

СОДЕРЖАНИЕ ДНК В ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ХРОМОСОМАХ НОРМАЛЬНОГО КАРИОТИПА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА И ХРОМОСОМАХ ПОСТОЯННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ХОМЯЧКА CHL V-79 RJK И Vebr-5

© Н. А. Агафонова,¹ Т. М. Гринчук,¹ В. П. Кораблев,² Ю. М. Розанов,¹
Г. А. Сакута,¹ М. А. Шилина,¹ Г. И. Штейн,¹ Б. Н. Кудрявцев^{1,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и

² Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток;

* электронный адрес: bn_kudryavtsev@mail.ru

С помощью проточной цитометрии и микрофлуориметрии определены размер генома китайского хомячка *Cricetulus griseus*, а также абсолютное и относительное содержание ДНК в его отдельных хромосомах и в хромосомах трансформированных клеточных линий китайского хомячка V-79 RJK и Vebr-5 после длительного культивирования. Показано, что размер генома у самцов и самок китайского хомячка составляет 6.660 и 6.746 пг соответственно. Содержание ДНК в хромосомах изученных клеточных линий значительно отличалось от содержания ДНК в соответствующих хромосомах нормального кариотипа китайского хомячка. В ходе длительного культивирования клеток изменения содержания ДНК в некоторых хромосомах обеих клеточных линий (как правило, в сторону увеличения) достигали 20—25 %. Уровень амплификации ДНК в р-плече хромосомы Z₆, зарегистрированный в начале нашего эксперимента, в ходе дальнейшего культивирования клеток (более чем за 20 лет) оставался стабильным. Полученные данные позволяют заключить, что опухолевая трансформация и последующая адаптация клеток к условиям *in vitro* приводят к глубокой перестройке их генома, которая в той или иной степени затрагивает почти все хромосомы.

Ключевые слова: хромосомы, содержание ДНК, китайский хомячок, клеточные линии V-79 RJK и Vebr-5, цитометрия, микрофлуориметрия.

Постоянные клеточные линии человека и животных широко используются в различных экспериментальных исследованиях. Их подавляющее большинство имеет опухолевое происхождение. Характерной особенностью опухолевых клеток является нестабильность генома (Lengauer et al., 1997, 1998). Полагают, что дестабилизация клеточного генома происходит уже на ранних этапах неопластической трансформации и может быть вызвана мутациями, неточностью репликации ДНК и сбоям в программе клеточного деления, приводящим к дестабилизации генома на уровне кариотипа (анеуплоидия) (Duesberg et al., 2004; Bignold, 2007a, 2007b). Адаптация клеток к существованию в условиях *in vitro*, как правило, сопровождается «разбалансировкой» генома. Отклонения от стандартного кариотипа могут быть связаны с изменением как числа хромосом, так и их структуры, что обусловлено внутри- и межхромосомными перестройками, утратой генетического материала, а также амплификацией отдельных генов (Сорокина и др., 1986; Гринчук и др., 1988; Мамаева, 1996, 2002).

Основное внимание при исследовании клеток, культивируемых в условиях *in vitro*, уделяется выявлению факторов, влияющих на стабильность их кариотипа (Полянская, 1988; Гринчук и др., 1998, 1999, 2000, 2008, 2014). Значительно меньше работ посвящено анализу изменения структуры генома (кариотипа) в процессе про-

должительного культивирования клеток, выявлению направленности этих изменений и установлению механизмов, лежащих в их основе (Мамаева, 1996; Попов и др., 2009). Известны лишь единичные исследования, посвященные количественной оценке масштаба изменений генетического материала в хромосомах трансформированных клеток (Гринчук и др., 1986, 2007). Работы по сравнительному анализу содержания ДНК в нормальных и трансформированных клетках одного видового происхождения на данный момент отсутствуют.

В связи с этим цель настоящей работы состояла в сравнении содержания ДНК в хромосомах нормального кариотипа китайского хомячка и в хромосомах трансформированных клеточных линий на разных этапах культивирования.

Материал и методика

Животные. Взрослые самцы (6 особей) и самки (2 особи) китайских хомячков *Cricetulus griseus* (Rodentia, Cricetidae) лабораторного разведения, полученные из Биолого-почвенного института ДВО РАН (Владивосток). Масса тела животных составляла 20—25 г.

Клеточные культуры, использованные в работе. Анализировали культуру фибробластов китай-

ского хомячка линии CHL V-79 RJK, любезно предоставленную для работы д-ром Ф. Раддлом, и клетки линии CHL V-79 RJK, отселектированные по устойчивости к бромистому этидию (БЭ) в концентрации 5 мкг/мл (суб-линия Vebr-5), сохраняющие это свойство при длительном культивировании в среде без селективного агента и характеризующиеся фенотипом множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) (Игнатова и др., 1974; Гринчук и др., 1988). Исходно клетки линии CHL V-79 RJK были получены в результате селекции популяции фибробластов китайского хомячка линии V-79 по устойчивости к убаину и 5-бромдезоксисуридину на селективной среде ГАТ (Игнатова, 1983). Все клеточные линии культивировали в одинаковых условиях в среде DMEM с добавлением 10 % фетальной сыворотки в присутствии гентамицина (100 мкг/мл) в атмосфере 5—7 % CO₂ при 37 °C.

Препараты метафазных хромосом китайского хомячка *C. griseus* *in vivo* получали из клеток костного мозга. Для активации пролиферативных процессов за 1 сут до забоя в заднюю конечность животного подкожно вводили суспензию жизнеспособных дрожжевых клеток (2 мл на 100 г массы тела). Через 1 сут, за 40—60 мин до забоя, животным внутривенно вводили 0.4—0.5%-ный раствор колхицина (Serva) из расчета 1 мл на 100 г массы тела. После декапитации животного из бедренной кости шприцем вымывали костный мозг, используя 0.075 М раствор KCl. Костный мозг инкубировали в этом же растворе при 37 °C в течение 15 мин. Фиксацию и приготовление препаратов проводили по общепринятой методике (Макгрегор, Варли, 1986). У каждого хомячка исследовали по 10—13 метафазных пластинок.

Препараты метафазных хромосом из клеточных культур приготавливали по ранее описанной схеме (Гринчук и др., 1988). Накопление клеток в стадии митоза достигали путем введения в активно растущую культуру колхицина в конечной концентрации 3.6 мкг/мл. При гипотонической обработке использовали 0.075 М раствор KCl, клетки фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Полученные препараты фиксировали метанолом и высушивали на воздухе.

Проточная цитометрия. Определение размера генома *C. griseus* проводили путем измерения содержания ДНК в ядрах спленоцитов с помощью проточной цитометрии. В качестве реперных клеток использовали спленоциты, полученные из селезенок самцов джунгарских хомячков (*Phodopus sungorus*) и самцов лабораторных мышей линии C57BL6. Размер генома джунгарских хомячков и мышей составлял, по нашим данным, 5.73 и 6.80 пг соответственно. Окрашивание суспензионной смеси, состоящей из спленоцитов китайского хомячка, джунгарского хомячка и мыши (концентрация клеток около 5 млн/мл), проводили путем добавления к 0.8 мл клеточной суспензии последовательно 0.1 мл 1%-ного раствора Тритона X-100 (Fetak), 0.02 мл бромистого этидия (1 мг/мл; Calbiochem), 0.04 мл оливомицина (1 мг/мл; Московский завод медпрепаратов) и 0.05 мл 0.3 М MgCl₂. Окрашивание проводили в течение 30—60 мин при комнатной температуре. Измерения производили с помощью проточного цитометра (Розанов, Виноградов, 1998).

Метод определения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах состоял из двух последовательных этапов — идентификации хромосом и измерения содержания ДНК в идентифицированных хромосомах после окрашивания их бромистым этиди-

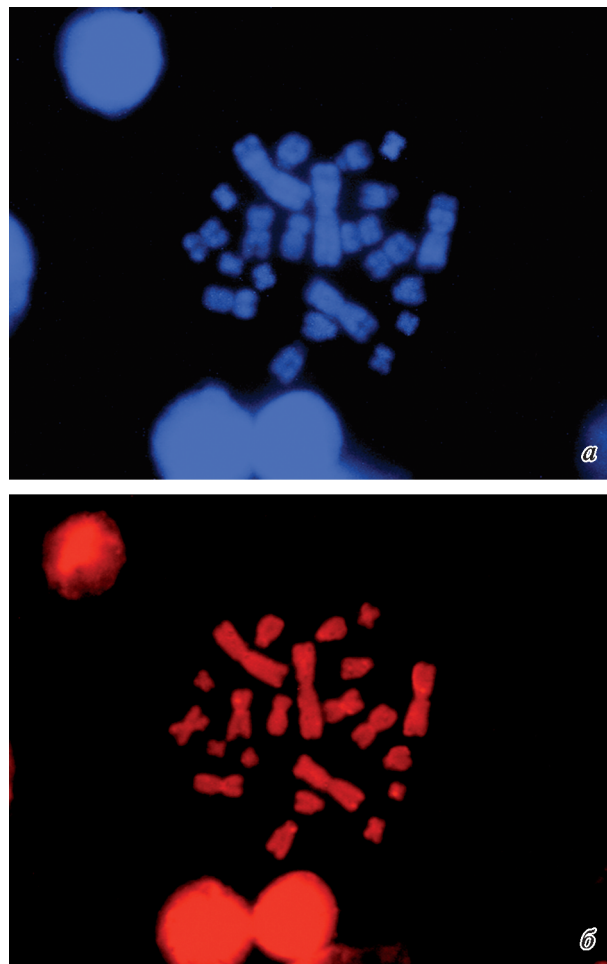


Рис. 1. Метафазная пластинка хомячка *Cricetulus griseus*.

а — дифференциальное окрашивание Hoechst 33258; б — окрашивание по Фельгену бромистым этидием — SO₂. Об. 100×/1.3.

ем—SO₂ (БЭ—SO₂) по Фельгену (Агафонова и др., 2013). Для идентификации хромосом в метафазных пластинках проводили их дифференциальное окрашивание красителем Hoechst 33258 (Карпищенко, 1999). Метафазные пластинки исследовали с помощью анализатора изображений, состоящего из флуоресцентного микроскопа Axioskop (Zeiss, Германия) и цифровой видеокамеры DFC420. Для получения флуоресцентных изображений использовали объектив Plan-NEOFLUAR 100×/1.3 и стандартные блоки фильтров FilterSet 02 (для Hoechst 33258) и FilterSet 15 (для БЭ—SO₂). Цифровые изображения дифференциально окрашенных хромосом китайского хомячка идентифицировали, картировали с присвоением каждой из них номера в соответствии с номенклатурой, предложенной для этого вида (Ray, Mohandas, 1976), и сохраняли в памяти компьютера.

Hoechst-окрашивание хромосом удаляли этанолом. Далее препараты дополнительно фиксировали в смеси этанол—уксусная кислота (3 : 1), высушивали на воздухе и окрашивали по Фельгену (флуоресцентный вариант) с использованием реактива типа Шиффа БЭ—SO₂ (Кудрявцев и др., 1974; Агафонова и др., 2013). Для измерения интенсивности флуоресценции хромосом, окрашенных БЭ—SO₂, использовали программу Видео-Тест Морфо 3.2 (Штейн и др., 1998). Измеряли не менее 70 хромосом каждого типа (рис. 1).



Рис. 2. Хромосомы № 2 из нормального кариотипа *Cricetulus griseus* (а), из кариотипа клеточной линии CHL V-79 RJK (б) и из кариотипа сублинии Vebr-5 (в).

Окрашивание на G-диски. Об. 100×/1.25.

Кариотип использованных в работе клеточных линий включал в себя две копии хромосомы 2 (рис. 2). По морфологическим признакам и содержанию ДНК характеристики данной хромосомы совпадали с нормальной хромосомой 2 китайского хомячка *C. griseus*. Центромерные индексы хромосомы 2 для китайского хомячка и клеток линий CHL V-79 RJK и Vebr-5 составляли 47.0 ± 0.7 , 47.9 ± 0.2 и 47.2 ± 0.8 соответственно и также не различался. В связи с этим содержание ДНК в индивидуальных хромосомах каждой метафазной пластинки относили к среднему содержанию ДНК в хромосоме 2, которое принимали за 1. Число измеренных хромосом каждого типа составляло не менее 30.

ДНК-центромерный индекс для хромосом нормального кариотипа китайского хомячка определяли как отношение содержания ДНК в коротком плече (p) хромосомы к его общему содержанию, умноженное на 100 %. Число измеренных аутосом каждого типа — 70, половых хромосом — 35.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Excel. Определяли среднее содержание ДНК в хромосомах (X), его ошибку (S_x) и коэффициент вариации (Cv). Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Результаты

Определение размера диплоидного генома китайского хомячка *C. griseus* показало, что у самцов он составляет 6.660 ± 0.025 пг (10^{-12} г), а у самок — 6.746 пг, т. е. у самок размер диплоидного (2c) генома оказался на 1.29 % больше, чем у самцов. Коэффици-

циент вариации при измерениях размера генома составил 1.5—2.0 %. Анализ кариотипа *C. griseus* показал, что он включает в себя 7 пар метацентрических (2 пары крупных, 2 средних и 3 пары маленьких) и 3 пары акроцентрических аутосом ($2n = 22$). X-хромосома представляет собой метацентрик среднего размера, а Y-хромосома — несколько меньший по размеру субметацентрик.

Кариотип постоянных клеточных линий китайского хомячка CHL V-79 RJK и Vebr-5 в отличие от нормального кариотипа *C. griseus* представлен только 3 неперестроенными хромосомами (№ 2, 3, 8). Хромосомный материал остальных 19 хромосом, типичных для клеток *C. griseus*, включен в образование 15 маркеров, типичных и встречающихся в клетках обеих линий в 100 % случаев. При этом число хромосом в подавляющем большинстве клеток составляло 18—19 (Гринчук и др., 1986, 1988).

Результаты определения содержания ДНК в хромосомах нормального кариотипа *C. griseus* представлены в табл. 1. Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшее количество ДНК содержится в хромосоме 1, а наименьшее — в хромосоме 10. Содержание ДНК в хромосоме 1 превышает таковое в хромосоме 10 в 7.76 раза.

Анализ содержания ДНК в хромосомах клеточных линий китайского хомячка, использованных в данной работе, показал, что наиболее близкой к норме является хромосома 2. Содержание ДНК в данной хромосоме в клеточных культурах на разных стадиях эксперимента составило для V-79 RJK 560 ± 12 и 583 ± 11 фг, для Vebr-5 626 ± 15 , 647 ± 12 и 641 ± 13 фг.

Результаты определения содержания ДНК в индивидуальных хромосомах клеточных линий китайского хомячка V-79 RJK и Vebr-5 на разных сроках их культивирования, прерываемого замораживанием—размораживанием клеток, представлены в табл. 2. В начале нашего эксперимента (табл. 2, столбец I) линия Vebr-5, полученная из линии V-79 RJK путем селекции в присутствии БЭ, морфологически отличалась от последней лишь по наличию амплификации в р-плече хромосомы Z₆. Хромосома Z₆ содержала на 70 % ($P < 0.01$) больше ДНК, чем хромосома в исходной линии CHL V-79 RJK, чувствительной к БЭ. Содержание ДНК в других хромосомах клеток линий V-79 RJK и Vebr-5 достоверно не различалось.

Повторный анализ клеток, проведенный через 20 лет использования клеток обеих линий, сопровождаемого их

Таблица 1

ДНК-центромерный индекс (ДНК-ЦИ), абсолютное и относительное содержание ДНК в хромосомах китайского хомячка *Cricetulus griseus*

Номер хромосомы	ДНК-ЦИ, %, $X \pm S_x$	Абсолютное содержание ДНК (10^{-15} г, фг), $X \pm S_x$	Относительное содержание ДНК, $X \pm S_x$	Номер хромосомы	ДНК-ЦИ, %, $X \pm S_x$	Абсолютное содержание ДНК (10^{-15} г, фг), $X \pm S_x$	Относительное содержание ДНК, $X \pm S_x$
1	44.1 ± 0.3	728.2 ± 4.0	1.235 ± 0.017	7	13.8 ± 0.4	199.9 ± 2.0	0.339 ± 0.006
2 ^a	47.3 ± 0.3	589.5 ± 4.7	1.000 ± 0.016	8	40.9 ± 0.5	147.2 ± 1.3	0.250 ± 0.004
3	42.5 ± 0.5	371.1 ± 2.7	0.629 ± 0.010	9	44.2 ± 0.6	105.3 ± 0.7	0.179 ± 0.003
4	45.2 ± 0.4	311.8 ± 2.7	0.529 ± 0.009	10	39.6 ± 0.5	93.9 ± 0.7	0.159 ± 0.002
5	15.5 ± 0.5	254.5 ± 2.7	0.432 ± 0.008	X	43.6 ± 0.5	356.4 ± 3.3	0.605 ± 0.010
6	17.2 ± 0.5	220.5 ± 1.3	0.374 ± 0.005	Y	33.6 ± 0.6	259.8 ± 3.3	0.441 ± 0.009

^a Содержание ДНК в хромосоме 2 принято за 1.

Таблица 2

Относительное содержание ДНК в хромосомах постоянных клеточных линий китайского хомячка V-79 RJK и Vebr-5 при длительном культивировании клеток

Номер хромосомы	V-79 RJK		Vebr-5		
	I	II	I	II	III
3	0.545 ± 0.026	0.641 ± 0.006 ^a	0.527 ± 0.031	0.630 ± 0.010 ^b	0.629 ± 0.009
8	0.198 ± 0.017	0.246 ± 0.004 ^b	0.201 ± 0.023	0.244 ± 0.004	0.227 ± 0.007 ^b
Z ₁	1.280 ± 0.077	1.182 ± 0.011	1.345 ± 0.053	1.283 ± 0.022	1.289 ± 0.024
Z ₃	0.891 ± 0.051	0.936 ± 0.010	0.901 ± 0.041	0.921 ± 0.012	0.879 ± 0.013
Z ₄	0.768 ± 0.050	0.786 ± 0.007	0.708 ± 0.034	0.799 ± 0.009 ^b	0.797 ± 0.017
Z ₅	0.579 ± 0.034	0.678 ± 0.008 ^b	0.630 ± 0.032	0.739 ± 0.009 ^b	0.742 ± 0.020
Z ₆	0.671 ± 0.034	0.733 ± 0.007	1.137 ± 0.051	1.040 ± 0.015	1.059 ± 0.020
Z ₇	0.470 ± 0.028	0.550 ± 0.007 ^b	0.451 ± 0.022	0.533 ± 0.009 ^b	0.508 ± 0.014
Z ₈	0.471 ± 0.026	0.469 ± 0.006	0.436 ± 0.027	0.479 ± 0.006	0.464 ± 0.014
Z ₉	0.321 ± 0.019	0.335 ± 0.005	0.321 ± 0.020	0.322 ± 0.005	0.306 ± 0.005 ^b
Z ₁₀	0.295 ± 0.022	0.318 ± 0.005	0.286 ± 0.021	0.312 ± 0.005	0.330 ± 0.006 ^b
Z ₁₁	0.221 ± 0.015	0.215 ± 0.006	0.224 ± 0.020	0.214 ± 0.003	0.199 ± 0.005 ^b
Z ₁₂	0.523 ± 0.029	0.610 ± 0.007 ^b	0.533 ± 0.031	0.652 ± 0.007 ^a	0.647 ± 0.015
Z ₁₃	0.259 ± 0.016	0.229 ± 0.005	0.247 ± 0.018	0.264 ± 0.005	0.256 ± 0.006
Z ₁₄	0.166 ± 0.014	0.146 ± 0.002	0.156 ± 0.017	0.150 ± 0.002	0.160 ± 0.004 ^b
Z ₁₅	0.136 ± 0.012	0.106 ± 0.003 ^b	0.113 ± 0.012	0.109 ± 0.002	0.105 ± 0.004

Примечание. Данные представлены в виде $X \pm S_x$. Содержание ДНК в хромосоме 2 принято за 1. I — начало эксперимента, II — 20 лет после начала эксперимента, III — 20 лет + 75 непрерывных пассажей. Надстрочными буквенными индексами отмечены уровни достоверности различий между I и II (для V-79 RJK и Vebr-5), между II и III (для Vebr-5): ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$.

периодическим замораживанием и размораживанием, показал, что содержание ДНК в клетках V-79 RJK увеличилось в хромосомах 3, 8, Z₅, Z₇ и Z₁₂ на 17.6, 24.2, 17.0, 17.1 и 16.6 % соответственно. Важно отметить, что уровень амплификации ДНК в р-плече хромосомы Z₆, зарегистрированный в начале нашего эксперимента, в ходе дальнейшего культивирования клеток (более чем за 20 лет) не изменился. В клетках линии Vebr-5 после длительного культивирования произошли схожие изменения (табл. 2).

Обсуждение

В настоящее время известны три работы, проведенные 30—40 лет назад, в которых оценивали размер генома *C. griseus* (Bachmann, 1972; Kato et al., 1980; Greilhuber et al., 1983). В этих работах авторы использовали метод абсорбционной цитофотометрии и препараты различных типов клеток *C. griseus*, окрашенные по Фельгену. В качестве объектов с известным содержанием ДНК для определения абсолютного содержания ДНК в геноме *C. griseus* авторы использовали различные клетки растений и животных. Полученные этими авторами данные о размере гаплоидного генома у этого вида хомячков (2.66, 3.20 и 3.99 пг) сильно различаются. Кроме того, осталось неясным, к какому полу животных относились измеренные величины размера генома. По-видимому, основная причина столь сильной вариации значений размера генома в обсуждаемых работах связана с использованием недостаточно точного метода измерения содержания ДНК в клетках и не совсем удачным выбором реперных клеток (нередко только одного типа), с которыми авторы сравнивали размер исследуемого генома.

В нашей работе для определения размера генома китайского хомячка *C. griseus* использовали метод проточной цитометрии, который гораздо меньше зависит от условий приготовления препаратов. Метод проточной цитометрии позволяет с высокой точностью измерять содержание ДНК в изолированных клетках и выявлять различия в размере генома порядка 0.3—0.5 % (Розанов, Виноградов, 1998). Определение содержания ДНК в сперматозоидах самцов и самок китайского хомячка, проведенное нами с помощью проточной цитометрии, показало, что размер 1с-генома у них составляет 3.300 и 3.373 пг соответственно.

Результаты определения содержания ДНК в хромосомах китайского хомячка, полученные с помощью микрофлуориметрического метода, представлены в табл. 1. При сравнении наших данных с данными других авторов (табл. 3), которые были получены с помощью различных цитофотометрических методов при использовании клеточных культур, полученных из клеток костного мозга, фибробластов легкого и других тканей или органов китайского хомячка, видно, что они хорошо совпадают.

Как известно, в кариотипе человека 5 пар хромосом, в том числе все три акроцентрические хромосомы (13—15), являются ядрышкообразующими. В отличие от кариотипа человека у *C. griseus* в формировании ядрышек участвуют, по-видимому, не все акроцентрические хромосомы. Предполагается, что ядрышкообразующую активность у этого вида хомячков помимо акроцентрических хромосом 5 и 6 могут проявлять также метацентрические хромосомы 3, 4, 8, 9 и X-хромосома (Hsu et al., 1975; Blin et al., 1982). Вместе с тем следует отметить, что данные, имеющиеся в настоящее время по этому вопросу, довольно противоречивы.

Таблица 3

Относительное содержание ДНК^a в хромосомах китайского хомячка по литературным данным

Номер хромосомы	Относительное содержание ДНК					
	1	2	3	4	5	6
1	1.189 ± 0.071	1.282 ± 0.047	1.216	1.163	1.163	1.230 ± 0.017
2 ^a	1.000 ± 0.103	1.000 ± 0.049	1.000	1.000	1.000	1.000 ± 0.023
3	0.614 ± 0.049	0.657 ± 0.041	0.585	0.640	0.640	0.628 ± 0.011
4	0.477 ± 0.068	0.421 ± 0.035	0.545	0.547	0.547	0.512 ± 0.021
5	0.409 ± 0.057	0.447 ± 0.025	0.443	0.419	0.430	0.434 ± 0.013
6	0.372 ± 0.053	0.398 ± 0.029	0.347	0.419	0.430	0.381 ± 0.012
7	0.337 ± 0.026	0.313 ± 0.018	0.347	0.349	0.360	0.328 ± 0.008
8	0.217 ± 0.024	0.237 ± 0.023	0.239	0.267	0.279	0.240 ± 0.013
9	0.183 ± 0.029	0.210 ± 0.020	0.188	0.163	0.198	0.170 ± 0.008
10	0.140 ± 0.019	0.136 ± 0.008	0.188	0.163	0.198	0.159 ± 0.009
X	0.564 ± 0.082	0.594 ± 0.043	0.647	—	—	0.704 ± 0.035
Y	—	0.324 ± 0.035	0.511	0.419	0.430	0.470 ± 0.010

Примечание. ^a Содержание ДНК в хромосоме 2 принято за 1. Столбцы 1—6 — результаты разных авторов: 1 — Carlson et al., 1963, 2 — Nitsch et al., 1970, 3 — Stubblefeld, 1975, 4 — Gray et al., 1975, 5 — Lucas et al., 1983, 6 — Sumner, 1989.

Определение содержания ДНК в индивидуальных хромосомах клеток постоянных линий китайского хомячка V-79 RJK и Vebr-5 показало, что при их длительном культивировании количество генетического материала в хромосомах изменяется в пределах 20 %. При этом содержание ДНК в хромосомах может как увеличиваться, так и уменьшаться (табл. 2). Однако при сравнении данных настоящей работы (табл. 1) и данных, полученных ранее (Гринчук и др., 1986), видно, что абсолютное содержание ДНК в хромосомах обеих клеточных линий значительно отличается от содержания ДНК в соответствующих хромосомах нормального кариотипа китайского хомячка. Даже хромосомы 3 и 8, которые по своей морфологии после дифференциальной окраски на G-диски выглядят как нормальные, содержат на 20 и 30 % меньше ДНК, чем соответствующие хромосомы нормального кариотипа. Из этого можно заключить, что неопластическая трансформация и последующая адаптация клеток к условиям *in vitro* приводят к глубокой перестройке их генома, которая затрагивает все хромосомы.

Популяции длительно культивируемых *in vitro* клеток, как правило, очень гетерогенны и нестабильны в генетическом отношении. Неслучайно ту или иную клеточную линию характеризуют лишь модальным числом хромосом. Нередко их состав включает в себя множество клонов и субклонов, каждый из которых характеризуется не только специфичным числом хромосом или их структурой, но и определенным содержанием ДНК в них. Ранее было показано, что размер генома клеток в различных клеточных линиях может изменяться в ходе их культивирования (Кудрявцев и др., 2007). Однако пока неясно, действительно ли изменения размера генома и содержания ДНК в хромосомах клеточных линий связаны с изменением в них содержания генетического материала или же эти изменения происходят в результате преимущественного роста того или иного клона клеток на разных этапах культивирования. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят найти ответы на данные вопросы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-01820).

Список литературы

- Агафонова Н. А., Сакута Г. А., Розанов Ю. М., Штейн Г. И., Кудрявцев Б. Н. 2013. Микрофлуориметрия содержания ДНК в индивидуальных хромосомах человека с помощью анализатора изображений. Цитология. 55 (5): 338—347. (Agafonova N. A., Sakuta G. A., Rozanov Yu. M., Shtein G. I., Kudryavtsev B. N. 2013. DNA image-fluorometry of individual human chromosomes. Tsitologiya. 55 (5): 338—347.)
- Гринчук Т. М., Иванцов К. М., Алексеенко Л. Л., Кожухарова И. В., Зайчик А. М., Петров Н. С., Михайлов В. М., Попов Б. Н. 2008. Характеристика культуры мезенхимных стволовых клеток мыши, экспрессирующих GFP. Цитология. 50 (12): 1030—1035. (Grinchuk T. M., Ivantsov K. M., Alekseenko L. L., Kozhukharova I. V., Zaichik A. M., Petrov N. S., Mikhailov V. M., Popov B. V. 2008. Characterization of cultured murine mesenchymal stem cell line expressing GFP. Tsitologiya. 50 (12): 1030—1035.)
- Гринчук Т. М., Игнатова Т. Н., Сорокина Е. А., Арцыбашева И. В., Паньшина Ю. Т. 1988. Хромосомный полиморфизм клеток млекопитающих с множественной лекарственной устойчивостью. I. Анализ кариотипа клеток китайского хомячка, устойчивых к бромистому этидию, на ранних пассажах первой ступени селекции. Цитология. 30 (3): 312—319. (Grinchuk T. M., Ignatova T. N., Sorokina E. A., Artsybacheva I. V., Panshina Yu. T. 1988. Chromosome polymorphism in mammalian cells with multidrug resistance. I. Karyotypical analysis of Chinese hamster cells resistant to ethidium bromide at the early passages of initial selection steps. Tsitologiya. 30 (3): 312—319.)
- Гринчук Т. М., Павленко М. А., Арцыбашева И. В., Меликсетян М. Б., Алексеенко Л. Л., Пуговкина Н. А. 1999. Плейотропные изменения структуры кариотипа фибробластов китайского хомячка линии CHL V-79 RGK в связи с приобретением ими устойчивости к этопозиду — индуктору апоптоза. Цитология. 41 (2): 190—199. (Grinchuk T. M., Pavlenko M. A., Artsybacheva I. V., Meliksetyan M. B., Alekseenko L. L., Pugovkina N. A. 1999. Hamster cells CHL V-79 RJK selected for resistance to etoposide exhibit multiple changes of karyotype. Tsitologiya. 41 (2): 190—199.)

- Гринчук Т. М., Павленко М. А., Липская Л. Л., Сорокина Е. А., Тарунина М. В., Березкина Е. В., Ковалева З. В., Игнатова Т. Н. 1998. Устойчивость клеток хронического промиелолейкоза человека линии K562 к адриамицину коррелирует с направленной дестабилизацией генома — амплификацией гена MDR1 и неслучайными изменениями в структуре кариотипа. Цитология. 40 (7) : 652—660. (Grinchuk T. M., Pavlenko M. A., Lipskaya L. A., Sorokina E. A., Tarunina M. V., Berjzskina E. V., Kovaleva Z. V., Ignatova T. N. 1998. Adriamycin resistance of human myelogenous leukaemia K562 cells correlates with a directed genome destabilization — MDR 1 gene amplification and non-random changes in karyotype structure. Tsitologiya. 40 (7) : 652—660.)
- Гринчук Т. М., Павленко М. А., Пуговкина Н. А., Алексеенко Л. Л., Ковалева З. В., Меликсетян М. Б. 2000. Влияние эктопической сверхэкспрессии антиапоптотического гена *bcl-2* на уровень и характер кариотипической нестабильности в клетках китайского хомячка линии CHL V-79 RJK. Цитология. 42 (10) : 1004—1014. (Grinchuk T. M., Pavlenko M. A., Pugovkina N. A., Alekseenko L. L., Kovaleva Z. V., Meliksetyan M. B. 2000. The effect of antiapoptotic *bcl-2* gene ectopic overexpression in Chinese hamster CHL V-79 RJK fibroblasts on the character and level of their karyotype instability. Tsitologiya. 42 (10) : 1004—1014.)
- Гринчук Т. М., Сухих Т. Р., Сорокина Е. А., Арцыбашева И. В., Паньшина Ю. Т., Розанов Ю. М., Кудрявцев Б. Н., Игнатова Т. Н. 1986. Микрофлуориметрическая оценка содержания ДНК в индивидуальных хромосомах подтверждает цитогенетически обнаруживаемые амплификации ДНК в структурных вариантах хромосомы 1 клеток китайского хомячка со стабильной множественной лекарственной устойчивостью. ДАН СССР. 286 (3) : 712—717. (Grinchuk T. M., Sukhih T. R., Sorokina E. A., Artsybasheva I. V., Panshina Yu. T., Rozanov Yu. M., Kudryavtsev B. N., Ignatova T. N. 1986. Microfluorimetric evaluation of DNA content in individual chromosomes confirms cytogenetically detectable amplification of DNA in structural variants of chromosome 1 of Chinese hamster cells with a stable multi-drug resistant. DAN USSR. 286 (3) : 712—717.)
- Гринчук Т. М., Ушал И. Э., Арцыбашева И. В., Павленко М. А., Кудрявцев Б. Н. 2007. Микрофлуориметрический анализ динамики геномных изменений фибробластов китайского хомячка CHL V-79 RJK с множественной лекарственной устойчивостью. Цитология. 49 (12) : 1011—1015. (Grinchuk T. M., Ushal I. E., Artsybasheva I. V., Pavlenko M. A., Kudryavtsev B. N. 2007. Microfluorimetric analysis of dynamics of genomic changes of Chinese hamster fibroblasts CHL V-79 RJK with multidrug resistance. Tsitologiya. 49 (12) : 1011—1015.)
- Гринчук Т. М., Шилина М. А., Алексеенко Л. Л. 2014. Нарушение стабильности структуры кариотипа фибробластов китайского хомячка линии CHL V-79 RJK в процессе длительного культивирования при повышенной температуре. Цитология. 56 (11) : 841—849. (Grinchuk T. M., Shilina M. A., Alexeenko L. L. 2014. Long-term cultivation of Chinese hamster fibroblasts of line V-79 RJK under elevated temperature leads to karyotype structure destabilization. Tsitologiya. 56 (11) : 841—849.)
- Игнатова Т. Н. 1983. Мутанты и гибриды в изучении генотипической изменчивости трансформированных клеток в культуре. Автореф. докт. дис. Л. 35 с.
- Игнатова Т. Н., Сальников К. В., Плещак В. А. 1974. Получение и характеристика клеток китайского хомячка и мыши устойчивых к бромистому этидию. — В сб.: Функциональная морфология, генетика и биохимия клетки. Л.: Наука. 16 : 142—144. (Ignatova T. N., Salnikov K. V., Pleskach V. A. 1974. Obtainment and characterization of Chinese hamster and mice cells resistant to the bromide ethidium. In: Functional morphology, genetics and biochemistry of cells. Leningrad: Nauka. 16 : 142—144.)
- Карпищенко А. И. 1999. Медицинские лабораторные технологии. СПб.: Наука. 656 с. (Karpischenko A. I. 1999. Medical laboratory technology. SPb.: Nauka. 656 p.)
- Кудрявцев Б. Н., Кудрявцева М. В., Фаддеева М. Д. 1974. Цитофлуориметрия ДНК с этидиумбромидом-SO₂. Цитология. 16 (1) : 107—111. (Kudryavtsev B. N., Kudryavtseva M. V., Faddeeva M. D. 1974. Cytofluorimetric analysis of DNA with ethidium bromide-SO₂. Tsitologiya. 16 (1) : 107—111.)
- Кудрявцев Б. Н., Сакута Г. А., Калимагамбетов А. М., Безбородкина Н. Н., Розанов Ю. М. 2007. Сравнительный анализ размера генома различных клеточных линий человека. Цитология. 49 (9) : 763. (Kudryavtsev B. N., Sakuta G. A., Kalimagambetov A. M., Bezborodkina N. N., Rozanov Yu. M. 2007. Comparative analysis of the genome size of different cell lines of human. Tsitologiya. 49 (9) : 763.)
- Макгрегор Г., Варли Дж. 1986. Методы работы с хромосомами животных. М.: Мир. 272 с. (McGregor H. C., Varley J. 1986. Working with animal chromosomes. M.: Mir. 272 p.)
- Мамаева С. Е. 1996. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология. 38 (8) : 787—814. (Mamaeva S. E. 1996. Patterns of karyotypic evolution of cells in culture. Tsitologiya. 38 (8) : 787—814.)
- Мамаева С. Е. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Научный мир. 234 с. (Mamaeva S. E. 2002. Atlas of chromosomes of human and animal cell lines. M.: Scientific World. 234 p.)
- Полянская Г. Г. 1988. Кариологическая характеристика клеточных сублиний почки кенгуровой крысы и фибробластов кожи индийского мунджака. Цитология. 30 (6) : 732—738. (Poljanskaya G. G. 1988. Karyological characteristics of cell sublines derived from kangaroo rats kidney and Indian muntjac skin fibroblasts. Tsitologiya. 30 (6) : 732—738.)
- Попов Б. Н., Петров Н. С., Михайлов В. М., Томилин А. Н., Алексеенко Л. Л., Гринчук Т. М., Зайчик А. М. 2009. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимных стволовых клеток в культуре in vitro. Цитология. 52 (2) : 91—102. (Popov B. V., Petrov N. S., Michailov V. M., Tomilin A. N., Alexeenko L. L., Grinchuk T. M., Zaichik A. M. 2009. Spontaneous transformation and immortalization of mesenchymal stem cells in vitro. Tsitologiya. 51 (2) : 91—102.)
- Розанов Ю. М., Виноградов А. Е. 1998. Прецизионная ДНК-цитометрия: исследование индивидуальной вариабельности размера генома животных. Цитология. 40 (8/9) : 792—799. (Rozanov Yu. M., Vinogradov A. E. 1998. Precise DNA cytometry: investigation of individual variability in animal genome size. Tsitologiya. 40 (8/9) : 792—799.)
- Сорокина Е. А., Кожухарова И. В., Гринчук Т. М. 1986. Кариотипическая характеристика мышинной миеломы линии sp2/0-Ag14. Цитология. 28 (6) : 623—628. (Sorokina E. A., Kozhukharova I. V., Grinchuk T. M. 1986. Karyotypical characteristics analysis of mouse myeloma cell line sp2/0-Ag14. Tsitologiya. 28 (6) : 623—628.)
- Штейн Г. И., Пантелеев В. Г., Поваркова А. В., Кудрявцев Б. Н. 1998. Возможности анализатора изображений «ВидеоТест» для проведения микрофотометрических исследований в цитологии. Цитология. 40 (10) : 913—916. (Shtein G. I., Panteleev V. G., Povarkova A. V., Kudryavtsev B. N. 1998. Capacities of image analyzer «VideoTest» for microphotometric investigations in cytology. Tsitologiya. 40 (10) : 913—916.)
- Bachmann K. 1972. Genome size in mammals. Chromosoma. 35 : 85—93.
- Bignold L. P. 2007a. Mutation, replicative infidelity of DNA and aneuploidy sequentially in the formation of malignant pleomorphic tumors. Histol. Histopathol. 22 : 321—326.
- Bignold L. P. 2007b. Variation, «evolution», immortality and genetic instabilities in tumour cells. Cancer Lett. 253 : 155—169.
- Blin N., Stohr M., Hutter K. J., Alonso A., Goerttler K. 1982. Assignment of snRNA gene sequences to the large chromosomes of rat kangaroo and chinese hamster isolated by flow cytometric sorting. Chromosoma. 85 : 723—733.
- Carlson L., Caspersson T., Foley G. E., Kudinowsky J., Lomakka G., Simonsson E., Soren L. 1963. The application of quantitative cytochemical techniques to the study of individual mammalian chromosomes. Exp. Cell Res. 31 : 589—594.
- Duesberg P., Fabarius A., Hehlmann R. 2004. Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. IUBMB Life. 56 : 65—81.

- Gray J. W., Carrano A. V., Moore D. H., Steinmetz L. L., Minkler J., Mayall B. H., Mendelsohn M. L., Van Dilla M. A. 1975. High-speed quantitative karyotyping by flow microfluorometry. *Clin. Chem.* 21 : 1258—1262.
- Greilhuber J., Volleth M., Loidl J. 1983. Genome size of man and animals relative to the plant *Allium cepa*. *Can. J. Genet. Cytol.* 25 : 554—560.
- Hsu T. C., Spirito S. E., Hutter M. L. 1975. Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma*. 53 : 25—36.
- Kato H., Harada M., Tsuchiya K., Moriwaki K. 1980. Absence of correlation between DNA repair in ultraviolet irradiated mammalian cells and life span of the donor species. *Jap. J. Genet.* 55 : 99—108.
- Lengauer C., Kinzler K. W., Vogelstein B. 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 386 : 623—627.
- Lengauer C., Kinzler K. W., Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 396 : 643—649.
- Lucas J. N., Gray J. W., Peters D. C., Van Dilla M. A. 1983. Centromeric index measurement by slit-scan flow cytometry. *Cytometry*. 4 : 109—116.
- Nitsch B., Merken J.-D., Bruck H.-J. 1970. Determination Feulgen-DNA of individual chromosomes by fluorescence cytophotometry with incident light. *Histochemistry*. 23 : 254—265.
- Ray M., Mohandas T. 1975. Proposed banding nomenclature for Chinese hamster chromosomes (*Cricetulus griseus*). *Cytogenetics*. 16 : 83—91U.
- Stubblefeld E., Deavan L., Cram L. S. 1975. Flow microfluorometric analysis of isolated Chinese hamster chromosomes. *Exp. Cell Res.* 94 : 464—468.
- Sumner A. T. 1989. The DNA content of Chinese hamster meiotic metaphase chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 50 : 125—126.

Поступила 13 II 2015

DNA CONTENT IN INDIVIDUAL CHROMOSOMES OF NORMAL CHINESE HAMSTER
KARYOTYPE AND CHROMOSOMES OF CONSTANT HAMSTER
CELL LINES CHL V-79 RJK AND Vebr-5

N. A. Agafonova,¹ T. M. Grinchuk,¹ [V. P. Korablev],² Yu. M. Rozanov,¹ G. A. Sakuta,¹
M. A. Shilina,¹ G. I. Shtein,¹ B. N. Kudryavtsev¹, *

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² Institute of Biology and Soil Science FEB RAS;

* e-mail: bn_kudryavtsev@mail.ru

Using cytometry and an microfluorimetry, we have determined the genome size in Chinese hamster *Cricetulus griseus*, as well as absolute and relative DNA content of its individual chromosomes and of chromosomes in the transformed Chinese hamster cell lines V-79 RJK and Vebr-5 after prolonged cultivation. It has been shown that the genome size in male and female Chinese hamster is 6.660 and 6.746 pg, respectively. Absolute content of chromosomal DNA of both studied cell lines differed significantly from the content of the corresponding chromosomal DNA of the Chinese hamster normal karyotype. During long-term cellular cultivation, changes in the DNA content of certain chromosomes in both cell lines (generally upward) reached 20—25 %. The level of DNA amplification in the p-arm of chromosome Z6, registered at the beginning of the experiment, in the course of further cellular cultivation (over 20 years) remained stable. The data obtained allow us to conclude that the malignant transformation of cells and subsequent adaptation to the conditions *in vitro* leads to a profound restructuring of its genome, which affects almost all chromosomes.

Key words: chromosomes, DNA content, Chinese hamster, cell lines V-79 RJK and Vebr-5, flow cytometry, microfluorimetry.