

А.П. ЯЦЫШИНА¹, Т.Т. ГЛАЗКО²,
О.А. КОВАЛЕВА², О.В. ПИДПАЛА¹, Л.Л. ЛУКАШ¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Заболотного, 150, Киев, 03143

² Институт агроэкологии и биотехнологии УААН,
ул. Метрологическая, 12, Киев, 03143

ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ДИПЛОИДИЗАЦИИ ПОЛИПЛОИДНЫХ ГЕРМИНАТИВНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/c



Проанализированы количественные и качественные изменения хромосом клеток линии G1, полученной из полового бугорка 12,5-дневного эмбриона мыши линии BALB/c. Цитогенетический анализ проводили на 75-м пассаже культивирования in vitro. Клеточная популяция к указанному пассажу оказалась гетерогенной смесью клеток разной ploidy. Предполагается, что такая гетерогенность может быть обусловлена одновременным протеканием двух процессов: полиплоидизации клеток и их вторичной диплоидизации. Эти процессы сопровождаются разрушением хромосом, образованием мелких нетипируемых акроцентрических хромосом, а также больших перестроенных хромосом, в том числе и Робертсоновских транслокаций. При культивировании клеток линии G1 in vitro происходит интенсивная кариотипическая эволюция клеточной популяции, при которой наблюдается повышенная нестабильность хромосомного аппарата.

© А.П. ЯЦЫШИНА, Т.Т. ГЛАЗКО, О.А. КОВАЛЕВА,
О.В. ПИДПАЛА, Л.Л. ЛУКАШ, 2006

Введение. Линии стволовых клеток различного происхождения в последние годы являются объектом интенсивных исследований. Одна из главных проблем их получения и применения — это поиски характеристик, которые могли бы быть использованы для прогноза их популяционно-генетической стабильности. Сложность заключается в том, что дестабилизация генетического материала может реализоваться разными путями. Каждый из них имеет свои, достаточно автономные механизмы формирования, например, полиплоидия и анеуплоидия, внутриврохромосомные повреждения и различные типы межхромосомных транслокаций. Это приводит к появлению генетически различных клонов, селективные взаимоотношения между которыми определяются условиями культивирования клеток [1, 2].

Очевидно, что только детальное изучение разных путей формирования генетической гетерогенности клеточных популяций, выявление для конкретных популяций предпочтительного механизма дестабилизации хромосомного аппарата может способствовать разработке методов объективного прогноза направления эволюции клеток.

Одним из широко распространенных типов дестабилизации хромосомного аппарата клеток в культуральных условиях является их полиплоидизация. Некоторые исследователи полагают, что полиплоидизация облигатно связана с этапом переживания клетками «кризиса», в частности, при их перенесении из условий in vivo в новые средовые условия in vitro [3]. В то же время до сих пор остается недостаточно исследованным вопрос о том, каковы могут быть механизмы и динамика формирования этих полиплоидных клеток и какой вклад они и их потомство могут вносить в общую генетическую гетерогенность клеточных популяций при их культивировании in vitro уже после прохождения клетками «кризиса» при становлении клеточных линий. Для того чтобы оценить возможные варианты участия полиплоидных клеток в генетическом разнообразии популяции герминативных стволовых клеток, сохраняющих полипотентность, в настоящей работе был выполнен кариотипический анализ популяций клеток, полученных на 75-м пассаже их культивирования in vitro.

Материалы и методы. *Характеристика исходных клеток и условия культивирования.* Клеточную линию G1, полученную из эмбриональных тканей полового бугорка 12,5-дневного зародыша мышей линии BALB/c, культивировали на фидерном слое на протяжении первых пяти пассажей, затем как монослойную культуру в среде Игла в модификации Дюльбекко (DMEM, «CELLGRO», США) с добавлением 5 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («Сангва», Львов) [4, 5]. Клетки имели фибробластоподобную морфологию, росли монослоем с очагами многослойного роста [4, 6].

Приготовление препаратов хромосом. Препараты клеток готовили по стандартной методике [7], модифицированной нами [4, 5]: клетки суспендировали и инкубировали 40 мин в деионизированной воде при 37 °С. Фиксировали клеточный материал смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1), трижды меняя фиксирующий раствор. Препараты раскапывали на холодные мокрые стекла, высушивали и окрашивали красителем Гимза («Merck», Германия). Окрашенные цитогенетические препараты анализировали с помощью бинокулярного микроскопа Carl Zeiss при увеличении в 1000 раз. Метафазные пластинки фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата Canon (PowerShot G6, Англия). Для выявления G-бендинга препараты в течение 15 с обрабатывали 0,01%-ным раствором трипсина на фосфатном буфере (pH 7,4–7,2) комнатной температуры, затем красителем Гимза [7]. Индивидуальное типирование хромосом выполняли в соответствии с данными Cowell [8]. Количество клеток с мик-

роядрами оценивали на тех же препаратах с учетом клеток, у которых сохранялась цитоплазма. Рассчитывали количество клеток с микроядрами среди 6000 клеток и затем выражали как количество клеток с микроядрами на 1000 клеток (в промилле, ‰). Во всех случаях подсчета клеток с микроядрами количество микроядер на клетку не учитывали.

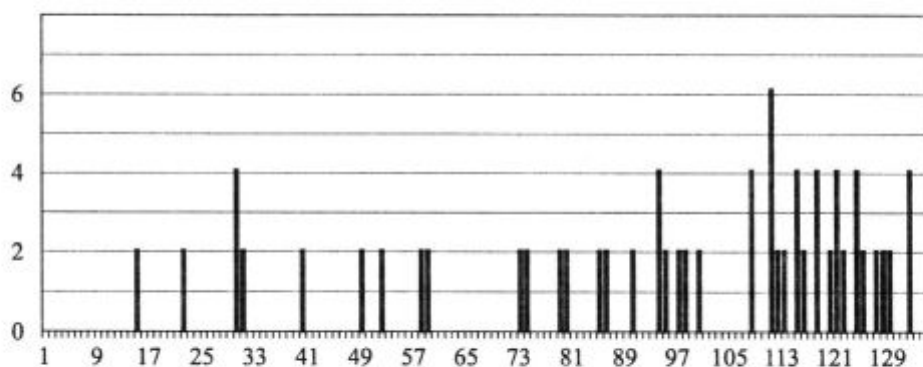
Результаты исследований и их обсуждение. К 75-му пассажу популяции клеток, изначально полученных как герминативные стволовые клетки мыши линии BALB/c, представляют собой гетерогенную смесь клеток разной пloidности, включая имеющие гексаплоидные наборы хромосом (120 хромосом).

Анализ распределения клеток по количеству хромосом свидетельствует об их сложном составе с наличием нескольких нечетко выраженных мод (рис. 1).

Кариотипирование нескольких клеток показало, что в метафазных пластинках наблюдается нарушение баланса между копийностью индивидуальных хромосом. Так, на рис. 2, *a* представлена метафазная пластинка, которая включает в себя 74 акроцентрические идентифицируемые аутосомы и две хромосомы X, типичные для кариотипа мыши, затем 12 мелких неидентифицируемых акроцентрических хромосом (рис. 2, *a*, Хр I–XII) и 6 крупных перестроенных хромосом (рис. 2, *a*, Хр XIII–XVIII), три из которых являются результатом центрических слияний (рис. 2, *a*, Хр XV–XVII).

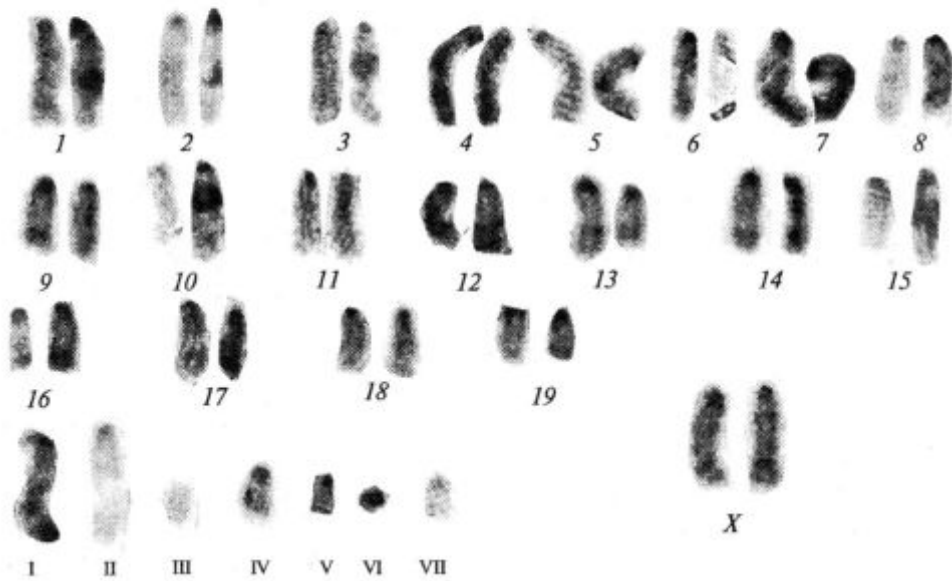
Таким образом, в этой метафазной пластинке суммарно наблюдается 95 плеч хромосом, что на 15 хромосом больше тетраплоидного набора хромосом мыши ($n = 20$). При этом

Рис. 1. Распределение числа хромосом в клетках линии G1 на 75-м пассаже культивирования *in vitro*: по вертикали — количество клеток, %; по горизонтали — количество хромосом





а



б

большинство аутосом представлено, соответственно, четырьмя копиями, за исключением хромосом 1 и X (по две копии) и хромосом 2 и 3 (по три копии).

Можно было бы ожидать, что материал этих хромосом входит в 6 крупных перестроенных хромосом. Однако это не позволяет объяснить появление 12 мелких, нетипируемых хромосом, у каждой из которых присутствует типичный для перичентромерных районов акроцентрических хромосом мыши гетерохроматиновый блок. Такие гетерохроматиновые блоки ведут себя, как обычные центромеры мыши у этих мелких неидентифицируемых хромосом, где наблюдается расхождение хроматид, начиная от теломерных районов, с сохранением их свя-

зи в области центромерного, гетерохроматинового блока (рис. 2).

Метафазная пластинка на рис. 2, б содержит весь диплоидный набор хромосом мыши (20 пар, 40 хромосом), две крупные перестроенные хромосомы (рис. 2, б, Хр I—II) и 5 мелких неидентифицируемых хромосом (рис. 2, б, Хр III—VII), т.е. в данном случае не изменен баланс копий между неперестроенными хромосомами, но наблюдается 7 избыточных, 5 из которых — мелкие, неидентифицируемые, но сохраняющие гетерохроматиновые блоки, соответствующие обычным перичентромерным районам хромосом мыши.

В метафазной пластинке на рис. 2, в наблюдается существенное нарушение баланса ко-

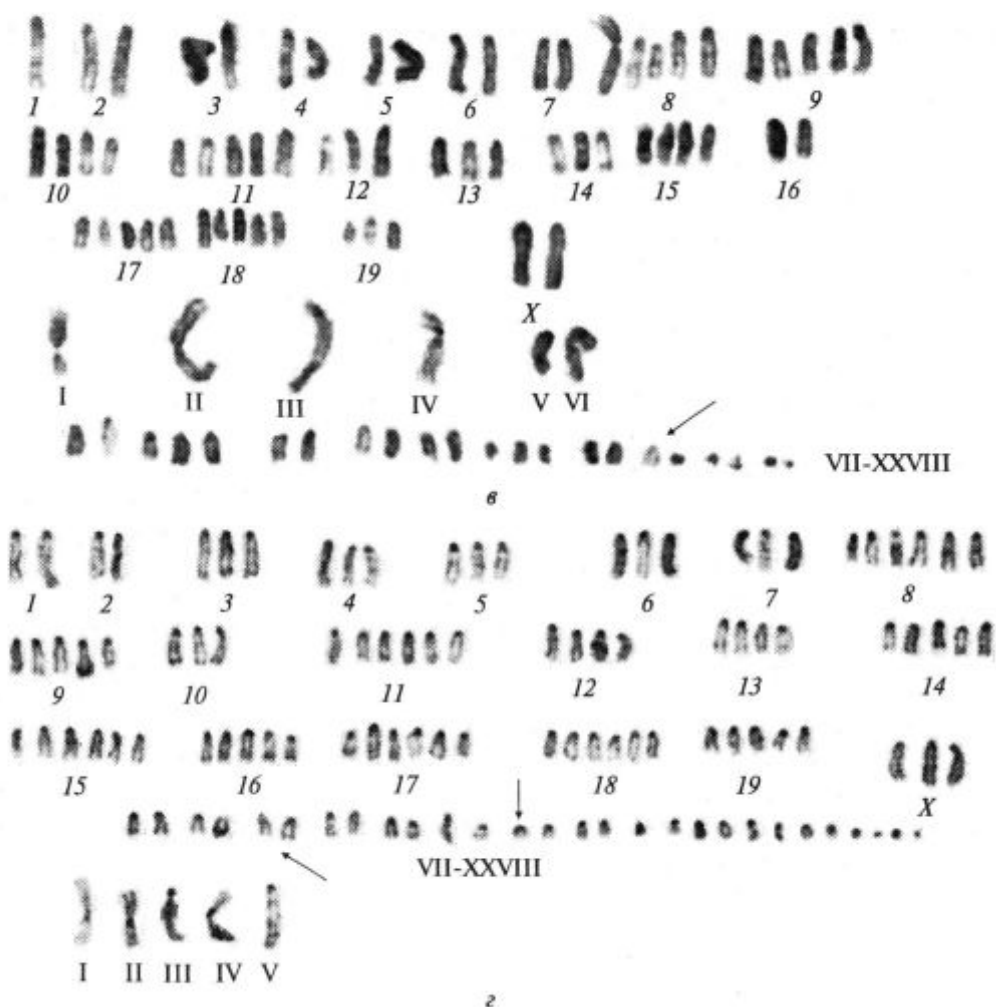


Рис. 2. Кариограммы клеток линии G1, свидетельствующие о генетической гетерогенности (а, б, в, г). Стрелками указаны мелкие акроцентрические хромосомы с функциональными центромерами

пий разных хромосом. Так, хромосома 1 представлена одной копией; хромосомы 2, 3, 4, 5, 6, 7, 16 и X — двумя копиями; хромосомы 12, 13, 14 — тремя копиями; хромосома 10, 15 и 19 — четырьмя копиями (одна копия хромосомы 19 включена в центрическое слияние с хромосомой 8 — Rb(19; 8)), а хромосомы 8, 9, 11, 17, 18 — пятью копиями. Кроме того, присутствуют 6 крупных перестроенных хромосом (рис. 2, в, Хр I—VI), четыре из которых представлены центрическими слияниями (рис. 2, в, Хр I—IV), и 22 мелкие неидентифицируемые хромосомы (рис. 2, в, Хр VII—XXVIII). Таким образом, метафазная пластинка содержит суммарно 96 плеч хромосом, что на 4 хромосомы меньше пентаплоидного набора хромосом мыши.

По суммарному количеству плеч хромосом метафазные пластинки на рис. 2, а и рис. 2, в близки (95 и 96 хромосом) так же, как и по количеству крупных перестроенных хромосом (6 и 6), однако существенно отличаются по количеству мелких неидентифицируемых хромосом (12 и 22) и по изменениям баланса копий между индивидуальными хромосомами. В первом случае большинство хромосом, за исключением четырех самых больших (1, 2, 3 и X), представлено четырьмя копиями, а во втором наблюдается более сложная картина, причем 5 средних по размеру (8, 9, 11) и мелких (17, 18) хромосом представлены пятью копиями.

Метафазная пластинка на рис. 2, г также представлена нарушенным балансом между

количеством копий индивидуальных хромосом. Так, хромосомы 1 и 2 имеются в двух копиях; хромосомы 3, 4, 5, 6, 7, 10, X — в трех копиях; хромосомы 12 и 13 — в четырех; хромосомы 9, 14, 16 и 19 — в пяти копиях, а хромосомы 8, 11, 15, 17 и 18 — в шести копиях. Кроме того, в метафазной пластинке присутствуют пять больших перестроенных хромосом (рис. 2, г, Хр I—V), три из которых образованы в результате центрических слияний (рис. 2, з, Хр I, II, IV), и 28 мелких нетипируемых хромосом (рис. 2, з, Хр VI—XXXIII). Суммарно метафазная пластинка содержит 120 плеч хромосом, т.е. по количеству соответствует гексаплоидному набору хромосом мыши.

Полученные результаты достаточно непротиворечиво можно объяснить, если предположить, что наряду с полиплоидизацией клеток к 75-му пасажу происходит их вторичная диплоидизация, причем скорость этой диплоидизации разная для разных индивидуальных хромосом. Мелкие нетипируемые хромосомы, сохраняющие функционально нормальные центромерные районы, по-видимому, являются остатками разрушающихся в процессах такой «вторичной» диплоидизации индивидуальных хромосом, которые затем постепенно утрачиваются.

В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что чем меньше нарушен баланс между количеством копий индивидуальных хромосом (рис. 2, а, б), тем меньшее количество мелких нетипируемых хромосом представлено в метафазных пластинках. Даже наличие полного диплоидного набора хромосом, как, например, на рис. 2, б, не исключает присутствия таких нетипируемых мелких хромосом, что может свидетельствовать о «вторичности» диплоидного состава неизмененных хромосом в этой клетке. Определенное участие в такой «вторичной» диплоидизации, по-видимому, могут принимать и робертсоновские транслокации (центрические слияния). Во-первых, потому, что их представленность в одной копии в полиплоидных метафазных пластинках свидетельствует о том, что эти центрические слияния формируются уже после полиплоидизации, а во-вторых — потому, что в них участвует, как правило, материал наиболее крупных хромосом (1, 2, 3), по кото-

рым обнаруживается относительный дефицит копий.

Увеличенное количество клеток с микроядрами ($9,5 \pm 2,0\%$ по сравнению с $1,3—1,7\%$) в околодиплоидных эмбриональных стволовых клетках ES R1, исследованных нами ранее [2], в рассмотренных клеточных популяциях также свидетельствует о повышенной нестабильности в них хромосомного аппарата.

Выводы. Таким образом, наблюдаемая гетерогенность по количеству хромосом к 75-му пасажу герминативных стволовых клеточных популяций может быть обусловлена одновременным протеканием двух процессов: полиплоидизацией клеток и реверсией к диплоидному состоянию, сопровождаемому разрушением хромосом, скорость которого неодинакова для разных хромосом. Полученные данные свидетельствуют об интенсивной кариотипической эволюции, протекающей в этих клеточных популяциях при их пассировании *in vitro*, а также о том, что сохранение в клеточных клонах диплоидного или околодиплоидного числа хромосом не является показателем отсутствия в них генетических преобразований по сравнению с исходными первичными клетками.

SUMMARY. Quantitative and qualitative chromosome rearrangements in the cell line G1 established from a genital ridge of the 12,5 dpc BALB/c mouse embryo were analysed. Cytogenetic analysis was performed on the 75th passage of *in vitro* cultivation. It has been shown that by this passage the cell population was heterogenous. It is suggested that such heterogeneity may be caused by realization of two simultaneous processes namely the cell polyploidization and their secondary diploidization. These processes were accompanied by some chromosome destructions, and the creation of small new acrocentric chromosomes and large aberrant chromosomes as well as Robertsonian translocations. The present study demonstrates *in vitro* karyotype evolution of the mouse cell line G1 including the increased instability of the chromosome apparatus.

РЕЗЮМЕ. Проаналізовано кількісні та якісні зміни хромосом клітин лінії G1, одержаної із статевого горбика 12,5-денного ембріона миші лінії BALB/c. Цитогенетичний аналіз проводили на 75-му пасажі культивування *in vitro*. На даному пасажі клітинна популяція виявилась гетерогенною сумішшю клітин різної плідності. Припустили, що така гетерогенність може бути зумовлена одночасним протіканням двох процесів: поліплоїдизацією клітин та їхньою вторинною

диплоїдизацією. Ці процеси супроводжуються руйнуванням хромосом, утворенням дрібних акроцентричних хромосом, а також великих перебудованих хромосом, в тому числі і робертсонівських транслокацій. У випадку культивування клітин лінії G1 *in vitro* відбувається інтенсивна каріотипічна еволюція клітинної популяції, при якій спостерігається підвищена нестабільність хромосомного апарату.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРА

1. Raz R., Lee C.K., Cannizzaro L.A., d'Eustachio P., Levy D.E. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1999. — **96**, № 6. — P. 2846—2851.
2. Глазко Т.Т., Межевикина Л.М., Бойко А.В. Каріотипічна гетерогенність ембріональної стовлової клітинної лінії миші ES R1 // *Клеточные культуры: Инф. бюл. Вып. 20.* — СПб.: Ассоциация специалистов по клеточным культурам, Институт цитологии РАН, 2005. — С. 19—25.
3. Волгарева Г.М. Хромосомные маркеры мышинных гибридов // *Журн. микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии.* — 1986. — № 2. — С. 69—73.
4. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Підпала О.В., Вагіна І.М., Кочубей Т.П. Одержання нових ліній стовбурих клітин миші і вивчення впливу мікрооточення на їхню каріотипічну мінливість *in vitro* // *Физиология и биохимия культур. растений.* — 2006. — **38**, № 2. — С. 140—148.
5. Яцишина А.П., Підпала О.В., Кочубей Т.П., Лукаш Л.Л. Спонтанна каріотипічна еволюція клітин миші *in vitro* // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* — Київ: Аграр. наука, 2004. — С. 88—92.
6. Яцишина А.П., Підпала О.В., Рубан Т.П., Тимошук О.В., Лукаш Л.Л. Цитоморфологічна характеристика нової клітинної лінії миші G1 // *Цитология и генетика.* — 2006. — **40**, № 3. — С. 49—58.
7. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes // *Lancet.* — 1971. — **2**, № 7731. — P. 971—972.
8. Cowell J.K. A photographic representation of the variability in the G-banded structure of the chromosomes in the mouse karyotype. A guide to the identification of the individual chromosomes // *Chromosoma.* — 1984. — **89**, № 4. — P. 294—320.

Поступила 07.04.06