал, что коэффициент вариации изменения содержания ДНК для крупных хромосом составляет около 9, для мелких — около 26 %.

Обсуждение

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что использование микрофлуориметрического метода для определения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах клеток CHL V-79 RJK-БЭ позволило не только количественно подтвердить данные о том, что типичная МЛУ сопряжена с дестабилизацией генетического аппарата клеток, но и расширить это представление.

Известно, что в большинстве случаев приобретение клетками млекопитающих МЛУ сопряжено с амплификацией и гиперэкспрессией генов *mdr* (Копнин и др., 1981; Kopnin et al., 1985; Гринчук и др., 1986в, 1996; Teeter et al., 1986; Bradley et al., 1989). Одним из мест возникновения морфологических маркеров амплификации *mdr* в клетках китайского хомячка с МЛУ является локус 1q26, в котором локализованы гены *mdr* дикого типа (Teeter et al., 1986). Приобретение клетками CHL V-79 RJK устойчивости к БЭ оказалось связано с появлением ДОО (ГОО) в двух хромосомных локусах: 1p29-31(Z1) и 1q26(Z6) (Гринчук и др., 1988, 1996). Реконструкция кариотипа CHL V-79 RJK позволила установить, что локус 1q26, в котором локализован нативный *mdr*, присутствует в трех хромосомах кариотипического набора: в Z1 (del 1pter), Z6 (del 1qter) и Z12 (del 1p). Использование микрофлуориметрического метода показало, что уже на ранних пассажах клетки CHL V-79 RJK-БЭ характеризуются достоверным увеличением содержания ДНК во всех трех хромосом-носителях 1q26. Однако типичные для клеток с МЛУ изменения, связанные с появлением в кариотипическом наборе ДГМ амплификационного характера (ГОО или ДОО в 1q26), наблюдали лишь в одной из них — хромосоме Z6. Морфологическая нестабильность данных образований и возрастание их длины в связи с увеличением концентрации селективного агента позволили нам предположить, что амплификация *mdr* в 1q26 хромосомы Z6 при приобретении клетками V-79 RJK устойчивости к БЭ является определяющей.

Обсуждая природу увеличения (или уменьшения) содержания ДНК в других хромосомах кариотипического набора, можно высказать следующие предположения. Увеличение содержания ДНК в Z12, хотя оно и не связано с визуальными изменениями в морфологии, мы склонны рассматривать в связи с амплификацией генов (скорее всего, генов *mdr*) в 1q26 данной хромосомы, так как именно в этом участке мы наблюдали ГОО (ДОО) в независимо отселектированных на устойчивость к БЭ клеточных вариантах CHL V-79 RJK. Отсутствие в проанализированном материале ГОО (ДОО) в Z12 можно объяснить либо тем, что в данном случае степень амплификации генов (*mdr*) не столь значительна, чтобы проявляться морфологически, либо тем, что амплифицированный материал не выявляется, так как имеет более компактную упаковку. Достоверное увеличение содержания ДНК без видимых морфологических изменений еще в четырех хромосомах набора (Z1, Z5, Z13 и Z14), не являющихся носителями локуса, ответственного за локализацию нативного гена *mdr*, позволяет высказать два независимых предположения: либо данные изменения связаны с микрохромосом-

ными перестройками, либо, что не лишено оснований, носят также амплифицированный характер.

К настоящему моменту известно, что ГОО (ДОО) в клетках с МЛУ далеко не всегда возникают по месту локализации *mdr* дикого типа. На основании литературных и собственных данных можно говорить о том, что в различных клеточных культурах китайского хомячка появление морфологических маркеров генных амплификаций (ГОО и ДОО) в связи с приобретением клетками резистентности к тому или иному агенту, вызывающему МЛУ, наблюдали по меньшей мере в пяти разных хромосомах, а именно в хромосомах 1, 2, 7, 8 и 9, и по меньшей мере в четырех локусах в пределах хромосомы 1 (Biedler, Peterson, 1981; Гринчук и др., 1986в, 1988, 1994; Biedler et al., 1986; Jongsma et al., 1987). В качестве одного из возможных объяснений такого непостоянства в локализации ГОО (ДОО), причинно связанных с приобретением клетками МЛУ, может быть предположение о том, что гены *mdr*, подверженные амплификации, относятся к числу мобильных элементов и могут с легкостью мигрировать в пределах генома. Суть другого предположения, которое нам больше импонирует, заключается в том, что даже незначительные изменения в функционировании генов *mdr* (повышенная экспрессия и амплификация) приводят к запуску разнесенной во времени разнонаправленной дестабилизации клеточного генома. Сравнение результатов микрофлуориметрического и кариологического анализа резистентных клеток на разных этапах их культивирования позволяет говорить о том, что количественные изменения в связи с приобретением клетками V-79 RJK МЛУ имеют еще больший спектр, чем качественные. Тот факт, что коэффициент вариации содержания ДНК в крупных хромосомах резистентных клеток V-79 RJK оказался меньше (~9%), чем в мелких (~26%), может также служить показателем дестабилизации клеточного генома и свидетельствовать о том, что мелкие хромосомы обладают большими потенциальными к нестабильности, нежели крупные. Достоверное уменьшение содержания ДНК в хромосомах 8, Z7 и Z9, вероятнее всего связанное с микроделециями, является еще одним примером разнокачественности изменений в структуре клеточного генома в связи с приобретением клетками V-79 RJK феномена МЛУ.

Таким образом, полученные в настоящей работе данные, в основе которых лежат качественный и количественный методы (соответственно кариотипирование и микрофлуориметрия), подтверждают наше предположение о том, что приобретение клетками феномена МЛУ приводит к разнонаправленной и прогрессирующей дестабилизации клеточного генома.

Авторы выражают благодарность за помощь при оформлении статьи Л. Л. Алексеенко.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

Список литературы

Агафонова Н. А., Ушал И. Э., Кудрявцев Б. Н. 2002. Метод телевизионной флуориметрии ДНК в индивидуальных хромосомах человека. Цитология. 44 (9) : 858.

Гринчук Т. М., Игнатова Т. Н., Ефимова Е. В., Сорокина Е. А. 1986а. Кариотипические особенности клеток китайско-

го хомячка СНО-K1, устойчивых к колхицину. Цитология. 28 (1) : 63—68.

Гринчук Т. М., Игнатова Т. Н., Сорокина Е. А., Арцыбашева И. В., Паньшина Ю. Т. 1988. Хромосомный полиморфизм клеток млекопитающих с множественной лекарственной устойчивостью. I. Анализ кариотипа клеток китайского хомячка, устойчивых к бромистому этидию, на ранних пассажах первой ступени селекции. Цитология. 30 (3) : 312—319.

Гринчук Т. М., Липская Л. А., Арцыбашева И. В., Сорокина Е. А., Паньшина Ю. Т., Игнатова Т. Н. 1996. Изменчивость кариотипа клеток китайского хомячка CHL V-79 RJK, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью, обусловленной амплификацией генов семейств *mdr*. Цитология. 38 (2) : 161—171.

Гринчук Т. М., Павленко М. А., Липская Л. А., Сорокина Е. А., Тарунина М. В., Березкина Е. В., Ковалева З. В., Игнатова Т. Н. 1998. Устойчивость клеток хронического промиелолейкоза человека линии K562 к адриамицину коррелирует с направленной дестабилизацией генома — амплификацией гена *mdr 1* и случайными изменениями в структуре кариотипа. Цитология. 40 (7) : 652—660.

Гринчук Т. М., Сорокина Е. А., Тарунина М. В. 1986. Особенности кариотипа фибробластов мыши линии СЗН10Т1/2, прошедших длительную селекцию на способность размножаться в присутствии бромистого этидия. Цитология. 28 (4) : 422—429.

Гринчук Т. М., Столяр Е. А., Горностаев В. С., Игнатова Т. Н. 1984. Специфические изменения хромосом 2 и 8 и преобразования кариотипа в клетках мышечной гепатомы ХХIIа, устойчивых к колхицину. В кн.: Структура и функции клеточного ядра: Тез. докл. Всесоюз. симп. Пушино. 35

Гринчук Т. М., Сухих Т. Р., Сорокина Е. А., Арцыбашева И. В., Паньшина Ю. Т., Розанов Ю. М., Кудрявцев Б. Н., Игнатова Т. Н. 1986. Микрофлуориметрическая оценка содержания ДНК в индивидуальных хромосомах подтверждает цитогенетически обнаружимые амплификации ДНК в структурных вариантах хромосомы 1 клеток китайского хомячка со стабильной множественной лекарственной устойчивостью. ДАН СССР. 286 (3) : 712—717.

Карпищенко А. И. 1999. Медицинские лабораторные технологии. СПб.: Наука. 656 с.

Копнин Б. П. 1981. Специфические изменения в клетках, резистентных к колхицину. Генетика. 17 (2) : 308—317.

Штейн Г. И., Пантелеев В. Г., Поваркова А. В., Кудрявцев Б. Н. 1998. Возможности анализатора изображений «Видеотест» для проведения микрофлуориметрических исследований в цитологии. Цитология. 40 (10) : 913—916.

Bradley G., Juranka P. F., Ling V. 1988. Mechanism of multidrug resistance. Biochim. biophys. acta. 948 : 87—128.

Bradley G., Neik M., Ling V. 1989. P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human ovarian carcinoma cell lines. Cancer Res. 49 : 2790—2796.

Devault A., Gross P. 1990. Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificity. Mol. Cell. Biol. 10 : 1652—1663.

Kopnin B. P., Massino J. S., Gudkov A. V. 1985. Regular pattern of karyotypic alterations accompanying gene amplification in *Djungarian hamster* cells study of colchicine adriablastin and methotrexate resistance. Chromosoma. 95 : 25—36.

Ray M., Mohandas T. 1975. Proposed banding nomenclature for *Chinese hamster* chromosomes (*Cricetulus griseus*). Cytogenetics. 16 : 83—91U.

Riordan J. R., Deuchars K., Kartner N., Alon N., Nrent T., Ling V. 1986. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. Nature. 316 : 817—819.

Roninson I. B., Abelson H., Housman D. E., Novell N., Varshevsky A. 1984. Amplification of specific DNA sequences correlates with multidrug resistance in *Chinese hamster* cells. Nature. 309 : 626—628.

Scotto K. W., Biedler J. L., Melera P. W. 1986. Amplification and expression of gene associated with multidrug resistance in mammalian cells. Science. 232 : 751—755.

Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet. 2 : 971—972.

Teeter L. D., Atsumi S. I., Sen S., Kuo M. T. 1986. DNA amplification in multidrug, cross-resistant *Chinese hamster* ovary cells. Molecular characterization and cytogenetical localization. J. Cell Biol. 103 : 1159—1166.

Поступила 13 II 2007

MICROFLUORIMETRIC ANALYSIS OF DYNAMICS OF GENOMIC CHANGES OF CHINESE HAMSTER FIBROBLASTS CHL V-79 RJK WITH MULTIDRUG RESISTANCE

T. M. Grinchuk,¹ I. E. Ushal, I. V. Artsybasheva, M. A. Pavlenko, B. N. Kudryavtsev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: gmdmk@mail.cytspb.rssi.ru

Results of karyological analysis of cells CHL V-79 RJK selected for resistance to ethidium bromide (EB) causing multidrug resistance (MDR) (line Vebr-5) were compared with the data of microfluorimetric determination of DNA content in individual chromosomes of the karyotype. The analysis was performed at the 11th and 88th passages. Karyotyping of Vebr-5 has shown the presence of an additional genetic material (ADM) in the form of homogeneously or differentially stained regions (HSRs and DSRs, respectively) in two chromosomes (Z1 and Z6, loci 1p29-31 and 1q26, respectively). HSRs in Z6, in the region of localization of the wild type of gene *mdr*, had unstable length and structure characteristic of morphological markers of amplification of genes of the family *mdr*. During long cultivation of Vebr-5 in the presence of EB (88 passages), the instability of HSRs in Z6 increased. Results of microfluorimetric analysis of Vebr-5 at the 11th passage have shown an increase in the DNA content not only in chromosomes Z1 and Z6 marked by HSRs, but also in three chromosomes (Z5, Z12 and Z13) that have no visual morphological changes. The corresponding analysis at the 88th passage has also revealed non-random changes in the DNA content in four more chromosomes: an increase in Z14, while a decrease in chromosomes 8, Z7, and Z9. A decrease of the DNA content in chromosomes is considered to be a result of a partial loss of genetic material, while its increase is a result of its translocation and (or) amplification. Coefficient of variation of the DNA content changes for large chromosomes amounted to about 9 % while for small chromosomes it is about 26 %, which indicates that small chromosomes have greater potential for instability than the large ones. The data obtained not only confirm, but also enlarge the concept of directions and character of destabilization of the cell genetic apparatus in the process of neoplastic transformation due to the MDR acquisition by cells.

Key words: additional genetic material, chromosome, DNA content, karyotype instability, microfluorimetric analysis, morphological markers of amplification, multidrug resistance.