

## ВЛИЯНИЕ *MYCOPLASMA SALIVARIUM* В ОТСУТСТВИИ И В ПРИСУТСТВИИ L-АРГИНИНА НА КАРИОТИПИЧЕСКУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ИНДИЙСКОГО МУНТЖАКА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

© Г. Г. Полянская, Т. Н. Ефремова

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

Исследовано влияние *Mycoplasma salivarium* в отсутствие и в присутствии L-аргинина на количественную и структурную кариотипическую изменчивость в «безмаркерной» клеточной линии фибробластов кожи индийского мунтжака (линии М) при длительном культивировании. Культивирование контаминированных клеток в течение 15 и 30 сут не изменяет распределения клеток по числу хромосом по сравнению с контролем. Распределение клеток по числу хромосом в контаминированных вариантах существенно изменяется при культивировании в течение 60 и 75 сут. Эти изменения связаны с образованием бимодального распределения клеток по числу хромосом за счет снижения частоты клеток с модальным числом хромосом, равным 7, с основным структурным вариантом кариотипа (СВК) 2+2+1+1+1 и увеличения частоты клеток с субмодальным числом хромосом, равным 6, с основным СВК 2+2+1+1. Кроме того, увеличение частоты клеток с меньшими числами хромосом наблюдали только через 60 сут (но не через 75 сут). При культивировании контрольных и контаминированных клеток в среде с повышенным содержанием L-аргинина в течение 60 сут не выявлено изменений по количественным характеристикам по сравнению с контролем. Культивирование контаминированных клеток в течение 60 сут с последующим культивированием их в течение 15 сут в среде с добавлением L-аргинина привело к восстановлению исследуемых количественных параметров до уровня контроля. В контаминированном варианте увеличивается частота хромосомных aberrаций через 30, 60 и 75 сут культивирования по сравнению с контролем и вариантами с добавлением L-аргинина. Через 30 сут наблюдается небольшое, но достоверное повышение уровня хромосомных aberrаций за счет равномерного незначительного повышения частоты всех типов хромосомных aberrаций. Через 60 и 75 сут наблюдается уже значительное повышение уровня хромосомных aberrаций за счет существенного повышения хромосомных и хроматидных разрывов. Кроме того, через 60 сут повышен уровень дицентриков (теломерных ассоциаций), преимущественно образованных хромосомами 1 и 2. Обсуждается роль дицентриков как одного из способов адаптации «безмаркерных» линий к условиям культивирования и роль L-аргинина в восстановлении нормальной кариотипической структуры клеточной популяции линии М, контаминированной микоплазмой.

Ключевые слова: кариотипическая изменчивость, микоплазменная контаминация, L-аргинин, хромосомные aberrации, дицентрики.

Клеточная популяция *in vitro* представляет собой единую автономную систему. Клеточные взаимодействия осуществляются посредством физического контакта между клетками и клеток с субстратом, а также через метаболиты в ростовой среде. Межклеточные контакты осуществляют как структурные, так и функциональные связи между клетками. Важным типом межклеточных соединений являются щелевые контакты, которые составляют основу «метаболической кооперации» (Hooper, Subak-Sharpe, 1981; Шаровская и др., 2009).

Для образования постоянных клеточных линий и их длительного существования вне организма необходима адаптация клеточной линии к условиям *in vitro*. Процесс адаптации, в частности, выражается в образовании сбалансированной кариотипической структуры, обеспечивающей оптимальный генный баланс в клеточной популяции *in vitro* как целостной системе. Сбалансированная ка-

риотипическая структура клеточной линии имеет следующие характеристики: 1) определенный набор маркерных хромосом («маркерные» линии) или соответствие кариотипу донора («безмаркерные» линии); 2) выраженная в большей или меньшей степени частота клеток с модальным числом хромосом; 3) определенная частота клеток с другими числами хромосом; 4) определенные пределы 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, безусловно, являются различные изменения в клеточном метаболизме, обусловленные нарушениями в проведении сигналов с поверхности клеток в ядро.

Известно, что большая часть видов микоплазм, являясь частым контаминантом клеток как в организме, так и вне его, прикрепляется к мембране клетки хозяина, не проникая внутрь, и нарушает целостность мембраны, что вызывает нарушение функционирования мембранных рецепторов, способствующих возникновению цито- и генотоксических эффектов в клетке хозяина. Иногда, не прикрепляясь к мембране, а просто находясь в среде, микоплазмы также приводят к негативным последствиям в клетках. Патогенность микоплазм связана с конкурентным уничтожением микоплазмами некоторых веществ, важных для метаболизма клетки-хозяина (аминокислот, сахаров, нуклеиновых кислот), а также с выделением значительных количеств аммиака и перекиси водорода, токсично действующих на клетку. Микоплазмы, таким образом, способны нарушать обмен аминокислот, синтез белков, препятствовать включению предшественников нуклеиновых кислот в ДНК и РНК, повышать активность ДНКазы и РНКазы и усиливать цитогенетическую нестабильность. Разные микоплазмы имеют разные пути взаимодействия с клеткой-хозяином. В частности, аргининзависимые микоплазмы извлекают энергию для синтеза АТФ в основном из аргинина, уменьшая его количество в клетке-хозяине и тем самым способствуя кариотипической нестабильности (Aula, Nichols, 1967; Борхсениус и др., 2002). Влияние микоплазменной контаминации на цитогенетические процессы подробно исследовали на первичных культурах, а также на немортализованных и иммортализованных клеточных линиях (Fogh, Fogh, 1965, 1967, 1968; Paton et al., 1965; Aula, Nichols, 1967; Stanbridge, 1969; Barile, 1979; Кузмина, 1983; McGarrity et al., 1984; Bastian et al., 1992; Полянская, Ефремова, 1993, 2000; Полянская и др., 1994; Cunha, Takimoto, 1994; Stewart et al., 1994; Rottem, Naot, 1998). Основные цитогенетические изменения связаны с характером анеуплоидии, с частотой полиплоидов, с частотой и типами хромосомных aberrаций, с образованием новых маркерных хромосом, а также с появлением дицентриков, образованных на основе теломерных ассоциаций, что характерно для «безмаркерных» клеточных линий (Полянская, 2000; Полянская, Вахтин, 2003).

Следует отметить, что эффекты, индуцируемые микоплазмами, могут зависеть от трех факторов: длительности контаминации, вида микоплазмы и свойств клеточной культуры. Причем микоплазменная контаминация может в одних случаях индуцировать усиление количественной изменчивости, в других — усиление кластогенного эффекта, а может иметь место и одновременное влияние на обе стороны кариотипической изменчивости (Полянская, 2009).

Ранее было показано, что при контаминации первичной культуры лимфоцитов аргининзависимой *M. salivarium* усиление кариотипической изменчивости имеет место уже через 5 сут (Aula, Nichols, 1967). Причем эти авторы, основываясь на известном механизме влияния аргининзависимой микоплазмы на клетку, связанном с уменьшением количества аргинина, показали, что культивирование контаминированной культуры в присутствии увеличенного количества аргинина не приводит к усилению кариоти-

пической изменчивости по сравнению с интактным контролем. В связи с этими данными, а также с полученными нами ранее результатами о длительной контаминации другими микоплазмами разных постоянных клеточных линий необходимо было выяснить характер влияния *M. salivarium* на кариотипическую структуру постоянной «безмаркерной» клеточной линии при длительном культивировании. Кроме того, необходимо было выяснить роль аргинина в кариотипической изменчивости длительно культивируемой контаминированной клеточной культуры при условии ее адаптации к измененным условиям. Таким образом, задачи настоящей работы заключались: 1) в исследовании влияния *M. salivarium* на кариотипическую изменчивость при длительном культивировании постоянной «безмаркерной» клеточной линии фибробластов кожи индийского мунтжака; 2) в выяснении роли аргинина в характере кариотипической изменчивости.

## Материал и методика

Иммортализованная «безмаркерная» клеточная линия фибробластов кожи индийского мунтжака (линия М) была получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Модальное число хромосом равно 7, что соответствует донору. Клетки культивировали в среде F10 с добавлением 20 % эмбриональной бычьей сыворотки.

Культуру клеток, образовавшую монослой, заражали аргининзависимой микоплазмой *M. salivarium*. Наличие микоплазменной контаминации определяли через 2 пассажа после заражения и при каждой фиксации клеток двумя методами — окрашиванием клеток флуорохромом Хёхстом 33258 (Chen, 1977) и микробиологическим высевом культуральной среды на селективные питательные среды для микоплазм. Титр микоплазмы (КОЕ) определяли при высевах культуральной среды контаминированных клеток на твердый агар PPLO; при первом определении он составлял  $10^5$  КОЕ на 1 мл. В экспериментах использовали L-аргинин в концентрации 40 мкг/мл (Sigma, США). Были проанализированы следующие 5 вариантов: 1) клетки, постоянно культивирующиеся в обычной среде (контроль); 2) клетки, постоянно культивирующиеся в среде с повышенным содержанием L-аргинина; 3) клетки, контаминированные микоплазмой, постоянно культивирующиеся в обычной среде; 4) контаминированные клетки, постоянно культивирующиеся в среде с повышенным содержанием L-аргинина; 5) контаминированные клетки, постоянно культивирующиеся сначала в обычной среде, потом (через 60 сут) в присутствии L-аргинина.

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 0.075 М раствором KCl и фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1). Хромосомы окрашивали водным раствором Гимза (1 : 50). Анализировали распределение клеток по числу хромосом. При изложении результатов приводятся формулы 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. Кариологический анализ проводили через 15, 30, 60 и 75 сут после микоплазменной контаминации, которую начинали

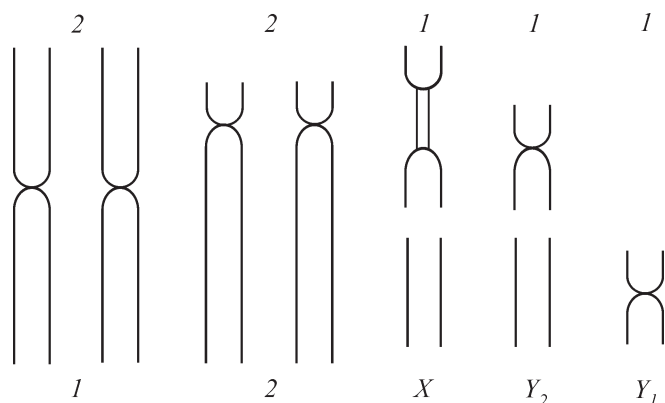


Рис. 1. Основной структурный вариант кариотипа (СВК) клеток линии фибробластов кожи индийского мунтжака  $2 + 2 + 1 + 1 + 1$ .

Внизу: арабские цифры — номера хромосом, латинские буквы — номенклатура половых хромосом; арабские цифры сверху — число гомологичных хромосом одного морфологического типа, составляющих СВК.

через 15 сут после декриоконсервации. В каждом варианте учитывали не менее 100 метафазных пластинок.

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

### Результаты и обсуждение

Анализ количественной кариотипической изменчивости в клеточной линии М. При культивировании контрольных и контаминированных микоплазмой клеток линии М в течение 15 и 30 сут не наблюдается различий в распределении клеток по числу хромосом. На рис. 2, *a1–z1* представлены результаты распределения клеток по числу хромосом в контроле, в контаминированном варианте и в соответствующих вариантах с добавлением в среду L-аргинина при культивировании в течение 30 сут. Во всех 4 случаях модальное число хромосом равно 7; пределы изменчивости составляют 4–12. Оценка по критерию  $\chi^2$  не показала достоверных различий между вариантами. Частоты встречаемости клеток с модальным числом хромосом, равным 7, во всех вариантах достоверно не различаются между собой ( $P > 0.05$ ).

При культивировании клеток в течение 60 сут характер распределения клеток по числу хромосом в контроле и в контаминированном микоплазмой варианте достоверно различается при оценке по критерию  $\chi^2$ , который равен 33.3,  $P < 0.01$  (рис. 2, *a2, в2*). Культивирование контаминированных и неконтаминированных клеток в среде с повышенным содержанием L-аргинина в течение 60 сут не изменяет контрольного уровня распределения клеток по числу хромосом,  $\chi^2$  составляет 4.8 и 5.8 соответственно,  $P > 0.05$  (рис. 2, *б2, з2*). В контаминированном варианте возникает бимодальное распределение клеток по числу хромосом за счет уменьшения частоты клеток с 7 хромосомами по сравнению с контролем ( $33.3 \pm 2.6$  и  $53.7 \pm 3.0$  % соответственно) и увеличения частоты клеток с субмодальным числом хромосом, равным 6 ( $40.9 \pm 2.7$  и  $26.3 \pm 2.6$  % соответственно,  $P < 0.01$ ). Имеет место небольшое преобладание клеток с субмодальным числом хромосом над модальным.

Анализ распределения индивидуальных хромосом показал, что большинство клеток с модальным числом хромосом в опытном и контрольном вариантах имеет основной СВК  $2+2+1+1+1$  (рис. 1), встречающийся с одинаковой частотой (в опыте —  $95.3 \pm 2.0$  и в контроле —  $98.0 \pm 1.1$  %). Большинство клеток с субмодальным числом хромосом имеет основной СВК  $2+2+1+1$ , образованный за счет потери хромосомы  $Y_1$  и встречающийся в обоих вариантах с одинаковой частотой ( $89.0 \pm 2.7$  и  $91.0 \pm 3.3$  % соответственно). Таким образом, соотношение СВК в клетках с модальным и субмодальным числом хромосом не нарушается при микоплазменной контаминации, а изменяется только частота клеток с основными СВК.

В контаминированном варианте наблюдается достоверное увеличение частоты клеток с числами хромосом 4 и 5 по сравнению с контролем ( $12.1 \pm 1.8$  и  $6.0 \pm 1.4$  %,  $P < 0.01$ ), в частности за счет появления новых типов дополнительных СВК. Так, число разных типов дополнительных СВК в контроле составляет 13 ( $4.5 \pm 1.2$  %), а в опыте — 28 ( $8.5 \pm 1.3$  %),  $P < 0.05$ . Следовательно, через 60 сут микоплазменная контаминация приводит к существенному изменению количественных характеристик в линии М. Сходные изменения наблюдались нами ранее при исследовании кариотипической изменчивости при контаминации этой линии другими видами микоплазм: *Mycoplasma arginini* — аргининзависимой и *Acholeplasma laidlawii* — глюкозозависимой (Полянская, Ефремова, 1992). Следует отметить, что изменения в характере анеуплоидии при контаминации одной и той же микоплазмой разных клеток могут быть различными (Полянская, 2009). По-видимому, характер количественной кариотипической изменчивости при микоплазменной контаминации существенно зависит от свойств конкретной клеточной линии.

Повышенное содержание L-аргинина не вызывает изменений в характере количественной кариотипической изменчивости при длительном культивировании неконтаминированных клеток, что свидетельствует об отсутствии его генотоксичного влияния на характер анеуплоидии. Культивирование контаминированных клеток в среде с повышенным содержанием L-аргинина в течение 60 сут нивелирует генотоксичный эффект микоплазмы за счет поддержания оптимального для жизнедеятельности клеток уровня аргинина. Таким образом, в этих условиях клетка и микоплазма развивают симбиотические отношения, комфортные как для клетки, так и для микоплазмы, ибо титр микоплазмы достаточно высокий —  $10^5$  КОЕ на 1 мл.

При культивировании клеток в течение 75 сут характер распределения клеток по числу хромосом в контроле и в контаминированном микоплазмой варианте различается при оценке по критерию  $\chi^2$ , который равен 16.5,  $P < 0.01$  (рис. 2, *a3, в3*). Характер количественных изменений в основном сходен с предыдущим сроком. Так, в контаминированном варианте возникает бимодальное распределение клеток по числу хромосом за счет уменьшения частоты клеток с 7 хромосомами по сравнению с контролем ( $40.7 \pm 2.8$  и  $52.4 \pm 3.4$  % соответственно) и увеличения частоты клеток с субмодальным числом хромосом, равным 6 ( $47.3 \pm 2.9$  и  $32.0 \pm 3.1$  % соответственно,  $P < 0.001$ ). Так же как и на предыдущем сроке, имеет место небольшое преобладание клеток с субмодальным числом хромосом над модальным. Так же как и на предыдущем сроке (60 сут), соотношение СВК в клетках с мо-

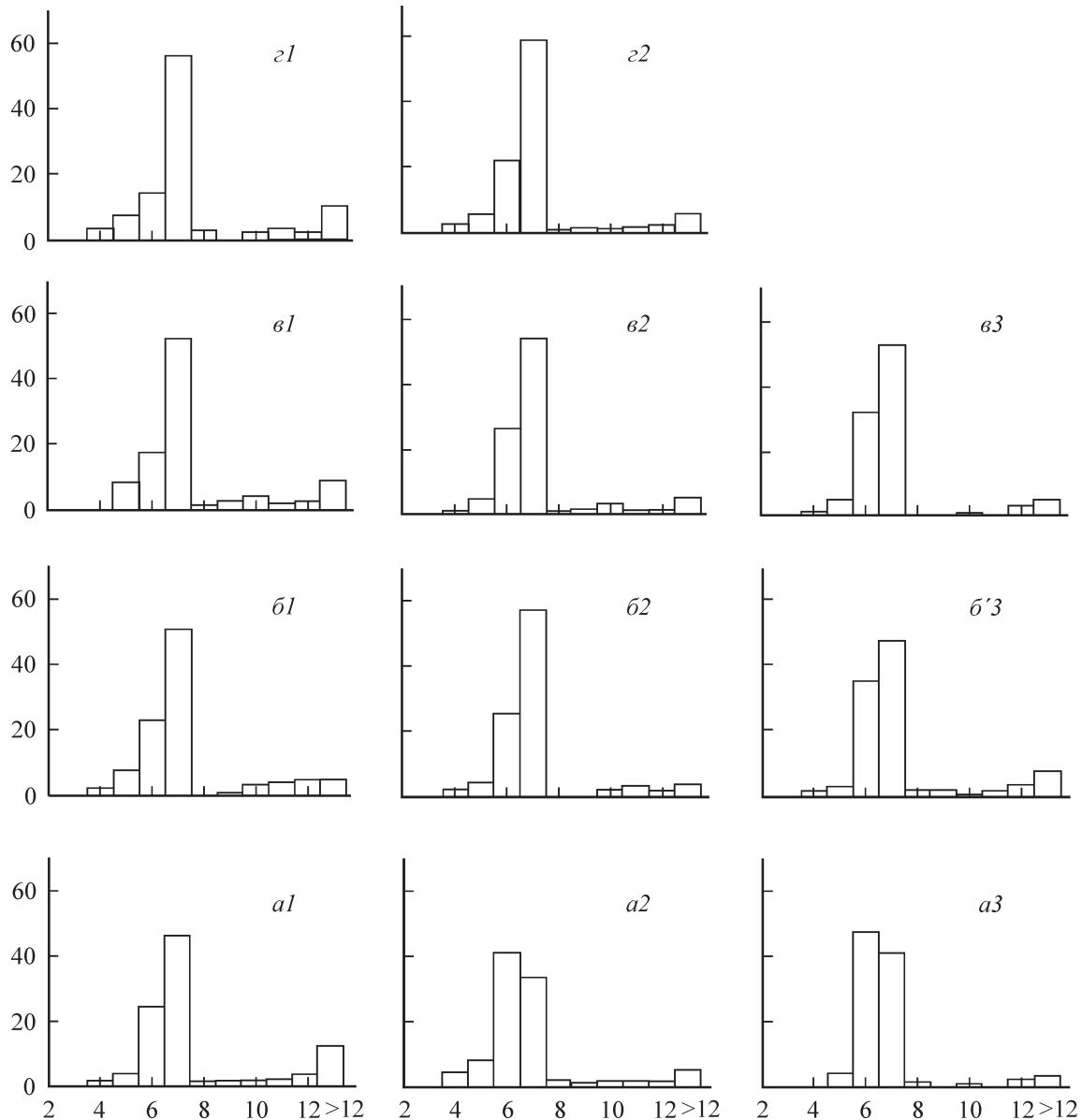


Рис. 2. Распределение по числу хромосом клеток линии М при контаминации *Mycoplasma salivarium* и добавление L-аргинина. По горизонтали — число хромосом в клетке; по вертикали — частота встречаемости клеток, %. Клетки культивировали в течение 30 (*a1—z1*), 60 (*a2—z2*) и 75 (*a3—v3*) сут. *a* — клетки постоянно культивировали с *M. salivarium*; *b* — клетки постоянно совместно культивировали с *M. salivarium* и аргинином, *b'* — клетки культивировали 60 сут с *M. salivarium* при последующем добавлении аргинина на 15 сут; *v* — клетки постоянно культивировали в чистой среде (контроль); *z* — то же, что и *v*, но с добавлением аргинина.

дальним и субмодальным числами хромосом не нарушается при микоплазменной контаминации, а изменяется только частота клеток с основными СВК. Так, основные СВК 2+2+1+1+1 и 2+2+1+1 встречаются с одинаковой частотой (в опыте —  $99.0 \pm 0.9$ ,  $96.5 \pm 1.5$  % и в контроле —  $97.2 \pm 1.6$ ,  $98.0 \pm 1.5$  % соответственно). Тем не менее есть и различия между контаминированными клетками при культивировании в течение 60 и 75 сут. Именно через 75 сут исчезают клетки с 4 и 5 хромосомами. За счет этих изменений различия между распределениями клеток через 60 и 75 сут культивирования носят достоверный характер:  $\chi^2 = 23.7$ ,  $P < 0.01$ . Следовательно, в результате адаптации к измененным условиям при длительном культивировании происходит стабилизация новой цитогенетической структуры в клеточной популяции.

После культивирования контаминированных клеток в течение 60 сут в среду был добавлен L-аргинин, и в этой среде клетки культивировали 15 сут. Из результатов, представленных на рис. 2, *b'3*, *v3*, следует, что в этих условиях распределение клеток по числу хромосом соответствует контролю:  $\chi^2 = 6.1$ ,  $P > 0.05$ . Эти данные свидетельствуют о том, что, несмотря на длительную адаптацию клеточной популяции к существованию в условиях микоплазменной контаминации, введение в среду аргинина довольно быстро привело количественные кариотипические характеристики к уровню контроля. При этом титр микоплазмы составляет  $10^7$  КОЕ на 1 мл.

Существенно обратить внимание на тот факт, что деконтаминация с помощью ципрофлоксацина контаминированных аргининзависимой *M. arginini* разных клеточ-

Таблица 1

Влияние микоплазменной контаминации (*Mycoplasma salivarium*) в отсутствие и в присутствии L-аргинина на частоту хромосомных aberrаций в клеточной линии фибробластов кожи индийского мунджака

Вариант опыта	Длительность культивирования, сут	Число проанализированных клеток	Частота хромосомных aberrаций всех типов ( $\bar{x} \pm s_x$ ), %	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 хромосомных aberrаций обменного типа ( $\bar{x} \pm s_x$ ), %
Контроль	15	195	3.1 ± 1.2	0.5 ± 0.5	2.0 ± 1.0	0.0 ± 0.5	0.5 ± 0.5
Микоплазма	15	222	3.2 ± 1.2	0.4 ± 0.4	1.4 ± 0.8	1.4 ± 0.8	0.0 ± 0.4
Контроль	30	145	3.4 ± 1.5	0.7 ± 0.7	2.1 ± 1.2	1.3 ± 0.9	0.7 ± 0.7
Микоплазма	30	250	10.4 ± 1.9 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.9	3.2 ± 1.1	2.8 ± 1.0	2.0 ± 0.9
Микоплазма+аргинин	30	150	4.0 ± 1.6	0.0 ± 0.6	1.3 ± 0.9	2.0 ± 1.7	0.7 ± 0.7
Контроль+аргинин	30	100	3.0 ± 1.7	0.0 ± 1.0	1.0 ± 1.0	1.0 ± 1.0	1.0 ± 1.0
Контроль	60	285	6.6 ± 2.2	1.0 ± 0.6	1.4 ± 0.7	3.1 ± 1.0	1.0 ± 0.6
Микоплазма	60	330	23.4 ± 2.3 <sup>a</sup>	4.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	6.0 ± 1.3 <sup>a</sup>	12.2 ± 1.8 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.3
Микоплазма+аргинин	60	240	4.6 ± 1.4	0.4 ± 0.4	1.7 ± 0.8	2.5 ± 1.0	0.0 ± 0.4
Контроль+аргинин	60	205	4.6 ± 1.5	0.0 ± 0.5	1.0 ± 0.7	3.8 ± 1.3	0.0 ± 0.5
Контроль	75	220	5.0 ± 1.5	0.0 ± 0.4	3.2 ± 1.2	0.9 ± 0.6	0.9 ± 0.6
Микоплазма	75	300	16.0 ± 2.1 <sup>a</sup>	3.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	9.7 ± 1.7 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.8	1.0 ± 0.6
Микоплазма+аргинин	60+15	415	5.5 ± 1.1	1.4 ± 0.6	2.2 ± 0.7	1.7 ± 0.6	0.2 ± 0.2

<sup>a</sup> Достоверно отличается от контрольных значений ( $P < 0.01$ ).

ных линий не приводит к восстановлению контрольного уровня распределения клеток по числу хромосом. Это явление имеет место даже после длительного культивирования в чистой среде после процесса деконтаминации. Отсутствие микоплазмы было подтверждено микробиологическими тестами (Полянская, Ефремова, 1994; Полянская и др., 1994). Известны также данные о том, что после деконтаминации нескольких клеточных линий эмбриональных фибробластов мыши процесс возврата модальных чисел хромосом к норме составлял от 3 мес до 2 лет (Кузьмина, 1983). Механизмы, работающие в клетках в этих двух экспериментах, абсолютно разные. В одном случае ципрофлоксацин оказывает на микоплазму токсическое действие, в результате которого она погибает. В другом случае микоплазма себя прекрасно чувствует, а добавление аргинина благоприятно воздействует на клетку. В последнем случае клетки, утилизируя аргинин, активно включающийся в метаболические процессы, быстро восстанавливают количественные характеристики, установившиеся в процессе многолетней адаптации к определенным условиям культивирования. Возможно, что наблюдаемые изменения в количественных характеристиках кариотипической структуры не оказывали существенного неблагоприятного влияния на жизненно важные свойства клеточной популяции и оставались в пределах нормы реакции кариотипа, обеспечивающей существование клеточной популяции. В такой ситуации клеточная популяция, отходя от стрессов, связанных с длительной контаминацией и последующей деконтаминацией с помощью антибиотика, постепенно восстанавливает оптимальный характер анеуплоидии.

Анализ структурной кариотипической изменчивости в клеточной линии М. Результаты по исследованию влияния *M. salivarium* в отсутствие и в присутствии L-аргинина на частоту и типы хромосомных aberrаций представлены в табл. 1. При культивировании контаминированных клеток в течение 15 сут не на-

блюдается изменения частоты хромосомных aberrаций по сравнению с интактным контролем. Через 30 сут наблюдается небольшое, но достоверное повышение уровня хромосомных aberrаций по сравнению с контролем ( $P < 0.01$ ) за счет равномерного незначительного повышения частоты всех типов хромосомных aberrаций. Через 60 сут культивирования клеток с микоплазмой наблюдается уже существенное повышение уровня хромосомных aberrаций. Причем имеет место достоверное повышение хромосомных и хроматидных разрывов, а также дицентриков без двойных фрагментов, т. е. теломерных ассоциаций ( $P < 0.01$ ). Культивирование контаминированных и неконтаминированных клеток в среде с повышенным содержанием L-аргинина в течение 60 сут не изменяет контрольного уровня хромосомных aberrаций. При культивировании контаминированных клеток в течение 75 сут сохраняется повышенный уровень хромосомных aberrаций по сравнению с контролем и вариантами с повышенным содержанием L-аргинина в среде ( $P < 0.01$ ). Существенным различием между сроками культивирования 60 и 75 сут является отсутствие в последнем случае повышенной частоты дицентриков по сравнению с контролем. Достоверное увеличение частоты хромосомных aberrаций происходит за счет существенного повышения уровня хромосомных и хроматидных разрывов. Причем частота всех хромосомных aberrаций за исключением дицентриков на обоих сроках культивирования сходна. После культивирования контаминированных клеток в течение 60 сут в среду был добавлен L-аргинин. Через 15 сут после добавления L-аргинина наблюдается снижение частоты всех типов хромосомных aberrаций до уровня контроля.

Ранее было показано, что дицентрики, образованные на основе теломерных ассоциаций, являются характерной чертой кариотипической изменчивости «безмаркерных» клеточных линий при культивировании в разных условиях, включая микоплазменную контаминацию (Levan,

Т а б л и ц а 2

**Влияние микоплазменной контаминации  
на частоту встречаемости индивидуальных хромосом  
в дицентриках**

Хромосома	Частота встречаемости, %	
	контроль <sup>а</sup>	микоплазма
1	80.5 ± 7.1	87.5 ± 5.8 <sup>б</sup>
2	62.0 ± 8.7	53.0 ± 8.8
X	29.0 ± 8.1 <sup>б</sup>	19.0 ± 6.9 <sup>б</sup>
Y <sub>2</sub>	16.0 ± 6.6 <sup>б</sup>	22.0 ± 7.3 <sup>б</sup>
Y <sub>1</sub>	10.0 ± 5.4 <sup>б</sup>	19.0 ± 6.9 <sup>б</sup>

<sup>а</sup> Контроль дополнен всеми вариантами, в которых уровень хромосомных aberrаций, включая дицентрики, соответствует интактному контролю. <sup>б</sup> Достоверно отличается от значений для 2-й хромосомы ( $P < 0.01$ ).

1970; Pillidge et al., 1986; Полянская, 2000; Полянская, Вахтин, 2003; Полянская и др., 2003, 2005, 2007, 2008). Возникающие дицентрики характеризуются, в частности, следующими свойствами: отсутствием постоянной взаимосвязи с другими типами хромосомных aberrаций, наличием определенной количественной динамики, преимущественным образованием их определенными хромосомами. Полученные результаты явились еще одним примером, подтверждающим наличие этих свойств у дицентриков. Так, при анализе 32 дицентриков в контаминированном варианте при культивировании в течение 60 сут показано, что в образовании дицентриков принимают участие преимущественно хромосомы 1 и 2. Остальные хромосомы участвуют в этом процессе реже. Контроль не отличается по данному параметру от опытного варианта. Таким образом, повышенная частота дицентриков при контаминации связана в основном с увеличением частоты дицентриков, образованных именно этими хромосомами (табл. 2). Эти результаты согласуются с ранее полученными при контаминации клеток линии М другими микоплазмами: *Mycoplasma arginini* — аргининзависимой и *Acholeplasma laidlawii* — глюкозозависимой. При других воздействиях в образовании дицентриков также наиболее часто участвуют эти две хромосомы.

Наблюдается неслучайное сочетание хромосом при образовании дицентриков. В контрольном варианте наиболее часто встречается сочетание 1—2 (42 %); значительно реже наблюдаются сочетания 1—1, 1—X, 2—Y<sub>1</sub> (~12 %) и 2—Y<sub>2</sub> (6 %). В контаминированном варианте помимо повышенной частоты встречаемости сочетания 1—2 увеличивается частота дицентриков с сочетаниями хромосом 1—1 (28 %) и 2—Y<sub>2</sub> (16 %). Наблюдается определенная количественная динамика дицентриков, характеризующаяся увеличением частоты дицентриков в контаминированном варианте через 60 сут культивирования и снижением их частоты до контрольного уровня через 75 сут при постоянном увеличении частоты других типов хромосомных aberrаций. Временное увеличение количества дицентриков наблюдалось и при других воздействиях (Levan, 1970; Pillidge et al., 1986; Полянская, Фридлянская, 1991; Полянская и др., 1993, 2005). Совокупность свойств дицентриков позволила предположить, что появление дицентриков в «безмаркерных» линиях связано с созданием генетических структур, обеспечивающих систему адаптации клеточной популяции как целостного об-

разования к неблагоприятным условиям культивирования. Предполагается, что клеточные популяции могут адаптироваться к условиям *in vitro* по крайней мере двумя способами: образованием дицентриков и изменением в регуляции генной активности; стабилизацией определенной цитогенетической структуры в популяции (СВК). Эти способы могут быть как взаимодополняющими, так и взаимозаменяемыми на разных стадиях существования клеточной популяции (Полянская, 2000; Полянская, Вахтин, 2003). Результаты данной работы как раз и подтверждают последнее предположение: через 60 сут культивирования клеток имеют место оба способа адаптации к условиям микоплазменной контаминации; через 75 сут культивирования остается только 2-й способ — стабилизация определенной цитогенетической структуры в популяции (СВК).

Следует подчеркнуть, что в отличие от количественной кариотипической изменчивости деконтаминация с помощью ципрофлоксацина контаминированных микоплазмой разных клеточных линий (Полянская, Ефремова, 1994; Полянская и др., 1994), так же как и добавление L-аргинина в культуральную среду, приводит к нормализации уровня хромосомных aberrаций. По-видимому, для исчезновения кластогенного эффекта достаточно снятия генотоксичного воздействия, независимо от механизма его нивелирования. Ранее было показано на первичной культуре лимфоцитов, что именно недостаток аргинина приводит к генотоксичному эффекту. Возможно, одной из причин является то, что аргинин — один из основных компонентов гистонов, являющихся белками хромосом. Недостаток аргинина нарушает синтез гистонов и приводит к хромосомной нестабильности (Aula, Nichols, 1967).

Работа выполнена при финансовой поддержке Научной программы СПбНЦ РАН.

#### Список литературы

- Борхсениус С. Н., Чернова О. А., Чернов В. М., Вонский М. С. 2002. Микоплазмы. СПб.: Наука. 319 с.
- 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.
- 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-HeLa. Цитология. 28 (2): 193—203.
- 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. 2009. Кариотипическая изменчивость в клеточных линиях и структура кариотипа. В кн.: Клеточные культуры (информ. бюл.). Вып. 24: 15—24.
- 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., Пинаев Г. П. 2003. 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., Горячая Т. С., Пинаев Г. П. 2007. Влияние иммобилизованного фибронектина на кариотипическую изменчивость в клеточных линиях почки кенгуровой крысы. Цитология. 49 (3) : 219—228.
- Полянская Г. Г., Горячая Т. С., Пинаев Г. П. 2008. Влияние иммобилизованного ламинина на кариотипическую изменчивость в двух кариотипически различных вариантах клеточной линии фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 50 (11) : 988—998.
- Полянская Г. Г., Ефремова Т. Н. 1992. Влияние микоплазменной контаминации на кариотипическую структуру клеточной линии индийского мунтжака. Цитология. 34 (3) : 82—88.
- 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. 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., Сизова Л. С., Ефремова Т. Н., Фридлянская И. И. 1994. Цитогенетическое исследование линии клеток легкого китайского хомячка V-79, инфицированной микоплазмой *Mycoplasma arginini* и деконтаминированной с помощью ципрофлоксацина. Цитология. 36 (8) : 880—887.
- Полянская Г. Г., Сизова Л. С., Николаенко Н. С. 1993. Кариотипическая характеристика линии фибробластов кожи индийского мунтжака при культивировании с разными сыворотками. Цитология. 35 (2) : 86—96.
- Полянская Г. Г., Фридлянская И. И. 1991. Изменчивость хромосом индийского мунтжака в гибридах соматических клеток. Цитология. 33 (6) : 86—94.
- Филатов М. В., Котлонова 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.
- Шаровская Ю. Ю., Лагарькова М. А., Киселев С. Л., Чайлахян Л. М. 2009. Исследование диффузионной связи через щелевые контакты в эмбриональных стволовых клетках человека в процессе спонтанной дифференцировки. Докл. РАН. 427 (3) : 407—410.
- Aula P., Nichols W. W. 1967. The cytogenetic effects of mycoplasma in human leukocyte cultures. J. Cell. Physiol. 70 : 281—290.
- Barile M. F. 1979. Mycoplasma-tissue cell interactions. The mycoplasmas. Human and animal mycoplasma. New York: Acad. Press. 2: 500 p.
- Bastian F., Clement W. M., Holbrook W. M. 1992. Eucaryotic chromosome abnormalities secondary to spiroplasma infection. IOM Lett. 2 : 142.
- Chen T. R. 1977. *In situ* detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent HOEHST 33258 stain. Exp. Cell Res. 104 : 255—262.
- Cunha R. A. F., Takimoto M. S. 1994. Clastogenic effects caused by certain serotypes of *Ureaplasma urealyticum* on human chromosomes. IOM Lett. 3 : 643—644.
- Fogh J., Fogh H. 1965. Chromosome changes in PPLO infected FL human amnion cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119 : 233—238.
- Fogh J., Fogh H. 1967. Irreversibility of major chromosome changes in a mycoplasma-modified line of FL human amnion cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126 : 67—74.
- Fogh J., Fogh H. 1968. Karyotypic changes in mycoplasma-modified line of FL human amnion cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129 : 944—950.
- Hooper M. L., Subak-Sharpe J. H. 1981. Metabolic cooperation between cells. Int. Rev. Cytol., 69 : 45—104.
- Levan G. 1970. Contributions to the chromosomal characterization of the PTK1, rat-kangaroo cell line. Hereditas. 64 : 85—96.
- McGarrity G. J., Vanaman V., Sarama J. 1984. Cytogenetic effects of mycoplasma infection of cell cultures: a review. In Vitro. 20 : 1—19.
- Paton G. R., Jacobs I. P., Perkins F. T. 1965. Chromosome changes in human diploid cell cultures infected with *Mycoplasma*. Nature. 207 : 49—51.
- Pillidge L., Musk S. R. R., Jonson R. T., Waldren C. A. 1986. Excessive chromosome fragility and abundance of sister-chromatid exchanges induced by U. V. in an Indian muntjak cell line defective in postreplication (daughter strand) repair. Mutat. Res. 166 : 265—273.
- Rottem S., Naot Y. 1998. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. Trends in Microbiol. 6 : 436—441.
- Stanbridge E., Onen M., Perkins F. T., Hayflick L. 1969. Karyological and morphological characteristics of human diploid cell strain WI-38 infected with mycoplasmas. Exp. Cell Res. 57 : 397—410.
- Stewart S. D., Watson H. L., Cassell G. H. 1994. Investigation of the clastogenic potential of *Ureaplasma urealyticum* on human leukocytes. IOM Lett. 3 : 662—663.

Поступила 28 VI 2010

THE INFLUENCE OF *MYCOPLASMA SALIVARIUM* IN THE ABSENCE AND PRESENCE OF L-ARGININE ON KARYOTYPIC VARIABILITY IN CELL LINE OF THE INDIAN MUNTJAK SKIN FIBROBLASTS UNDER LONG-TERM CULTIVATION

G. G. Poljanskaya, T. N. Efremova

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

The influence of *Mycoplasma salivarium* on the numerical and structural karyotypic variability has been investigated in the «markerless» cell line of the Indian muntjak skin fibroblasts (line M) during long-term cultivation in the absence and presence of L-arginine. Cultivation of the mycoplasma-contaminated cells for 15 and

30 days did not change the character of cell distribution for the chromosome number. In the contaminated cells cultivated for 60 and 75 days, the character of cell distribution for the chromosome number was changed. These changes involved bimodal distribution for the chromosome number due to a significant decrease in the frequency of the cells with the modal number of chromosomes with main structural variant of karyotype (SVK) —  $2 + 2 + 1 + 1 + 1$  and an increase in the frequency of cells with submodal number of chromosomes with main SVK —  $2 + 2 + 1 + 1$ . Besides, a significant increase in the frequency of the cells with lower chromosome number was observed in 60 days compared to that in 75 days of cultivation. Cultivation of the contaminated and control cells in the medium with increased concentration of L-arginine during 60 days did not change the numerical parameters relative to the control. Cultivation of the contaminated cells for 60 days followed by addition of L-arginine for 15 days restored the numerical parameters the numerical parameters to the control level. In the contaminated cells the frequency of chromosomal aberrations significantly increased for 30, 60 and 75 days cultivation relative to the control variant. In 30 days, the small but significant increase took place due to increase in the frequency of chromosomal aberrations of all the types. In 60 and 75 days, a greater increase took place due to a significant increase in the frequency of chromosomal and chromatid breaks. Moreover, in 60 days, the level of dicentrics (telomeric associations) mainly produced by chromosomes 1 and 2 increased significantly. The role of dicentrics as one of the ways for adaptation of the «markerless» cell lines to condition of cultivation and the role of L-arginine in the restoration of normal karyotypic structure of cell population of line M under mycoplasma contamination are discussed.

**Key words:** karyotypic variability, mycoplasma contamination, L-arginine, chromosomal aberrations, dicentrics.

---