

ВЛИЯНИЕ СУБСТРАТА, ВКЛЮЧАЮЩЕГО В СЕБЯ БЕЛКИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА, НА КАРИОТИПИЧЕСКУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В ДВУХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ИНДИЙСКОГО МУНТЖАКА

© Г. Г. Полянская,¹ А. М. Кольцова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ *электронный адрес: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru*

Исследована количественная и структурная карiotипическая изменчивость в безмаркерных постоянных клеточных линиях фибробластов кожи индийского мунтжака — М и МТ — при культивировании на субстрате, который составляют белки внеклеточного матрикса (ВКМ), синтезированные мезенхимными стволовыми клетками человека (SC5-MSK). Показано, что при культивировании клеточной линии М на белках этого ВКМ в течение 1 и 4 сут характер распределения клеток по числу хромосом существенно изменяется по сравнению с контролем, в котором клетки культивировали на гидрофильной поверхности без белкового субстрата. В обоих опытных вариантах изменение распределения клеток по числу хромосом происходит за счет значительного снижения частоты клеток с модальным числом хромосом и увеличения с меньшими числами хромосом; увеличивается количество новых типов дополнительных структурных вариантов кариотипа. При культивировании в этих же условиях клеточной линии МТ, отличающейся от М числом гомологичных хромосом, только через 1 сут культивирования наблюдается изменение характера распределения клеток по числу хромосом по сравнению с контролем. При продолжении культивирования клеток линии МТ на белковом субстрате в течение 4 сут характер распределения клеток по числу хромосом соответствует контролю. Наблюдаемое изменение распределения клеток по числу хромосом происходит за счет значительного снижения частоты клеток с модальным числом хромосом и увеличения с меньшими числами хромосом, подобно линии М. Наблюдаемые изменения, по-видимому, связаны с нарушением правильной сегрегации хромосом в связи с резким изменением условий культивирования. Анализ структурной карiotипической изменчивости выявил увеличение частоты хромосомных aberrаций при культивировании клеток линии М в течение 1 и 4 сут на субстрате ВКМ по сравнению с контрольным вариантом, в частности за счет увеличения частоты дицентриков (теломерных ассоциаций), которые составляют более 50 % всех хромосомных aberrаций. При культивировании в этих же условиях клеток линии МТ увеличения частоты хромосомных aberrаций по сравнению с контролем не обнаружено. Из полученных результатов следует, что разные по структуре кариотипа, но генетически одинаковые по происхождению линии по-разному реагируют на субстрат. Основываясь на быстрой нормализации количественных карiotипических характеристик в линии МТ и отсутствии усиления структурной карiotипической изменчивости, очевидно, что структура кариотипа линии МТ, в отличие от линии М обеспечивает возможность стабильного культивирования клеток МТ на данном белковом субстрате, сохраняя сбалансированную карiotипическую структуру, характерную для линии МТ.

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

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс, К — контроль.

Известно, что клетки в тканях контактируют с сетью макромолекул, образующих внеклеточный матрикс (ВКМ). Матрикс способствует поддержанию многоклеточных структур и создает каркас, внутри которого клетки могут мигрировать и взаимодействовать друг с другом с помощью разных межклеточных контактов. Клеточные популяции в организме преимущественно имеют постоянный кариотип. Тем не менее в организме всегда присутствует карiotипическая изменчивость. Следует отметить, что для популяций соматических клеток *in vivo* частоты мутаций всех типов незначительны. Карiotипическая изменчивость в нормальных клеточных популяциях *in vivo* находится под постоянным контролем интегральных сис-

тем организма — нервной, гормональной и иммунной, а также обусловлена межтканевыми и межклеточными взаимодействиями. Степень карiotипической изменчивости постоянно контролируется стабилизирующим отбором, смысл которого состоит в поддержании нормы над возможными нарушениями.

При переводе клеток в состояние *in vitro* значительно нарушаются условия их существования, и прежде всего исключается контроль со стороны систем организма. Основными типами клеточного взаимодействия в культуре становятся физический контакт между клетками и между клетками и субстратом, а также химическая связь через метаболиты в ростовой среде. Эти взаимодействия

объединяют клетки в единую клеточную популяцию *in vitro*, представляющую собой автономную систему. Межклеточные контакты осуществляют как структурные, так и функциональные связи между клетками. Важным типом межклеточных соединений являются щелевые контакты, которые составляют основу «метаболической кооперации» (Cox et al., 1972; 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 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. Клеточная линия со сбалансированной кариотипической структурой 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.

Так например, известно, что большая часть видов микоплазм прикрепляется к мембране клетки хозяина, не проникая внутрь, нарушает функционирование мембранных рецепторов, что способствует возникновению цито- и генотоксических эффектов в клетке хозяина. Иногда, не прикрепляясь к мембране, а просто находясь в среде, микоплазмы также приводят к негативным эффектам в клетках (Борхсениус и др., 2002). Нами, как и многими другими исследователями, было показано существенное влияние микоплазменной контаминации на кариотипическую изменчивость в разных клеточных линиях (Полянская, Ефремова, 1992, 2000, 2010; Полянская и др., 1998, 2000). Показана важная роль сыворотки как одного из основных компонентов ростовой среды в характере кариотипической изменчивости разных клеточных линий (Исаенко и др., 1990; Полянская и др., 1993). О наличии связи между свойствами клеточной поверхности и кариотипической структурой свидетельствует ряд косвенных данных о влиянии смены способа культивирования клеток (статического, роллерного, суспензионного и монослойного) на структурные и количественные изменения кариотипа клеточной популяции (Nielsen, 1972; Семенова и др., 1984; Литвинчук и др., 1986; Царева и др., 1990; Amadori, Berneri, 1993).

Известно, что клетки растут на субстрате, покрытом ВКМ, состоящим из разных белков, синтезируемых самими клетками. Белки ВКМ взаимодействуют с локализованными на поверхности клеточной мембраны рецепторами — интегринами, связанными с актиновым цитоскелетом. Связывание молекул ВКМ с интегринами ведет к активации локальных белковых киназ, включая фокальную адгезионную киназу, которая активирует внутриклеточные сигнальные пути, способствующие выживанию, миграции, пролиферации, дифференцировке и злокачественной трансформации клеток (Freeman et al., 1991; McKeever et al., 1995; Basson et al., 1996; Stallmach et al., 1996; Blake et al., 1997; Ziober et al., 1999; Aframian et al., 2000; Are et al., 2001; Kiosses et al., 2001; Xu et al., 2001; Ingber., 2002; Mostafavi-Pour et al., 2003; Ahmed et al., 2005; Klimanskaya et al., 2005; Nareyeck et al., 2005; Kato et al., 2006; Koenig et al., 2006; Wang, Milner, 2006; Попов, 2010; Krishnan., 2010; Van Laake et al., 2010; Shiraki et al., 2011). Многочисленные экспериментальные данные делают очевидным наличие функциональной связи между взаимодействием белков ВКМ с рецепторами и кариотипической изменчивостью. Некоторые генетические синдромы, связанные с анеуплоидией по некоторым хромосомам, способствуют нарушению синтеза ВКМ, приводя к спонтанным абортam (Belkin et al., 1985, Delvig et al., 1987; Brand-Sabery et al., 1994). Нарушение экспрессии гена эластина наряду с другими нарушениями приводит к развитию у человека тяжелого синдрома Williams—Beuren (Lacroix et al., 2009).

Показано усиление количественной и структурной кариотипической изменчивости при культивировании клеточных линий разного тканевого происхождения (фибробластоподобные и эпителиоподобные) на поверхности, покрытой отдельными белками ВКМ (Полянская и др., 2002, 2003а, 2003б, 2005, 2007, 2008). Причем характер кариотипической изменчивости при культивировании на фибронектине или ламинине зависит как от разного тканевого происхождения клеточной линии, так и от кариотипической структуры сублиний одного тканевого происхождения (Полянская, 2009). По-видимому, наблюдаемые различия связаны с генетическими особенностями исследуемых клеточных линий.

В связи с этим в настоящей работе исследовали влияние субстрата, включающего в себя не отдельные белки ВКМ, искусственно нанесенные на пластиковую поверхность, а смесь белков ВКМ, синтезируемых мезенхимными стволовыми клетками человека. В составе используемого ВКМ ранее обнаружено большое количество фибронектина и ламинина (Кольцова и др., 2012). Поскольку и сами клетки, культивирующиеся изначально на гидрофильной поверхности, вырабатывают белки ВКМ, на которых они распластаются и функционируют, нам важно было ответить на ряд следующих вопросов, вытекающих из предыдущих исследований. Окажет ли влияние комплексный субстрат, представляющий собой смесь белков ВКМ, на кариотипическую структуру двух безмаркерных линий фибробластов кожи индийского мунджака, различающихся количеством гомологичных хромосом? Окажет ли комплексный субстрат стрессовое воздействие, вызывающее адаптивный ответ кариотипа этих линий, и будет ли оно одинаковым в кариотипически разных линиях?

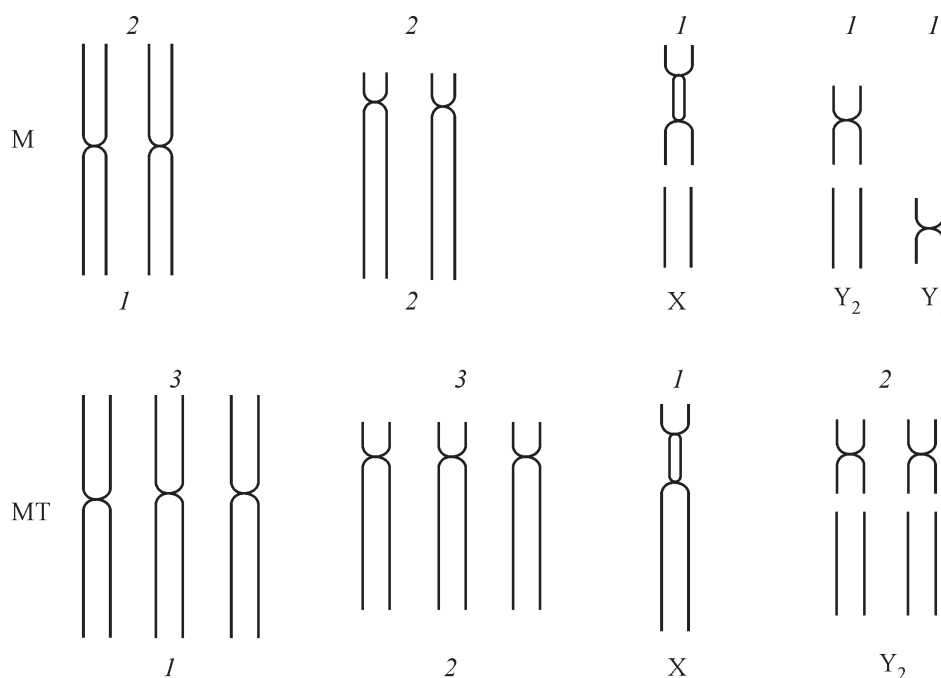


Рис. 1. Основные структурные варианты кариотипов (СВК) клеток линии М (2 + 2 + 1 + 1 + 1) и линии МТ (3 + 3 + 1 + 2). Арабские цифры и буквы под хромосомами — соответственно номера и номенклатура половых хромосом; арабские цифры над хромосомами — число гомологичных хромосом одного морфологического типа, составляющих СВК.

Материал и методика

Иммортализованные безмаркерные линии фибробластов кожи индийского мунджака — М и МТ (сублиния М) — были получены из Российской коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Модальное число хромосом в линии М равно 7. Кариотип идентичен кариотипу донора. Модальное число хромосом в линии МТ равно 9. Кариотип линии МТ отличается от кариотипа донора числом гомологичных хромосом. Клетки культивировали в среде F10 с добавлением 20 % эмбриональной бычьей сыворотки.

ВКМ получали из клеток линии SC5-MSC — фибробластоподобных мезенхимных стволовых клеток человека. Методика была разработана ранее (Кольцова и др., 2012) и состояла в следующем: клетки рассеивали на чашки Петри в концентрации, обеспечивающей плотный монослой, и инкубировали при 5 % CO₂, 37 °С и 90%-ной влажности в течение 2 нед, меняя ростовую среду каждые 3—4 сут. При помощи пипетки отделяли край монослоя от чашки Петри и той же пипеткой аккуратно смывали его с поверхности культурального пластика; поверхность культурального пластика с оставшимися на ней белками ВКМ промывали 2 раза раствором PBS, не содержащим Ca²⁺ и Mg²⁺, высушивали и хранили при –20 °С. Электрофоретический и иммунофлуоресцентный анализ полученного матрикса выявил помимо других белков присутствие фибронектина и ламинина (Кольцова и др., 2012).

Для анализа влияния белков ВКМ на кариотипическую изменчивость клетки из субмонослоя снимали с гидрофильной поверхности пластиковых чашек смесью трипсина (0.25 %) с версеном (0.02 %) в соотношении 1 : 3. После центрифугирования клетки помещали на поверхность, покрытую ВКМ, в бессывороточную среду на 2.5 ч для специфического связывания рецепторов кле-

точной поверхности с белками ВКМ. Затем сливали не прикрепившиеся к поверхности клетки вместе с бессывороточной средой и добавляли среду, содержащую сыворотку, в которой продолжали культивировать клетки в течение 1, 4 и 8 сут. Параллельно анализировали контрольные варианты, в которых клетки культивировали на стандартной гидрофильной поверхности. В качестве контроля использовали клетки, культивировавшиеся на гидрофильной поверхности, предварительно в бессывороточной среде в течение 2.5 ч с последующим культивированием в среде, содержащей сыворотку, и клетки, постоянно культивировавшиеся на гидрофильной поверхности. В связи с отсутствием достоверных различий между контрольными вариантами по исследуемым параметрам опытный вариант сравнивали с объединенным контролем (К). Следует подчеркнуть, что во всех предыдущих исследованиях нами также не было отмечено различий между этими контрольными вариантами (Полянская и др., 2002, 2003а, 2003б, 2005, 2007, 2008).

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), обрабатывали гипотоническим раствором KCl (0.075 M) 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, 1989). Хромосомные aberrации учитывали метафазным методом.

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

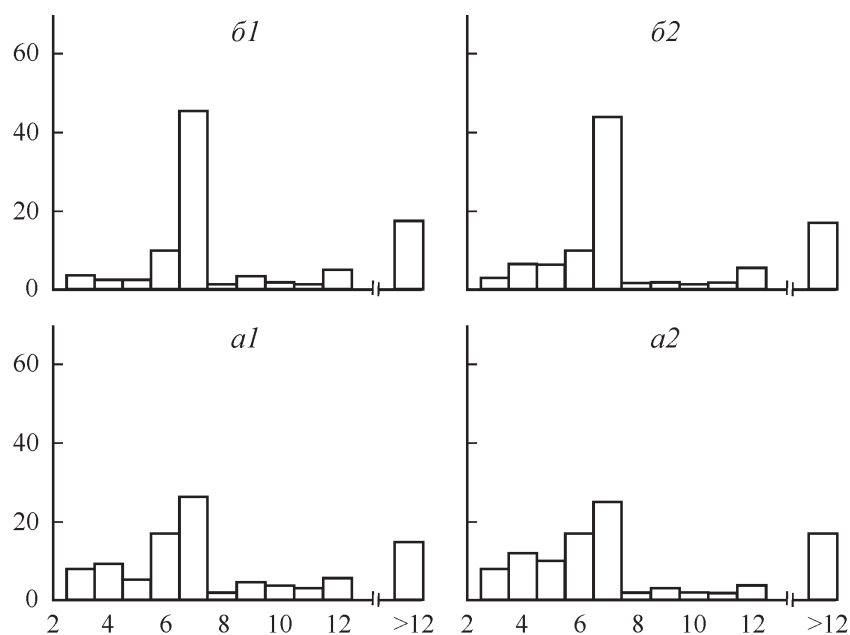


Рис. 2. Распределение клеток линии М по числу хромосом при культивировании на ВКМ в течение 1 (*a1*, *b1*) и 4 (*a2*, *b2*) сут.

По горизонтали — число хромосом в клетке; по вертикали — частота встречаемости клеток, %. *a* — опытный вариант, *b* — контроль.

Результаты и обсуждение

Анализ количественной кариотипической изменчивости в клеточных линиях М и МТ. Результаты по исследованию влияния ВКМ на распределение клеток линии М по числу хромосом при культивировании в течение 1 и 4 сут представлены на рис. 2. Показано, что при культивировании клеток в течение 1 и 4 сут характер распределения клеток по числу хромосом существенно меняется. Оценка с помощью критерия χ^2 показала достоверное изменение распределения клеток

по числу хромосом по сравнению с контролем: через 1 сут $\chi^2 = 36.3$, $P < 0.01$ (рис. 2, *a1*, *b1*); через 4 сут $\chi^2 = 20.3$, $P < 0.01$ (рис. 2, *a2*, *b2*). Результаты по исследованию влияния субстрата из белков ВКМ на распределение клеток по числу хромосом при культивировании в течение 1, 4 и 8 сут в линии МТ представлены на рис. 3. Из результатов следует, что характер распределения клеток по числу хромосом существенно меняется только через 1 сут культивирования. Оценка по критерию χ^2 показала изменение распределения клеток по числу хромосом по сравнению с контролем: $\chi^2 = 14.0$, $P < 0.01$ (рис. 3, *a1*, *b1*).

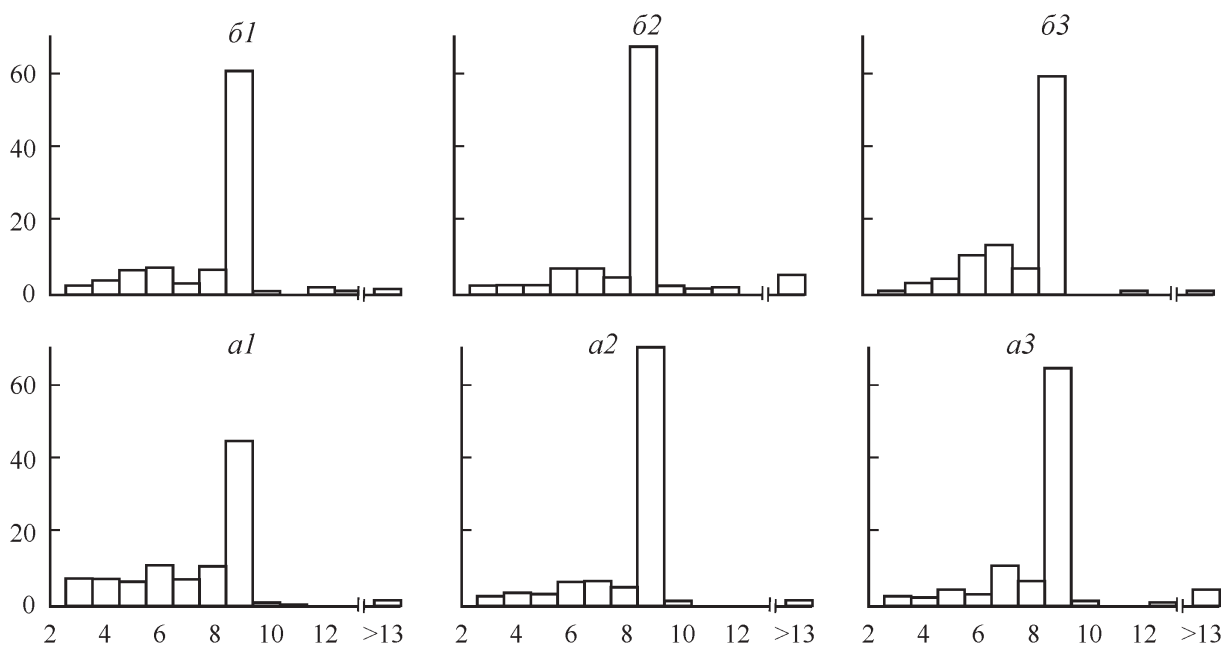


Рис. 3. Распределение клеток линии МТ по числу хромосом при культивировании на ВКМ в течение 1 (*a1*, *b1*), 4 (*a2*, *b2*) и 8 (*a3*, *b3*) сут.

По горизонтали — число хромосом в клетке; по вертикали — частота встречаемости клеток, %. *a* — опытный вариант, *b* — контроль.

Т а б л и ц а 1

Влияние субстрата из белков ВКМ на частоту хромосомных aberrаций в клетках линий фибробластов (М и МТ) кожи индийского мунтжака

Субстрат	Длительность культивирования, сут	Клеточная линия	Число проанализированных клеток	Частота всех ХА, %, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Частота дицентриков без ДФ, %, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
ВКМ	1	М	290	12.1 ± 1.9 ^a	6.9 ± 1.5
К		М	235	5.1 ± 1.4	3.0 ± 1.1
ВКМ	4	М	130	10.8 ± 2.7 ^a	5.4 ± 2.0
К		М	220	3.2 ± 1.2	0.9 ± 0.6
ВКМ	1	МТ	300	6.0 ± 1.4	2.3 ± 0.9
К		МТ	140	3.6 ± 1.6	1.4 ± 1.0
ВКМ	4	МТ	135	5.9 ± 2.0	2.2 ± 1.3
К		МТ	220	5.0 ± 1.5	0.9 ± 0.6
ВКМ	8	МТ	112	4.5 ± 2.0	1.8 ± 1.2
К		МТ	120	3.3 ± 1.6	2.5 ± 1.4

Примечание. ХА — хромосомные aberrации, ДФ — двойные фрагменты. ^a Достоверно отличается от значений в контроле ($P < 0.01$).

При продолжении культивирования в течение 4 и 8 сут различий по распределению клеток по числу хромосом между опытным и контрольным вариантом обнаружено не было: $\chi^2 = 7.4$ и 5.9 соответственно, $P < 0.05$. Изменение распределения клеток по числу хромосом в обеих линиях произошло из-за снижения частоты клеток с соответствующим модальным числом хромосом, которое для линии М равно 7, а для линии МТ — 9 по сравнению с контролем. Так, ее значения составляют: для М через 1 сут — 26.2 ± 2.6 (ВКМ) и 46.0 ± 3.2 % (К), $P < 0.01$; через 4 сут — 24.6 ± 3.8 (ВКМ) и 44.5 ± 3.4 % (К), $P < 0.01$; для МТ через 1 сут — 45.0 ± 2.9 (ВКМ) и 64.1 ± 4.1 % (К), $P < 0.01$. Наблюдаемое снижение клеток с модальным числом хромосом сопровождается увеличением частоты клеток с меньшими числами хромосом в обеих линиях. Так, в линии М увеличена частота клеток с 3—5 хромосомами: через 1 сут — 22.8 ± 2.5 (ВКМ) и 9.8 ± 1.9 % (К), $P < 0.01$; через 4 сут — 30.0 ± 4.0 (ВКМ) и 16.8 ± 2.5 % (К), $P < 0.01$. В структуре кариотипа линии М, как правило, присутствуют клетки с субмодальным числом хромосом, равным 6. Частота клеток с 6 хромосомами тоже имеет тенденцию к увеличению в опытных вариантах, но степень увеличения не достигает достоверного уровня. Тем не менее за счет достоверного снижения клеток с 7 хромосомами и недостоверного с 6 через 4 сут наблюдается бимодальное распределение клеток по числу хромосом, так как частоты клеток с этими числами хромосом достоверно не различаются между собой: 24.6 ± 3.8 и 16.2 ± 3.2 % соответственно, $P > 0.05$.

Анализ распределения индивидуальных хромосом показал, что в линиях М и МТ большинство клеток с модальным числом хромосом в опытных и контрольных вариантах имеет основные СВК — 2+2+1+1+1 (М) и 3+3+1+2 (МТ) (рис. 1), встречающиеся с одинаковой частотой. Так, в линии М суммарно по двум опытным вариантам (1 и 4 сут) — 93.5 ± 2.4 % и по двум контрольным — 96.4 ± 1.3 %. В линии МТ частоты встречаемости основного СВК — 98.4 ± 1.1 (СВК) и 98.8 ± 1.2 % (К). Следовательно, усиления гетерогенности в клетках с модальным числом хромосом при культивировании на субстрате ВКМ в течение 4 сут (линия М) и 1 сут (линия МТ)

по сравнению с контролями не происходит. Усиление гетерогенности наблюдается в клетках с немодальными числами хромосом, которые меньше модальных. Так, в линии М при анализе одинакового числа клеток при культивировании на ВКМ в течение 1 и 4 сут возникают новые типы дополнительных СВК. В клетках с 3—5 хромосомами в контроле обнаружено 26 типов дополнительных СВК, тогда как в опыте — 50.

Усиление гетерогенности имеет место и в клетках с субмодальным числом хромосом, равным 6. В контроле обнаружено 6 типов дополнительных СВК, из которых один СВК (2+2+1+1) является преобладающим и составляет 74.0 ± 7.0 %, а в опыте — 15 типов СВК, из них один (2+2+1+1) также является преобладающим с частотой 63.4 ± 6.0 %. В линии МТ в клетках с немодальными числами хромосом от 3 до 8, подобно линии М, при культивировании в течение 1 сут в контроле обнаружено 34 типа дополнительных СВК, тогда как в опыте — 58. Наблюдаемые изменения в распределении клеток по числу хромосом совпадают с ранее полученными результатами при культивировании этих клеток на отдельных белках ВКМ (Полянская и др., 2002, 2005, 2008). По-видимому, перевод клеточных популяций линий М и МТ на субстрат ВКМ является стрессовым воздействием, которое через взаимодействия белков ВКМ с поверхностными рецепторами запускает метаболические процессы, нарушающие правильную сегрегацию хромосом и способствующие образованию новой, адаптивной, сбалансированной кариотипической структуры. Большое количество новых дополнительных СВК свидетельствует об усилении процессов, способствующих нарушению сегрегации хромосом. Есть ряд данных о взаимосвязи между белками ВКМ, анеуплоидией и функциональным состоянием микротрубочек, которое может косвенно свидетельствовать о возможной зависимости стабильности кариотипической структуры от взаимодействия белков ВКМ с рецепторами (Фрейдин и др., 1988; Brand-Saberi et al., 1994; Mooney et al., 1994; Домнина и др., 1996; Carver, 1998; Zhou, Rabinovitch, 1998; Tang, Goldberg, 2000; Putnam et al., 2001; Sablina et al., 2001; Vogel et al., 2011).

Таблица 2

Типы кариотипической изменчивости в разных клеточных линиях при культивировании на разных субстратах

Субстрат	Клеточная линия	Анеуплоидия	Хромосомные aberrации	Дицентрики (теломерные ассоциации)	Источник данных
Ламинин 2/4	М	+	—	—	Полянская, 2009
	МТ	+	—	—	
	МТ ^а	—	—	+	
	NBL-3-17	+	+	+	
	NBL-3-11	—	+	+	
Фибронектин	МТ	+	—	+	То же
	NBL-3-17	+	—	—	
	NBL-3-11	—	+	+	
ВКМ	М	+	+	+	Настоящая работа
	МТ	+	—	—	

Тем не менее кроме сходства влияния отдельных белков ВКМ и их смеси наблюдаются и различия. Они касаются различий между линиями по длительности ответа на замену субстрата. Так, для линии М при культивировании в течение 4 сут имело место стабильное изменение распределения клеток по числу хромосом по сравнению с контролем. В отличие от линии М в линии МТ изменение распределения клеток по числу хромосом имело место только при культивировании в течение 1 сут, а при более длительном (4 и 8 сут) различий между опытным и контрольным вариантами не было. Таким образом, уже через 4 сут происходит нормализация этого параметра, и при продолжении культивирования на ВКМ он не отличается от количественной характеристики, свойственной этой линии. По-видимому, для линии МТ адаптация клеток к новому субстрату ВКМ происходит быстрее, чем для линии М. При этом в процессе адаптации не наблюдается возникновения новой, адаптивной, сбалансированной кариотипической структуры по сравнению с клетками линии МТ, культивируемой на обычном гидрофильном пластике. Таким образом, очевидно, что структура кариотипа линии МТ в отличие от линии М обеспечивает возможность культивирования клеток МТ на данном белковом субстрате, обеспечивая поддержание характерной для линии МТ сбалансированной кариотипической структуры. Следует подчеркнуть, что культивирование линии МТ на фибронектине в течение 8 сут не приводит к нормализации распределения клеток по числу хромосом (Полянская и др., 2005).

Анализ структурной кариотипической изменчивости в клеточных линиях М и МТ. Количественная и структурная кариотипическая изменчивость взаимосвязаны между собой, являясь составляющими одного процесса — адаптации клеточных популяций к условиям *in vitro*. Основываясь на целостности процесса адаптации клеточных культур *in vitro*, мы провели исследование структурной кариотипической изменчивости в опытных и контрольных вариантах клеток линий М и МТ.

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что при культивировании на субстрате ВКМ клеток линии М через 1 и 4 сут имеет место достоверное увеличение частоты хромосомных aberrаций в 2.4 и 3.4 раза соответственно по сравнению с контролем. Увеличение количества хромосомных aberrаций происходило в основном за счет хромосомных разрывов, aberrаций обменного типа и дицентриков без двойных фрагментов (теломерных ас-

социаций), причем доля дицентриков составила 50 и 57 % соответственно. Следует подчеркнуть, что при анализе каждого срока в отдельности наблюдается тенденция к увеличению частоты дицентриков ($P < 0.05$). А при суммировании количества дицентриков по обоим срокам культивирования имеет место увеличение их частоты по сравнению с контролем (6.4 ± 1.2 и 1.8 ± 0.6 соответственно, $P < 0.01$). Ранее было показано, что в образовании дицентриков принимают участие определенные хромосомы и их сочетания (Полянская, 2000; Полянская, Вахтин, 2003; Полянская и др., 2003б, 2005, 2007, 2008). Подобный результат наблюдается и в настоящем исследовании. Частота участия хромосом в образовании дицентриков следующая (%): хромосома 2 — 63.0, хромосома X — 44.5, хромосома 1 — 44.5, хромосома Y₂ — 7.4, хромосома Y₁ — 3.7. Наиболее часто встречаются три сочетания хромосом в дицентриках: 2 + X (26.0 %), 1 + 2 (18.5 %) и 1 + 1 (14.8 %).

Из данных, представленных в табл. 2, также следует, что при культивировании на субстрате ВКМ клеток линии МТ в течение 1, 4 и 8 сут никаких различий ни по общей частоте хромосомных aberrаций, ни по частоте дицентриков между опытными и контрольными вариантами не обнаружено.

На основе многочисленных исследований свойств дицентриков, представляющих теломерные ассоциации, нами был сделан вывод о том, что их возникновение является ответом клеточной популяции на неблагоприятные, измененные условия культивирования. Дицентрики, подобно анеуплоидии, в безмаркерных клеточных линиях являются способом адаптации клеточной популяции к изменяющимся условиям *in vitro*, так как способствуют изменению генной экспрессии, причем эти способы могут быть как взаимодополняющими, так и взаимозаменяемыми на разных стадиях существования клеточной популяции одной линии или клеточных популяций разных линий (Полянская, Вахтин, 2003; Полянская, 2009). Особый интерес представляют различия в характере кариотипической изменчивости в клеточных линиях, имеющих одинаковое происхождение, но разную кариотипическую структуру. К этим линиям, в частности, относятся безмаркерные линии фибробластов кожи индийского мунджака (М, МТ и МТ^а) и почки кенгуровой крысы (NBL-3-17 и NBL-3-11), различающиеся между собой по числу гомологичных хромосом. В табл. 2 приведены

типы кариотипической изменчивости при культивировании клеток разных линий на разных субстратах.

Таким образом, из приведенных данных следует, что существует зависимость между конкретной кариотипической структурой и характером кариотипической изменчивости. Полученные данные свидетельствуют о том, что разные по структуре кариотипа, но генетически одинаковые по происхождению линии по-разному реагируют на предлагаемый клеткам субстрат. Одно и то же воздействие может по-разному влиять и на другие свойства клеток в разных линиях. Отсутствие усиления структурной кариотипической изменчивости при культивировании клеток линии МТ на субстрате, состоящем из белков ВКМ, в отличие от линии М подтверждает предположение об оптимальности этого субстрата для линии МТ. Возможно, что наблюдаемые межлинейные различия связаны с разной структурой кариотипа. Именно в линии МТ по сравнению с линией М увеличена доза многих генов, обусловленная трисомией или дисомией по ряду хромосом. Ранее нами были показаны подобные межлинейные различия по характеру кариотипической изменчивости при культивировании на ламинине и фибронектине в клеточных линиях почки кенгуровой крысы, различающихся по количеству гомологичных хромосом (Полянская и др., 2003а, 2003б, 2007). Таким образом, несмотря на выработку самими клетками белков ВКМ, культивирование разных по структуре кариотипа клеточных линий на субстрате ВКМ, синтезированном мезенхимными стволовыми клетками, приводит к существенным межлинейным различиям по характеру кариотипической изменчивости.

Следует обратить внимание, что используемый в работе ВКМ оптимален для длительного культивирования ЭСК человека (Кольцова и др., 2012). Известно, что сами ЭСК экспрессируют недостаточное количество белков ВКМ для поддержания их на гидрофильном пластике. Большинство же других клеточных линий, включая линии М и МТ, экспрессируют достаточное количество белков ВКМ, создавая возможность для клеток прикрепляться, распластываться на гидрофильном субстрате и активно пролиферировать. Тем не менее клетки линии МТ, быстро минув стрессовую ситуацию, связанную со сменой субстрата, продолжают успешно пролиферировать на субстрате ВКМ. Это может свидетельствовать о том, что в МТ, несмотря на избыток белков ВКМ, создается равновесие между взаимодействием белков ВКМ с соответствующими рецепторами (интегринами) и последующими метаболическими процессами, обеспечивающими нормальные стабильные количественные и структурные кариотипические характеристики, свойственные этой линии. Надо отметить, что при культивировании клеток МТ на субстрате, состоящем только из фибронектина, имело место существенное усиление как количественной, так и структурной кариотипической изменчивости (Полянская и др., 2005).

Работа выполнена при финансовой поддержке Научной программы СПбНЦ 2012—2013 гг.

Список литературы

- Борхсениус С. Н., Чернова О. А., Чернов В. М., Вонский М. С. 2002. Микоплазмы. СПб.: Наука, 319 с.
- Домнина Л. В., Иванова О. Ю., Васильев Ю. М. 1996. Влияние микротрубочек на морфологию монослоя фибробластов и его внеклеточный матрикс. Цитология. 38 (3) : 300—304.

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

Исаенко А. А., Немцов Ю. В., Царева А. А. 1990. Исследование кариотипа клеток почки африканской зеленой мартышки линии 4647, длительно культивируемых в средах с различными сыворотками. Цитология. 32 (7) : 736—740.

Кольцова А. М., Воронкина И. В., Гордеева О. Ф., Зенин В. В., Лифанцева Н. В., Мусорина А. С., Смагина Л. В., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2012. Разработка новой бесфидерной системы и характеристика полученных в ней сублиний эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании. Цитология. 54 (8) : 637—651.

Литвинчук Л. Ф., Мамаева С. Е., Ковтунович И. Г., Пинаев Г. П. 1986. Кариотип постоянных клеточных линий. Изменчивость кариотипа М-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 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. 1989. Влияние условий культивирования на кариотипическую структуру двух клеточных сублиний фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 31 (7) : 807—817.

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 (информационный бюллетень). 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., 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., 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. 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. 2010. Влияние *Mycoplasma salivarium* в отсутствие и в присутствии L-аргинина на кариотипическую изменчивость в клеточной линии фибробластов кожи индийского мунтжака при длительном культивировании. Цитология. 52 (12): 997—1004.
- Полянская Г. Г., Ефремова Т. Н., Сакута Г. А. 2000. Влияние микоплазменной контаминации клеточной линии легкого эмбриона человека MRC-5 на кариотипическую изменчивость. Цитология. 42 (2): 190—195.
- 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., Николаенко Н. С. 1993. Кариотипическая характеристика линии фибробластов кожи индийского мунтжака при культивировании с разными сыворотками. Цитология. 35 (2): 86—96.
- Попов Б. В. 2010. Введение в клеточную биологию стволовых клеток. СПб.: СпецЛит. 319 с.
- 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.
- Фрейдлин М. И., Соловьева Н. В., Кухаренко В. И., Дельвиг А. А. 1988. Секретия 14C-проколлагена эмбриональными фибробластами человека с диплоидным и трисомным набором хромосом. Вопр. мед. химии. 34 (2): 72—75.
- Царева А. А., Исаенко А. А., Урманова М. А., Юрченко М. Д., Балзовская Е. Г., Родионова М. О. 1990. Исследование кариотипа клеток линии Vero, длительно культивируемых в монослое статическим и роллерным способами. Цитология. 32 (7): 741—747.
- 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.
- Aframian D. J., Cukierman E., Nikolovski J., Mooney D. J., Yamada K. M., Baum B. J. 2000. The growth and morphological behavior of salivary epithelial cells on matrix protein-coated biodegradable substrata. Tissue Eng. 6: 209—216.
- 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.
- 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 embryonal 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.
- Brand-Saberi B., Epperlein H. H., Ramonos G. E., Christ B. 1994. Distribution of extracellular matrix components in nuchal skin from fetuses carrying trisomy 18 and trisomy 21. Cell Tissue Res. 277: 465—475.
- Carver W. 1998. Abnormal interactions of embryonic mouse trisomy 16 heart fibroblasts with extracellular matrix components *in vitro*. Cell Adhes. Commun. 61: 1—11.
- Cox R. P., Krauss M. R., Balis M. E., Dancis J. 1972. Communication between normal and enzyme — deficient cells in tissue culture. Exp. Cell Res. 74: 251—268.
- Delvig A. A., Kukharensko V. I., Belkin V. M., Mazurov V. I., Grinberg K. N., Debov S. S. 1987. Collagen and fibronectin synthesis by trisomic fibroblasts from human spontaneous abortions. Mol. Gen. Genet. 209: 592—595.
- 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.
- Hooper M. L., Subak-Sharpe J. H. 1981. Metabolic cooperation between cells. Int. Rev. Cytol. 69: 45 — 104.
- Ingber D. E. 2002. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. Circ. Res. 91: 877—887.
- 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.
- Kiosses W. B., Hahn K. M., Giannelli G., Quaranta V. 2001. Characterization of morphological and cytoskeletal changes in MCF10A breast epithelial cells plated on laminin-5: comparison with breast cancer cell line MCF7. Cell Commun. Adhes. 8: 29—44.
- 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.
- Krishnan J. A. 2010. Effect of matrix composition on differentiation of nestin-positive neural progenitors from circulation into neurons. J. Neural Eng. 7: 036009.
- Lacroix A., Pezet M., Capel A., Bonnet D., Hennequin M., Jacob M. P., Bricca G., Couet D., Faury G., Bernicot J., Gilbert-Dussardier B. 2009. Williams—Beuren syndrome: a multidisciplinary approach. Arch. Pediatr. 163: 273—282.
- McKeever P. E., Varani J., Papadopoulos S. M., Wang M., McCoy J. P. 1995. Products of cells from gliomas: IX. Evidence that two fundamentally different mechanisms change extracellular matrix expression by gliomas. J. Neurooncol. 24: 267—280.
- Mooney D. J., Hansen L. K., Langer R., Vacanti J. P., Ingber D. E. 1994. Extracellular matrix controls tubulin monomer levels in hepatocytes by regulating protein turnover. Mol. Biol. Cell. 5: 1281—1288.
- 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.
- Nareyeck G., Zeschnigk M., von der Haar D., Schilling H., Bornfeld N., Anastassiou G. 2005. Differential expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 3 in uveal melanoma. Ophthalmic Res. 371: 23—28.
- 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.
- Putnam A. J., Schultz K., Mooney D. J. 2001. Control of microtubule assembly by extracellular matrix and externally applied strain. Amer. J. Physiol. 280 (3): C556—C564.

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.

Shiraki N., Yamazoe T., Qin Z., Ohgomori K., Mochitate K., Kume K., Kume S. 2011. Efficient differentiation of embryonic stem cells into hepatic cells *in vitro* using a feeder-free basement membrane substratum. *PLoS ONE*. 6 (8) : e24228.

Stallmach A., von Lampe B., Orzechowski H. D., Matthes H., Riecken E. O. 1994. Increased fibronectin-receptor expression in colon carcinoma-derived HT 29 cells decreases tumorigenicity in nude mice. *Gastroenterology*. 106 : 19—27.

Tang D., Goldberg D. J. 2000. Bundling of microtubules in the growth cone induced by laminin. *Mol. Cell Neurosci*. 15 : 303—313.

Van Laake L. W., van Donselaar E. G., Monshouwer-Klots J., Schreurs C., Passier R., Humbel B. M., Doevendans P. A., Sonnenberg A., Verkleij A. J., Mummery C. L. 2010. Extracellular matrix formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Mol. Life Sci*. 67 : 277—290.

Vogel B. E., Wagner C., Paterson J. M., Xu X., Yanowitz J. L. 2011. An extracellular matrix protein prevents cytokinesis failure and aneuploidy in the *C. elegans* germline. *Cell Cycle*. 10 : 1916—1920.

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.

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 Biotechnol*. 19 : 971—974.

Zhou B., Rabinovitch M. 1998. Microtubule involvement in translational regulation of fibronectin expression by light chain 3 of microtubule-associated protein 1 in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res*. 83 : 481—489.

Ziobar B. L., Chen Y. Q., Ramos D. M., Waleh N., Kramer R. H. 1999. Expression of the $\alpha 7 \beta 1$ Laminin receptor suppresses melanoma growth and metastatic potential. *Cell Growth Differentiation*. 10 : 479—490.

Поступила 11 III 2013

THE INFLUENCE OF SUBSTRATE FROM EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS
ON KARYOTYPIC VARIABILITY OF THE INDIAN MUNTJAC SKIN FIBROBLAST
TWO CELL LINES

G. G. Poljanskaya,¹ A. M. Koltsova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru

The effect of cell culture conditions on numerical and structural karyotypic variability was investigated in two Indian muntjac skin fibroblast «markerless» cell lines, M and MT. The cells cultivated on the substrate consisting of extracellular matrix proteins (ECM), synthesized by human mesenchymal stem cells (SC5-MSC). The character of cell distribution for chromosome number of cell line M changed after cultivation for 1 and 4 days as compared to control cells, which were cultured on hydrophilic surface without ECM-coating. These changes involve a significant decrease in frequency of cells with modal numbers of chromosomes and an increase in frequency of cells with lower chromosome numbers. Many new types of additional structural variants of the karyotype (SVK) appear. MT cell line, differing from M line in the number of homologous chromosomes, demonstrated similar with M line the character of cell distribution for chromosome number only for 1 day after cultivating on the ECM-substrate, but not after 4 days in the same culture conditions, no difference from the control cells was observed. The observed alterations seem to be due to disturbances in correct chromosome segregation process, which were caused by abrupt shift in the cell culture conditions. The analysis of the structural karyotypic variability revealed significant increase in frequency of chromosomal aberrations in M cell line for 1 and 4 days in culture on the ECM-substrate as compared to the control cells. The frequency of dicentric chromosomes (telomeric associations) was increased and constituted more than 50 % of all chromosome aberrations. No increase in frequency of chromosome aberrations was observed for MT cells cultured in the same conditions. The obtained results show that the cell lines of the same origin but of different karyotypic structure react to substrate in a different way. In contrast to M line, in MT line a fast normalization of numerical karyotypic characteristics and no enhancement of structural karyotypic variability takes place. This provides a possibility to cultivate MT cell on the given protein substrate maintaining a balanced karyotypic structure characteristic of MT cell line.

Key words: karyotypic variability, cell line, extracellular matrix, structural variants of the karyotype, chromosomal aberrations, dicentric chromosomes.