

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ФИБРОНЕКТИНА НА КАРИОТИПИЧЕСКУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ПОЧКИ КЕНГУРОВОЙ КРЫСЫ

© 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 «безмаркерных» клеточных линиях почки кенгуровой крысы NBL-3-17 и NBL-3-11 при культивировании клеток на поверхности, покрытой фибронектином. Показано, что при культивировании клеточной линии NBL-3-17 на поверхности, покрытой фибронектином, в течение 1, 2, 4 и 8 сут характер распределения клеток по числу хромосом существенно изменяется по сравнению с контрольными вариантами, в которых клетки культивировали на поверхности без фибронектинового субстрата. 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 с преимущественной адгезией клеток с числом хромосом меньше модального, с нарушениями в митотическом аппарате и с дальнейшей 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 5 сут приводят к восстановлению контрольного распределения. При культивировании клеточной линии NBL-3-11 на поверхности, покрытой фибронектином, в течение 1, 2, 4 и 8 сут характер распределения клеток по числу хромосом существенно не изменяется по сравнению с контрольными вариантами. При культивировании клеток линии NBL-3-17 на поверхности, покрытой фибронектином, в течение 1, 2, 4 и 8 сут частота хромосомных aberrаций не увеличивается по сравнению с контрольными вариантами. Частота хромосомных aberrаций в клетках линии NBL-3-11 в этих же условиях достоверно увеличивается по сравнению с контрольными вариантами за счет увеличения частоты хромосомных, хроматидных разрывов и дицентриков (теломерных ассоциаций). Обсуждаются возможные причины различий в количественной и структурной кариотипической изменчивости между клеточными линиями NBL-3-17 (гипотриплоид) и NBL-3-11 (гиподиплоид) при культивировании на фибронектине. Возможными причинами межлинейных кариотипических различий являются особенности кариотипической структуры линии NBL-3-11 и изменения генной экспрессии в связи с увеличением дозы определенных функционирующих генов в гипотриплоиде NBL-3-17.

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

Образование постоянных клеточных линий, их длительное существование вне организма происходит посредством адаптации клеточной линии к измененным условиям. Процесс адаптации выражается, в частности, в определенных количественных и структурных изменениях кариотипа, в результате чего создается сбалансированная кариотипическая структура, обеспечивающая оптимальный генный баланс в клеточной популяции *in vitro* как целостной системе. Сбалансированная кариотипическая структура клеточной линии характеризуется определенным набором маркерных хромосом («маркерные» линии) или соответствием кариотипу донора («безмаркерные» линии), выраженной в большей или меньшей степени частотой клеток с модальным числом хромосом, частотами клеток с другими числами хромосом, определенными пределами изменчивости по числу хромосом (Захаров и др., 1966; Мамаева и др., 1986; Филатов и др., 1988; Мамаева, 1996; Полянская, Вахтин,

2003). Клетки с выраженным числом хромосом имеют преобладающий структурный вариант кариотипа (СВК — число гомологичных хромосом каждого морфологического типа) и дополнительные СВК (Полянская и др., 1981; Полянская, 2000).

Клеточные популяции *in vitro* являются динамичными системами и, лишившись многоступенчатого организменного контроля, в значительной степени подвержены влиянию внешних факторов, которые способствуют усилению кариотипической изменчивости. Первопричиной всех наблюдаемых кариотипических изменений несомненно являются различные изменения в клеточном метаболизме, обусловленные нарушениями в проведении сигналов с поверхности клеток в ядро. Поэтому необходимо связать свойства клеточной поверхности с кариотипическими характеристиками клеток. Перспективным подходом к выяснению возможных конкретных связей между рецепторами клеточной поверхности и ка-

риотипической структурой является исследование влияния разных субстратов, на которых культивируются клетки, на кариотипическую изменчивость клеточных линий. Клетки растут на субстрате, покрытом внеклеточным матриксом, состоящим из разных белков, синтезируемых самими клетками. Белки внеклеточного матрикса, взаимодействуя с рецепторами, локализованными на поверхности клеточной мембраны, оказывают существенное влияние на функции клеток: на их миграцию, форму, полярность, пролиферацию, дифференцировку, злокачественную трансформацию (Paranko et al., 1983; Graf et al., 1987; Ocalan et al., 1988; Freeman et al., 1991; Basson et al., 1996; Blake et al., 1997; Арэ и др., 1999; Xu et al., 2001; Mostafavi-Pour et al., 2003; Amit et al., 2004; Ahmed et al., 2005; Fukumoto, Yamada, 2005; Klimanskaya et al., 2005; Kato et al., 2006; Koenig et al., 2006; Wang, Milner, 2006).

Белки внеклеточного матрикса различаются по своим свойствам и по тому влиянию, 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 с рецепторами $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 6\beta 4$, а фибронектин — с рецепторами $\alpha 4\beta 1$ и $\alpha 5\beta 1$ (Are et al., 2001; Xu et al., 2001; Петухова и др., 2004). Известно также, что ламинин имеет несколько изоформ, которые по-разному взаимодействуют с культивируемыми на них кератиноцитами. Предполагается, что на поверхности этих клеток имеется специфический рецептор к ламинину-2/4, не участвующий во взаимодействии с ламинином-1 (Черепанова и др., 2002).

О наличии связи между клеточной поверхностью и кариотипической структурой свидетельствует ряд косвенных данных о влиянии смены способа культивирования клеток (статического, роллерного, суспензионного, монослойного) на структурные и количественные изменения кариотипа популяции (Nielsen, 1972; Семенова и др., 1984; Литвинчук и др., 1986; Царева и др., 1990; Amadori, Berneri, 1993). Возможно, что изменение характера клеточных взаимодействий при смене способа культивирования культуры влияет, в частности, на процессы, связанные с поддержанием кариотипической структуры. Полученные нами ранее результаты, демонстрирующие усиление кариотипической изменчивости при культивировании клеток на поверхности, покрытой ламинином-2/4 или фибронектином, также свидетельствуют в пользу наличия связи между клеточной поверхностью и кариотипом (Полянская и др., 2002, 2003а, 2003б, 2005).

Различный характер взаимодействия между клеточной поверхностью и внеклеточным матриксом связан не только с разными белками внеклеточного матрикса и их изоформами, но и с разным происхождением клеток. Так, известно, что эпителиоподобные и фибробластоподобные клетки могут секретировать белки внеклеточного матрикса в разном количественном соотношении (Домнина, Любимов, 1988). Поэтому наше исследование изначально было построено на сравнительном изучении влияния разных белков внеклеточного матрикса (ламнина и фибронектина) на фибробластоподобные (фибробласты кожи индийского мунджака) и эпителиоподобные (почка кенгуровой крысы) клеточные линии (Полянская и др., 2002, 2003а, 2003б, 2005). Также представлялось принципиальным выяснить роль генетических

различий в характере кариотипической изменчивости при культивировании на указанных субстратах. Результат полимеразной цепной реакции со случайными праймерами свидетельствует о сходстве первичной структуры ДНК в гиподиплоидной линии NBL-3-11 и гипотриплоидной линии NBL-3-17 (Полянская и др., 2003а). Поэтому, возможно, генетические различия между этими линиями связаны преимущественно с изменением генной экспрессии, а именно дозы некоторых генов.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ кариотипической изменчивости в двух клеточных линиях почки кенгуровой крысы (NBL-3-11 и NBL-3-17) при культивировании на иммобилизованном фибронектине в течение 8 сут.

Материал и методика

Две «безмаркерные» линии клеток почки кенгуровой крысы — NBL-3-11 и NBL-3-17 — получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. Кариотип линии NBL-3-11 является гиподиплоидным и соответствует кариотипу донора, за исключением моносомии по аутосоме 5. Модальное число хромосом равно 11. Кариотип линии NBL-3-17 отличается от NBL-3-11 числом гомологичных хромосом и является гипотриплоидным. Модальное число хромосом равно 17 с дисомией по хромосоме 5. Для анализа влияния белка внеклеточного матрикса — фибронектина — на кариотипическую изменчивость в течение 1, 2, 4 и 8 сут клетки из субмоносоля снимали с гидрофильной поверхности пластиковых чашек смесью трипсина и вер-

Т а б л и ц а 1

Варианты культивирования клеток

Вариант опыта	Условия культивирования
ФН	Клетки культивировали на гидрофобной поверхности, покрытой фибронектином (подробности см. в тексте)
К ₂	Клетки культивировали на гидрофильной поверхности (используемой для рутинного культивирования клеток), инкубировали в бессывороточной среде в течение 2.5 ч и далее культивировали в среде, содержащей сыворотку
К _{общ.}	Клетки постоянно культивировали на гидрофильной поверхности
К _{общ.1}	Клетки, не прикрепившиеся к фибронектиновому субстрату в течение 2.5 ч в бессывороточной среде, далее культивировали в среде, содержащей сыворотку, на гидрофильной поверхности
К ₁	Клетки культивировали на гидрофобной поверхности (не несущей заряда в отличие от гидрофильной), инкубировали в бессывороточной среде в течение 2.5 ч и далее культивировали в среде, содержащей сыворотку
ФНК	Клетки культивировали на фибронектине в течение 4 сут и далее в течение 5 сут на гидрофильной поверхности

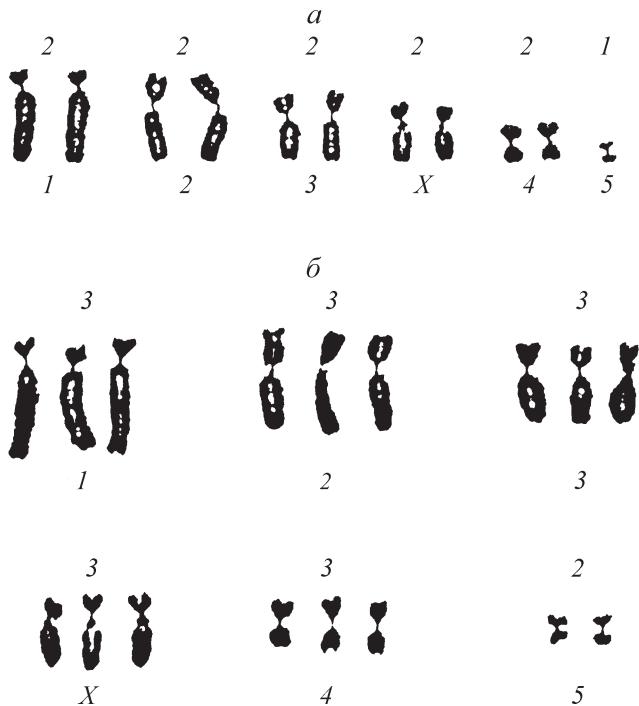


Рис. 1. Основные структурные варианты кариотипов (СВК) клеток линий NBL-3-11 (а) и NBL-3-17 (б).

СВК: $2 + 2 + 2 + 2 + 2 + 1$ (а) и $3 + 3 + 3 + 3 + 3 + 2$ (б). Цифры под хромосомами — номера хромосом; цифры над хромосомами — число гомологичных хромосом одного морфологического типа, составляющих СВК; X — половая хромосома.

сена (1 : 3), центрифугировали и помещали на покрытую фибронектином гидрофобную поверхность в бессывороточную среду на 2.5 ч для специфического связывания рецепторов клеточной поверхности с фибронектином. Перед высевом клеток фибронектин в концентрации 20 мкг/мл наносили на поверхность гидрофобных чашек, инкубировали 1 ч при 37 °С и промывали фосфатно-солевым буфером. Затем сливали не прикрепившиеся к поверхности клетки вместе с бессывороточной средой и добавляли среду с сывороткой, в которой продолжали длительно культивировать клетки (вариант ФН). Параллельно с этим опытным вариантом анализировали контрольные варианты, в которых клетки культивировали на поверхности без фибронектинового субстрата (табл. 1).

Для получения препаратов метафазных хромосом за 4 ч до фиксации клеток в культуру вводили колцемид (0.1 мкг/мл), снимали клетки с субстрата смесью трипсина и версена (1 : 3), проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 М раствора KCl и 1%-ного раствора цитрата натрия (1 : 1) и фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Хромосомы окрашивали водным раствором Гимза (1 : 50).

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). Хромосомные aberrации учитывали метафазным методом. Регистрировали количество и типы хромосомных aberrаций. В каждом варианте анализировали не менее 100 метафазных пластинок.

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

Результаты и обсуждение

Анализ количественной кариотипической изменчивости в клеточной линии NBL-3-17. Результаты по исследованию влияния субстрата, покрытого фибронектином, на распределение клеток по числу хромосом при культивировании в течение 1, 2, 4 и 8 сут представлены на рис. 2. Из представленных данных следует, что в контрольных вариантах (рис. 2, б1—б4, в1—в4) распределения клеток по числу хромосом совпадают. Оценка по критерию χ^2 показала, что $P > 0.05$. Частоты встречаемости клеток с модальным числом хромосом, равным 17, во всех вариантах достоверно не различаются между собой. В связи с отсутствием достоверных различий между контрольными вариантами результаты опытных вариантов ФН мы будем сравнивать с объединенным контролем К ($K_2 + K_{\text{общ.}}$).

При культивировании клеток на субстрате, покрытом фибронектином, уже через 1 сут характер распределения клеток по числу хромосом существенно меняется. Так, наблюдается достоверное изменение общего характера распределения клеток по числу хромосом по сравнению с объединенным контролем; $\chi^2 = 43$, $P < 0.01$ (рис. 2, а1—в1). Имеют место значительное снижение частоты клеток с модальным числом хромосом и увеличение клеток с меньшими числами хромосом, а именно: при сравнении вариантов ФН и объединенного контроля видно, что в опытном варианте снижается частота клеток с 17 хромосомами (27.7 ± 3.9 и 55.0 ± 3.5 % соответственно; $P < 0.01$) и увеличивается частота клеток с 16 и меньшими числами хромосом (61.5 ± 4.3 и 34.0 ± 3.3 % соответственно; $P < 0.01$). При культивировании клеток на фибронектине в течение 2, 4 и 8 сут также наблюдается изменение общего характера распределения клеток по числу хромосом по сравнению с объединенным контролем: $\chi^2 = 24.9$, 53.6 и 36.0 соответственно; $P < 0.01$ (рис. 2, а2—а4, б2—б4, в2—в4). Снижается частота клеток с модальным числом хромосом. Так, через 2 сут она составляет 37.2 ± 3.6 и 52.7 ± 2.9 % для ФН и К соответственно, через 4 сут — 35.2 ± 3.3 и 57.8 ± 2.6 % для ФН и К соответственно, через 8 сут — 44.9 ± 3.2 и 62.5 ± 3.1 % для ФН и К соответственно; $P < 0.01$. Одновременно увеличивается частота клеток с 16 и меньшими числами хромосом, составляя для ФН и К соответственно: через 2 сут — 50.0 ± 3.7 и 34.0 ± 3.3 %, через 4 сут — 53.8 ± 3.4 и 32.2 ± 2.5 %, через 8 сут — 42.4 ± 3.2 и 25.7 ± 2.8 %; $P < 0.01$.

Анализ распределения индивидуальных хромосом показал, что большинство клеток с модальным числом хромосом в опытных и контрольных вариантах имеют основной СВК — $3 + 3 + 3 + 3 + 3 + 2$ (рис. 1), встречающийся с одинаковой частотой (96.5 ± 1.1 % в опытных вариантах и 94.2 ± 0.9 % в контрольных). Следовательно, усиления гетерогенности в клетках с модальным числом хромосом при культивировании на фибронектине в течение 8 сут по сравнению с контролем не происходит. Иная картина наблюдается при анализе дополнительных СВК. Так, при культивировании клеток на фибронектине

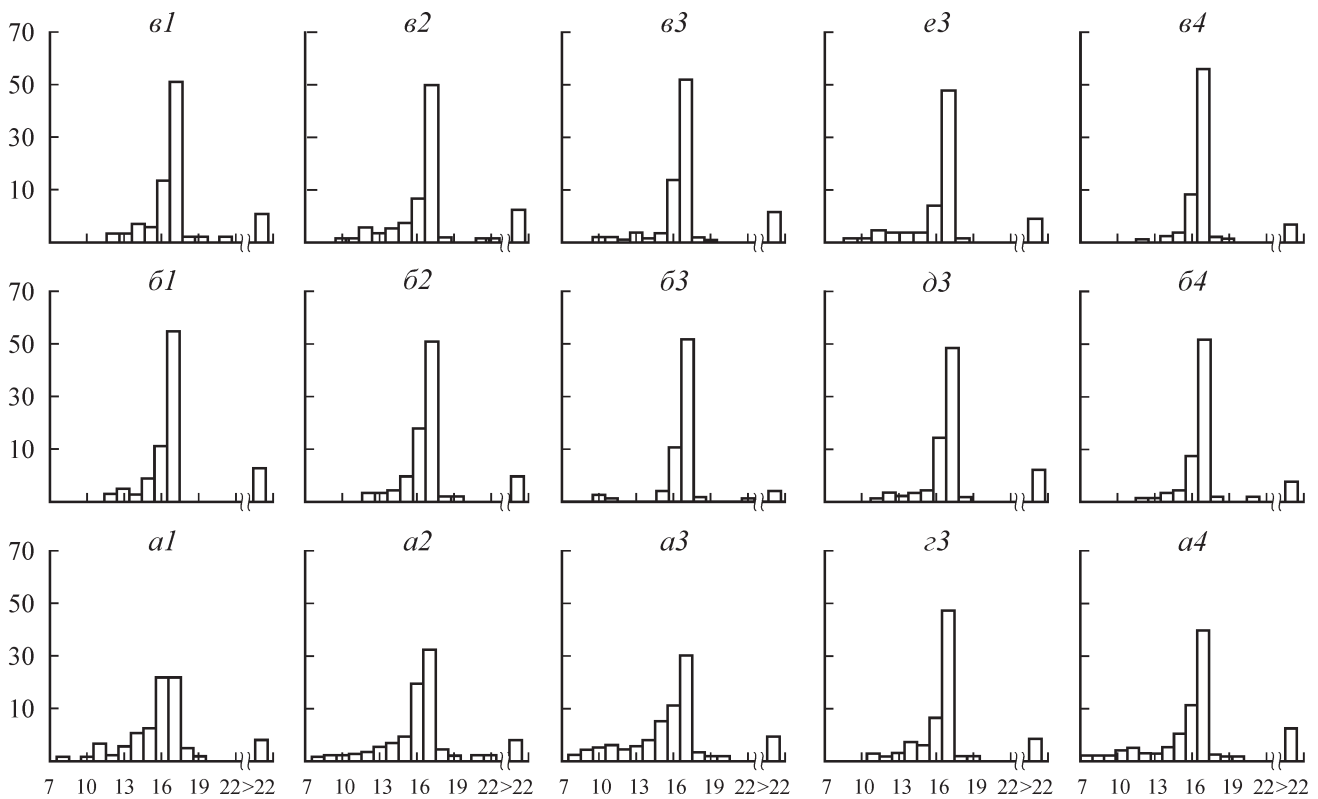


Рис. 2. Распределение по числу хромосом клеток линии NBL-3-17 при культивировании их на фибронектиновом субстрате в течение 1, 2, 4 и 8 сут.

По горизонтали — число хромосом в клетке; по вертикали — частота встречаемости клеток, %. Клетки культивировали в течение 1 (*a1—в1*), 2 (*a2—в2*), 4 (*a3—в3*) и 8 (*a4—в4*) сут. *a* — клетки культивировали на гидрофобной поверхности, покрытой фибронектином; *b* — клетки культивировали на гидрофильной поверхности, инкубировали в бессывороточной среде в течение 2.5 ч и далее культивировали в среде, содержащей сыворотку (K_2); *в* — клетки постоянно культивировали на гидрофильной поверхности ($K_{общ.1}$); *г* — клетки, не прикрепившиеся к фибронектиновому субстрату в течение 2.5 ч в бессывороточной среде, далее культивировали в среде, содержащей сыворотку, на гидрофильной поверхности ($K_{общ.1}$); *д* — клетки культивировали на гидрофобной поверхности, инкубировали в бессывороточной среде в течение 2.5 ч и далее культивировали в среде с сывороткой (K_1); *е* — клетки культивировали на фибронектине в течение 4 сут и далее в течение 5 сут на гидрофильной поверхности (ФНК).

в течение 1, 2, 4 и 8 сут наблюдаемое увеличение частоты клеток с числом хромосом от 16 и ниже происходит за счет увеличения ($P < 0.01$) частоты разных типов дополнительных СВК по сравнению с контрольными вариантами. Так, через 1 сут ФН — 43.4 ± 4.6 , К — 25.0 ± 3.4 %; через 2 сут ФН — 35.3 ± 3.9 , К — 20.4 ± 2.6 %; через 4 сут ФН — 43.2 ± 3.6 , К — 24.3 ± 2.5 %; через 8 сут ФН — 30.0 ± 3.2 , К — 17.0 ± 2.4 %.

Таким образом, увеличение кариотипической гетерогенности при культивировании на фибронектине происходит за счет новых типов дополнительных СВК.

Культивирование клеток на гидрофобной поверхности (K_1) в течение 4 сут не приводит к изменению распределения клеток по числу хромосом по сравнению с объединенным контролем ($\chi^2 = 1.8$, $P > 0.05$; рис. 2, *б3*, *в3*, *д3*). Частота клеток с модальным числом хромосом соответствует уровню контроля и составляет 52.0 ± 5.0 %.

Анализ количественной кариотипической изменчивости в клетках, не прикрепившихся к фибронектиновому субстрату в течение 2.5 ч в бессывороточной среде и при дальнейшем культивировании их в среде с сывороткой на гидрофильной поверхности ($K_{общ.1}$) в течение 4 сут, не выявил изменений по сравнению с контрольными вариантами. Оценка по критерию χ^2 показала, что $P > 0.05$ (рис. 2, *б3*, *в3*, *г3*). Частота клеток с модальным

числом хромосом соответствует контролю и равна 57.3 ± 4.7 %. Частота клеток с числами хромосом меньше 17 также соответствует контролю — 32.7 ± 4.5 %.

Полученные результаты позволяют предположить, что при взаимодействии клеток с фибронектином происходят изменения в клеточном метаболизме, связанные с механизмами анеуплоидии, которые на заметный срок, во всяком случае на несколько митотических циклов, выводят клетки из стабильного состояния. В результате этого взаимодействия усиливается гетерогенность кариотипической структуры. Возможно, происходят нарушения в митотическом аппарате, в частности в функционировании микротрубочек, и как следствие этого нарушается нормальная сегрегация хромосом в митозе. Показано, что рост микротрубочек регулирует адгезионные контакты в эпителиальных клетках. Показано также, что опухолевый супрессор p53, являющийся одним из ключевых регуляторов клеточной пролиферации и геномной стабильности, опосредованно влияет на поддержание системы микротрубочек (Waterman-Storer et al., 2000; Sablina et al., 2001). Известно, что транскрипционный фактор NF-κB, который участвует в проведении сигнала в ответ на контакты белков внеклеточного матрикса с соответствующими рецепторами на поверхности клеток, осуществляет взаимодействие с белками цитоскелета, включая систему микротрубочек (Rosette, Karin, 1995; Crepieux et al., 1997).

Наблюдаемые изменения в кариотипической структуре уже через 1 сут, т. е. в первом митотическом цикле, могут свидетельствовать о том, что помимо нарушений в механизме сегрегации хромосом может происходить отбор определенных клеточных кариотипических вариантов, которые более устойчивы к измененным условиям существования клеточной популяции. Известно, что клеточная популяция *in vitro* характеризуется наличием клеток с разным числом хромосом и с разными СВК. Возможно, что в клеточной популяции, культивируемой на обычной гидрофильной поверхности, клетки с разной кариотипической количественной характеристикой различаются и по адгезивным свойствам, а именно: некоторые кариотипические варианты, изначально имеющиеся в клеточной популяции, но редко встречающиеся, при посеве на фибронектин преимущественно распластываются в течение 2.5 ч. В результате селективного преимущества количество таких вариантов при дальнейшем культивировании на этом субстрате может увеличиться. Подтверждением этой точки зрения могут явиться данные о характере количественной кариотипической структуры в варианте $K_{\text{общ.1}}$. Так, в клетках, не прикрепившихся к фибронектиновому субстрату в течение 2.5 ч в бессывороточной среде с последующим культивированием в среде с сывороткой на гидрофильной поверхности, не выявлено количественных кариотипических изменений по сравнению с контролем.

Были проанализированы клетки, культивировавшиеся на фибронектине в течение 4 сут с последующим культивированием в течение 5 сут на гидрофильной поверхности (ФНК). Наблюдается восстановление контрольного распределения клеток по числу хромосом ($\chi^2 = 5.7$, $P > 0.05$); частота клеток с модалным числом хромосом достигает уровня контроля — $58.2 \pm 4.7\%$, как и частота клеток с 16 и меньшими числами хромосом ($35.0 \pm \pm 4.8\%$) (рис. 2, б3, в3, е3). Восстановление количественных кариотипических характеристик до контрольного уровня наблюдалось нами ранее при культивировании линии фибробластов кожи индийского мунджака на ламинине и фибронектине с последующим культивированием (5 сут) на гидрофильной поверхности. Культивирование же на гидрофильной поверхности в течение более короткого времени (1 и 2 сут) после снятия клеток с белкового субстрата не приводит к восстановлению количественных кариотипических характеристик до контрольного уровня (Полянская и др., 2002, 2005). Совокупность данных, по-видимому, свидетельствует о том, что при переводе клеток в стандартные условия культивирования (гидрофильная поверхность) должно пройти определенное время для восстановления метаболических процессов, способствующих анеупloidии.

Анализ количественной кариотипической изменчивости в клеточной линии NBL-3-11. Результаты по исследованию влияния субстрата, покрытого фибронектином, на распределение клеток по числу хромосом при культивировании в течение 1, 2, 4 и 8 сут представлены на рис. 3. Из этих данных следует, что в контрольных вариантах K_2 и $K_{\text{общ.}}$, в вариантах K_1 и $K_{\text{общ.1}}$ распределения клеток по числу хромосом совпадают (рис. 3, б1—б4, в1, в4, г2, д4). Оценка по критерию χ^2 показала, что $P > 0.05$. Частоты встречаемости клеток с модалным числом хромосом, равным 11, во всех вариантах достоверно не различаются между собой. В связи с отсутствием достоверных различий между контрольными вариантами результаты опытных вариантов ФН

мы будем сравнивать с объединенным контролем К ($K_2 + K_{\text{общ.}}$).

При культивировании клеток в течение 1, 2, 4 и 8 сут на субстрате, покрытом фибронектином, характер распределения клеток по числу хромосом не меняется по сравнению с объединенными контролями: $\chi^2 = 5.8, 5.9, 9.4$ и 4.8 соответственно; $P > 0.05$. Частоты встречаемости клеток с модалным числом хромосом и клеток с меньшими числами хромосом не различаются между опытными и контрольными вариантами (рис. 3, а1—а4, б1—б4, в1, в4).

Анализ распределения индивидуальных хромосом показал, что при культивировании на фибронектине в течение 1, 2, 4 и 8 сут не наблюдается увеличения гетерогенности по частоте встречаемости клеток с основным СВК (2 + 2 + 2 + 2 + 2 + 1) по сравнению с соответствующими контролями. Частота встречаемости клеток с основным СВК составляет в контрольных вариантах $94.2 \pm 0.9\%$, в опытных — $96.5 \pm 1.1\%$. Количество разных типов дополнительных СВК, встречающихся в опытных и контрольных вариантах при культивировании в течение 1, 2, 4 и 8 сут, достоверно не различается. Так, частота встречаемости разных дополнительных СВК через 1 сут составляет 27.2 ± 4.4 (ФН) и $19.0 \pm 2.7\%$ (К), через 2 сут — 21.1 ± 3.4 (ФН) и $20.5 \pm \pm 4.5\%$ (К), через 4 сут — 25.0 ± 4.1 (ФН) и $18.8 \pm 3.1\%$ (К), через 8 сут — 29.0 ± 3.8 (ФН) и $18.8 \pm 3.1\%$ (К).

Таким образом, в отличие от линии NBL-3-17 никаких изменений в характере количественной кариотипической изменчивости в линии NBL-3-11 не обнаружено. Известно, что количественные кариотипические характеристики разных клеточных линий различаются по своей устойчивости к одним и тем же воздействиям. Причем при одинаковых воздействиях количественная кариотипическая изменчивость в клетках линии NBL-3-11 в отличие от линии NBL-3-17 не усиливается (Полянская, Ефремова, 1993, 1994, 1996, 2000; Полянская, Сизова, 1996; Полянская и др., 1998, 2003а). Возможно, это связано с особым характером кариотипической структуры линии NBL-3-11. Так, становление этой постоянной гиподиплоидной клеточной линии обусловлено крайне редким явлением — моносомией по аутосоме. Ранее с использованием цитогенетических методов и полимеразной цепной реакции со случайными праймерами было показано, что кариотипы этих двух линий сходны по первичной структуре ДНК и различаются только по числу гомологичных хромосом (Полянская, 1988; Полянская и др., 2003а). Возможно, гипотриплоидность линии NBL-3-17 способствует большей количественной гетерогенности при стабильных условиях культивирования. Так, в контрольных вариантах отмечено большее количество разных типов дополнительных СВК в этой линии по сравнению с NBL-3-11 (22 и 16% соответственно). Кроме того, в кариотипе NBL-3-17 периодически появляются разные перестроенные хромосомы с невысокой частотой (около 15%). Так, ранее при культивировании этих клеток в определенный отрезок времени наблюдалась хромосома 1 с потерей короткого плеча (Полянская, Дьяконова, 1988); в настоящей работе обнаружен большой субметацентрик, состоящий из длинного плеча хромосомы 1 и короткого плеча X-хромосомы. Ничего подобного в линии NBL-3-11 не наблюдается.

Анализ структурной кариотипической изменчивости в клеточных линиях NBL-3-17 и

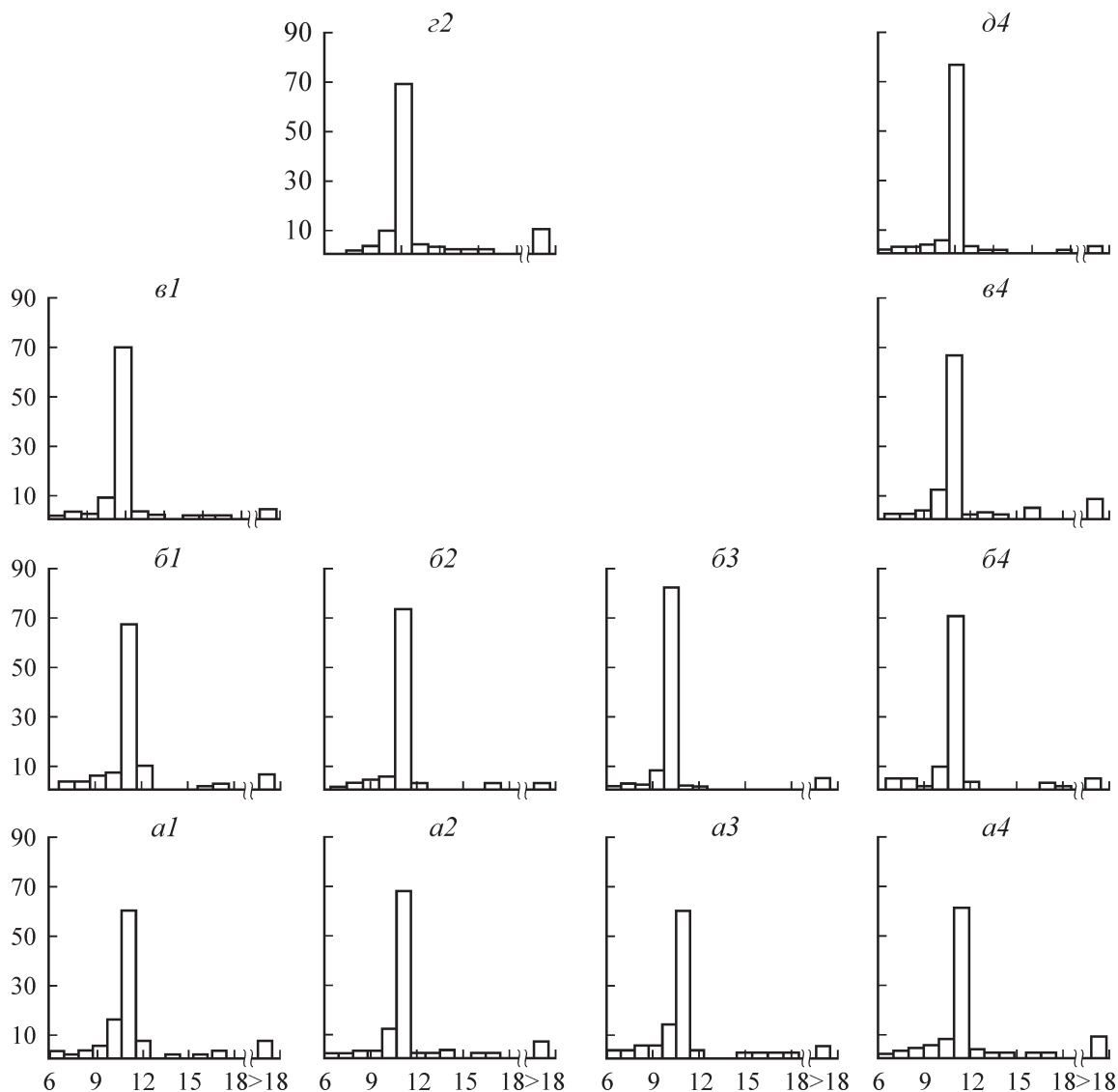


Рис. 3. Распределение по числу хромосом клетки линии NBL-3-11 при культивировании на фибронектиновом субстрате.

По горизонтали — число хромосом в клетке; по вертикали — частота встречаемости клеток, %. Обозначения те же, что и на рис. 2.

NBL-3-11. Количественная и структурная кариотипическая изменчивости взаимосвязаны между собой, являясь составляющими одного процесса — адаптации клеточных популяций к условиям *in vitro*. Структурная изменчивость может способствовать усилению количественной кариотипической гетерогенности клеточной популяции.

Наряду с изучением количественной изменчивости мы провели анализ структурной кариотипической изменчивости при культивировании клеток на фибронектиновом субстрате в течение 8 сут. Поскольку и здесь не оказалось достоверных различий по частоте хромосомных aberrаций между контрольными вариантами, результаты опытных вариантов ФН мы будем сравнивать с объединенным контролем К ($K_2 + K_{обш.}$).

Результаты по исследованию влияния фибронектинового субстрата на структурную кариотипическую изменчивость в клеточной линии NBL-3-17 представлены в табл. 2. Из этих результатов следует, что достоверных различий по частоте хромосомных aberrаций между опытными и контрольными вариантами нет. Установле-

но также, что частота хромосомных aberrаций в вариантах $K_{обш.1}$, K_1 и ФНК соответствует контрольному уровню. Отсутствие усиления структурной кариотипической изменчивости через 1 сут, т. е. в 1-м митотическом цикле, и при дальнейшем культивировании свидетельствует о том, что изменение субстрата не является для этих клеток генотоксическим.

Результаты по исследованию влияния фибронектинового субстрата на структурную кариотипическую изменчивость в клеточной линии NBL-3-11 представлены в табл. 3. Из представленных результатов следует, что в отличие от клеток линии NBL-3-17 при культивировании на фибронектине в течение 1, 2, 4 и 8 сут имеет место достоверное увеличение частоты хромосомных aberrаций по сравнению с соответствующими контролями в среднем в 1.6 раза. Культивирование клеток на гидрофобном субстрате (K_1) не изменило контрольный уровень хромосомных aberrаций. Частота хромосомных aberrаций в варианте $K_{обш.1}$ соответствует контрольному уровню. Из анализа частоты отдельных типов хромосомных aberrаций видно, что почти на всех сроках при

культивировании на фибронектине имеет место превышение частоты хромосомных, хроматидных разрывов и дицентриков (теломерных ассоциаций) над уровнем контроля.

В табл. 4 приведены суммарные данные по частотам хромосомных aberrаций разного типа во все исследованные сроки в линии NBL-3-11. Из приведенных данных следует, что при культивировании клеток на фибронектине в течение 1, 2, 4 и 8 сут частота хромосомных разрывов достоверно увеличивается в 1.5 раза, хроматидных разрывов — в 1.6 раза, а частота дицентриков — в 2.9 раза.

Из всех полученных результатов видно, что в клетках линии NBL-3-11 при отсутствии усиления анеуплоидии при культивировании на фибронектине наблюдается генотоксический эффект уже через 1 сут и продолжается в течение 8 сут. Подобное явление наблюдалось ранее при культивировании клеток NBL-3-11 с генотоксичными дозами ципрофлоксацина и при культивировании на ламининовом субстрате (Полянская, Сизова, 1996; Полянская и др., 2003а, 2003б). Следовательно, в этой клеточной линии не прослеживается взаимосвязь количественной и структурной кариотипической изменчивости, что определяется, по-видимому, особой структурой кариотипа линии (моносомия по аутосоме).

Следует отметить, что нами впервые именно при данном воздействии (культивирование на фибронектине) наблюдалось увеличение частоты дицентриков на основе теломерных ассоциаций (без двойных фрагментов) в клетках NBL-3-11. Систематическое появление дицентриков на основе теломерных ассоциаций при длительном изменении условий культивирования в «безмаркерных» клеточных линиях разного происхождения наблюдалось нами ранее. На основании исследования свойств дицентриков было выдвинуто предположение о том, что биологический смысл этого явления состоит в том, что они обеспечивают образование генетических структур, которые являются одним из способов адаптации «безмаркерных» клеточных популяций к неблагоприятным факторам (Полянская, Вахтин, 2003). Но в

Таблица 2

Влияние фибронектина на частоту хромосомных aberrаций в клеточной линии NBL-3-17

Вариант опыта ^a	Длительность культивирования, сут	Число проанализированных клеток	Частота хромосомных aberrаций разного типа, %, $\bar{x} \pm s_x$
ФН	1	130	24.6 ± 3.8
К		200	17.5 ± 2.7
ФН	2	180	30.0 ± 3.4
К		300	20.0 ± 2.3
ФН	4	210	27.6 ± 3.1
К		250	18.0 ± 2.4
К ₁		100	18.0 ± 3.8
К _{общ.1}		110	20.9 ± 3.9
ФНК	8	110	24.5 ± 2.7
ФН		245	25.3 ± 2.8
К		245	26.4 ± 4.2

^a Варианты опытов см. в табл. 1; К — объединенный контроль (К₂ + К_{общ.}).

клеточной линии NBL-3-11 в отличие от других «безмаркерных» линий при использованных нами воздействиях образования дицентриков не наблюдалось (Полянская, Ефремова, 1996; Полянская, Сизова, 1996; Полянская и др., 2003б). Отсутствие дицентриков в данном случае, возможно, связано с особой структурой кариотипа линии. Подтверждением этому может служить то, что при длительном культивировании этих клеток (в течение 300—500 сут) имеет место значительное увеличение клеток с околотриплоидным и тетраплоидным наборами хромосом и преимущественно именно в таких клетках наблюдается резкое увеличение дицентриков (Levan,

Таблица 3

Влияние фибронектина на частоту хромосомных aberrаций в клеточной линии NBL-3-11

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	120	40.0 ± 4.5 ^a	14.2 ± 3.2	18.3 ± 3.5 ^a	5.0 ± 2.0	2.5 ± 1.4	
К		240	23.3 ± 2.7	13.3 ± 2.2	7.5 ± 1.7	1.2 ± 0.7	1.2 ± 0.7	
ФН	2	160	49.4 ± 4.0 ^a	26.9 ± 3.5	19.4 ± 3.1	1.2 ± 0.9	1.9 ± 1.1	
К ₂		100	35.0 ± 3.8	17.0 ± 3.8	13.0 ± 3.4	3.0 ± 1.7	2.0 ± 1.4	
К _{общ.1}	4	265	35.1 ± 2.9	16.2 ± 2.3	16.2 ± 2.3	2.3 ± 0.9	0.4 ± 0.4	
ФН		130	50.0 ± 4.4 ^a	26.2 ± 3.8	14.6 ± 3.1	8.5 ± 2.4	0.8 ± 0.8	
К		210	28.1 ± 3.1	16.2 ± 2.5	9.0 ± 2.0	2.4 ± 1.0	0.5 ± 0.5	
ФН		8	165	47.9 ± 3.9 ^a	28.4 ± 3.5	15.6 ± 2.8	5.4 ± 1.8 ^a	1.8 ± 1.0
К	205		34.6 ± 3.3	18.5 ± 2.7	15.6 ± 2.5	0.5 ± 0.5	0.0 ± 0.5	
К ₁	115		115	27.0 ± 4.1	14.8 ± 3.3	11.3 ± 3.0	0.9 ± 0.9	0.0 ± 0.8

^a Достоверно отличается от значений в контролях ($P < 0.01$).

Таблица 4

Частота разных типов хромосомных aberrаций в клетках линии NBL-3-11, культивировавшихся на фибронектине в течение 1, 2, 4 и 8 сут

Вариант опыта	Число клеток	Частота хромосомных разрывов, %, $\bar{x} \pm s_x$	Частота хроматидных разрывов, %, $\bar{x} \pm s_x$	Частота дицентриков без двойных фрагментов, %, $\bar{x} \pm s_x$	Частота aberrаций обменного типа, %, $\bar{x} \pm s_x$
ФН	575	23.5 ± 1.8 ^a	17.0 ± 1.6 ^a	4.9 ± 0.9 ^a	1.7 ± 0.5
К	755	16.0 ± 1.3	10.9 ± 1.1	1.7 ± 0.5	0.5 ± 0.2

^a Достоверно отличается от значений в объединенном контроле ($P < 0.01$).

1970). Следовательно, стоит изменить в структуре кариотипа моносомическое состояние аутосомы на дисомическое или более высокое, как она начинает подчиняться установленной закономерности образования дицентриков подобно другим «безмаркерным» линиям, в частности линии NBL-3-17. Возможно, что наблюдаемое нами увеличение частоты дицентриков связано со спецификой конкретного воздействия.

В заключение рассмотрим различия по исследуемым количественным и структурным параметрам в свете кариотипических различий между линиями, т. е. между гипотриплоидом и гиподиплоидом. Из результатов следует, что клетки с основным СВК (3 + 3 + 3 + 3 + 3 + 2) оказались менее устойчивыми к адгезии на фибронектиновом субстрате, чем клетки с основным СВК (2 + 2 + 2 + 2 + 2 + 1). Возможно, это связано с функциональной активностью генов, а именно с дозой генов, ответственных за адгезивные свойства клеток. Изменение дозы генов, вызванное амплификацией отдельных районов хромосом, целых хромосом или всего кариотипа может приводить к изменению экспрессии генов и соответственно синтеза клеточных продуктов. При переводе клеток в условия *in vitro* меняются функции клеток, основной из которых является неограниченная пролиферация. Структура кариотипа клеточных популяций адаптируется к новым условиям, в частности, путем амплификации генетического материала, ответственного именно за те клеточные функции, которые необходимо усилить в условиях *in vitro*. Так, например, длительное культивирование эмбриональных стволовых клеток может приводить к амплификации тех хромосом или их районов, которые связаны с локализацией генов, ответственных за пролиферацию как одно из основных свойств этих клеток (Cowan et al., 2004; Draper et al., 2004; Imreh et al., 2006; Xiao et al., 2006). Образование гипотриплоидной линии NBL-3-17 также связано с усилением генной экспрессии и соответственно с увеличением массы клеточных продуктов, в частности количества белков внеклеточного матрикса и их поверхностных рецепторов. Известно, что эпителиоподобные клетки секретируют преимущественно ламинин, а фибробластоподобные — фибронектин (Домнина, Любимов, 1988). Увеличенная секреция ламинина, на котором должны распластаться эпителиоподобные клетки, с одной стороны, способствует преимущественной адгезии клеток с меньшим числом хромосом и нарушению сегрегации хромосом; с другой стороны, связываясь со специфическими рецепторами ламинина и частично с неспецифическими рецепторами фибронектина, она препятствует существенному нарушению метаболических клеточных процессов, обуславливающих генотоксический эффект.

Другая картина наблюдается в гиподиплоидном варианте. Клетки с основным СВК преимущественно распластываются на фибронектиновом субстрате; при этом количественные характеристики кариотипа не изменяются. Тем не менее секреция ламинина недостаточна для связывания его со специфическими и неспецифическими рецепторами, поэтому имеют место существенные метаболические изменения, приводящие к генотоксическому эффекту. Таким образом, возможно, возникают конкурентные отношения за рецепторное связывание. Существенно подчеркнуть, что усиление генной экспрессии в клетках NBL-3-17 должно происходить именно потому, что имеет место гипотриплоидия (увеличение всего генома на величину гаплоидного набора). Если же возникает амплификация отдельных хромосом или их районов, то не все участвующие в этом процессе гены усиливают экспрессию, так как известно, что гены, участвующие в одном метаболическом пути, могут быть локализованы в разных хромосомах (Оно, 1973; McKusick, 1980; Imreh et al., 2006), часть из которых может не участвовать в процессе амплификации. В связи с этим эффект может получиться обратным или нейтральным. Например, трисомия по хромосомам 7 и 9 в линиях анеуплоидных фибробластов человека приводит к снижению синтеза фибронектина и необратимым изменениям в эмбриональном развитии (Belkin et al., 1985). Полученные ранее результаты (Полянская и др., 2003а, 2003б) по анализу кариотипической изменчивости в линиях NBL-3-17 и NBL-3-11 при культивировании на ламинине укладываются в предложенное объяснение. Наблюдаемый генотоксический эффект в обеих линиях обусловлен избыточной секрецией ламинина, не связывающегося со своими рецепторами и существенно нарушающего клеточный метаболизм. Отсутствие изменений в количественной кариотипической изменчивости в клетках гиподиплоидной линии NBL-3-11 связано с недостаточной секрецией ламинина для существенного изменения количественных характеристик, по-видимому, из-за особенностей кариотипической структуры этой линии.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке комплексной программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-7852.2006.4).

Список литературы

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

ластов 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 изменчивости кариотипа в культивируемых клетках китайского хомячка. Цитология. 8 (2) : 193—201.

Литвинчук Л. Ф., Мамаева С. Е., Ковтунович И. Г., Пинаев Г. П. 1986. Кариотип постоянных клеточных линий. Изменчивость кариотипа M Hela 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 M Hela. Цитология. 28 (2) : 193—203.

Оно С. 1973. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. М.: Мир. 227 с.

Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачева И. В., Пинаев Г. П. 2004. Анализ морфологических особенностей популяции клеток эпидермоидной карциномы A431, 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., Вахтин Ю. Б. 2003. The karyotypic structure of cell populations *in vitro* as integral system. Цитология. 45 (2) : 115—131.

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., Горячая Т. С., Пинаев Г. П. 2005. Влияние иммобилизованного фибронектина на кариотипическую изменчивость в клеточной сублинии фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 47 (10) : 925—932.

Полянская Г. Г., Дьяконова М. Ю. 1988. Влияние условий культивирования на кариотипическую структуру клеточной сублинии почки кенгуровой крысы. Цитология. 30 (11) : 1355—1363.

Полянская Г. Г., Ефремова Т. Н. 1993. Влияние микоплазменной контаминации и деконтаминации с помощью ципрофлоксацина на кариотипическую структуру клеточной линии легкого китайского хомячка V-79. Цитология. 35 (8) : 71—78.

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

Полянская Г. Г., Ефремова Т. Н. 1996. Влияние микоплазменной контаминации двух сублиний клеток почки кенгуровой крысы на кариотипическую структуру. Цитология. 38 (1) : 75—84.

Полянская Г. Г., Ефремова Т. Н. 2000. Влияние микоплазменной контаминации на кариотипическую изменчивость клеточной линии карциномы шейки матки человека M HeLa clone 11. Цитология. 42 (8) : 794—801.

Полянская Г. Г., Ефремова Т. Н., Эндер Н. В. 1998. Влияние микоплазменной контаминации клеточной линии лейомиосаркомы человека SK-UT-1B на кариотипическую структуру. Цитология. 40 (1) : 23—30.

Полянская Г. Г., Сизова Л. С. 1996. Исследование генотоксического влияния ципрофлоксацина на культивируемые клетки почки кенгуровой крысы и фибробласты кожи индийского мунтжака. Цитология. 38 (9) : 958—973.

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 клеток 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 статистическим и роллерным способами. Цитология. 32 (7) : 741—747.

Черепанова О. А., Калмыкова Н. В., Воронкина И. В., Арз А. Ф., Горелик Ю. В., Пинаев Г. П. 2002. Различия в характере взаимодействия нормальных и трансформированных кератиноцитов человека с изоформами ламинина. Цитология. 44 (2) : 151—158.

Ahmed N., Riley C., Rice G., Quinn M. 2005. Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment. Clin. Exp. Metastasis. 22 : 391—402.

Amadori M., Berneri C. 1993. Genotypic and phenotypic changes of BHK-21 cells grown in suspension cultures. Cytotechnology. 11 (Suppl. 1) : S106—S108.

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.

Belkin V. M., Kukharensko V. I., Volodarskaia S. M., Grinberg K. N., Mazurov V. I. 1985. Changes in fibronectin biosynthesis in human embryonic fibroblasts with trisomy for chromosomes 7 and 9. Vopr. Med. Khim. 31 : 125—130.

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.

Cowan C. A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J. P., Wang S., Morton C. C., McMahon A. P., Powers D., Melton D. A. 2004. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. New Engl. J. Med. 350 : 1353—1356.

Crepieux P., Kwon H., Leclerc N., Spencer W., Richard S., Lin R., Hiscott J. 1997. Ikb α physically interacts with a cytoskeleton-associated protein through its signal response domain. Mol. Cell. Biol. 17 : 7375—7385.

Draper J. S., Smith K., Gokhale P., Moore H. D., Maltby E., Johnson J., Meisner L., Zwaka T. P., Thompson J. A., Andrews P. W. 2004. Recurrence gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. 22 : 53—54.

Freeman M. R., Song Y., Carson D. D., Guthrie P. D., Chung L. W. 1991. Extracellular matrix and androgen receptor expression associated with spontaneous transformation of rat prostate fibroblasts. Cancer Res. 51 : 1910—1916.

- Fukumoto S., Yamada Y. 2005. Review: extracellular matrix regulates tooth morphogenesis. *Connect. Tissue Res.* 46 : 220—226.
- Graf J., Ogle R. C., Robey F. A., Sasaki M., Martin G. R., Yamada Y., Kleinma H. K. 1987. A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67.000 laminin receptor. *Biochemistry.* 26 : 6896—6900.
- Imreh M. P., Gertow K., Cederwall J., Unger C., Holmberg K., Szoke K., Csoregh L., Fried G., Dilber S., Blennow E., Ahrlund-Richter L. 2006. *In vitro* culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells. *J. Cell. Biochem.* 99 : 508—516.
- Kato K., Shiga K., Yamaguchi K., Hata K., Kobayashi T., Miyazaki K., Saijo S., Miyagi T. 2006. Plasma-membrane-associated sialidase (NEU3) differentially regulates integrin mediated cell proliferation through laminin- and fibronectin-derived signaling. *Biochem. J.* 394 (Pt 3) : 647—656.
- Klimanskaya I., Chung Y., Meisner L., Johnson J., West M. D., Lanza R. 2005. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet.* 365 : 1636—1641.
- Koenig A., Mueller C., Hasel C., Adler G., Menke A. 2006. Collagen Type 1 induces disruption of E-Cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 66 : 4662—4671.
- Levan G. 1970. Contributions to the chromosomal characterization of the PTK1, rta-kangaroo cell line. *Hereditas.* 64 : 85—96.
- McKusick V. 1980. The anatomy of the human genome. *J. Hered.* 71 : 370—391.
- 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., Hauschaka S. D., von der Mark K. 1988. Laminin alters cell shape and stimulates motility and proliferation and murine skeletal myoblasts. *Develop. Biol. Jap.* 125 : 158—167.
- Paranko J., Pelliniemi L. J., Vaeheri A., Foidart J. M., Lakka-la-Paranko T. 1983. Morphogenesis and fibronectin in sexual differentiation of rat embryonic gonads. *Differentiation.* 23 (Suppl.): S72—S81.
- 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.
- Wang J., Milner R. 2006. Fibronectin promotes brain capillary endothelial cell survival and proliferation through alpha5beta1 and alpha5beta3 integrins via MAP kinase signaling. *J. Neurochem.* 96 : 148—159.
- 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.
- Xiao L., Yuan X., Sharkis J. 2006. Activin A maintains self-renewal and regulates FGF, Wnt and BMP pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 24 : 1476—1486.
- 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.

Поступила 10 VII 2006

THE INFLUENCE OF IMMOBILIZED FIBRONECTIN ON KARYOTYPIC VARIABILITY OF TWO RAT KANGAROO KIDNEY CELL LINES

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 «markerless» Rat kangaroo kidney cell lines NBL-3-17 and NBL-3-11 when cultivating on a fibronectin-coated surface. In cell line NBL-3-17, cultivated on the fibronectin-coated surface for 1, 2, 4 and 8 days, the character of cell distribution for the chromosome number has changed. These changes involve a significant decrease in frequency of cells with modal number of chromosomes, and an increase in frequency of cells with lower chromosomal number. Many new additional structural variants of the karyotype (SVK) appear. The observed alterations seem to be due preference adhesion of cells with lower chromosome number, disturbances of mitotic apparatus and selection of SVK, which are more adopted to changes in culture conditions. Detachment of cells from the fibronectin-coated surface, followed by 5 days cultivation on a hydrophilic surface restored control distribution. In cell line NBL-3-11, cultivated on the fibronectin-coated surface for 1, 2, 4 and 8 days, the character of numerical karyotypic variability did not change compared to control variants. In cell line NBL-3-17 the frequency of chromosomal aberrations under cultivation on the fibronectin-coated surface for 1, 2, 4 and 8 days did not change relative to control variants. In cell line NBL-3-11 the frequency of chromosomal aberrations under the same conditions significantly increases, mainly at the expense of chromosomal, chromatid breaks and dicentrics (telomeric association) relative to control variants. We discuss possible reasons of differences in the character of numerical and structural karyotypic variability between cell lines NBL-3-17 (hypotriploid) and NBL-3-11 (hypodiploid) under cultivation on fibronectin. The reasons of the observed interline karyotypic differences possibly consist in peculiarity of karyotypic structure of cell line NBL-3-11 and in the change of gene expression, namely in a dose of certain functioning genes in the hypotriploid cell line NBL-3-17.